

Niveles elevados de óxido nítrico en pollos de carne criados en forma artesanal

Pedro Angulo H¹, Julio Oscanoa² L, Juan A Espinoza B¹; Diego Díaz C¹ y Víctor Fernández A¹

RESUMEN

En nuestro país existe un consumo considerable de pollos de carne que proceden de la crianza artesanal; sin embargo, hasta ahora, no hay un sustento científico de las posibles implicaciones toxicológicas en la salud pública. Por lo tanto, nos propusimos conocer ¿cómo se encuentran los niveles de óxido nítrico (NO) en el plasma de pollos de carne criados en condiciones artesanales y, cuál es su posible origen enzimático? Los animales proceden de granjas familiares ubicadas en Villa el Salvador (Lima). La determinación del NO fue indirectamente a través de la cuantificación de los nitritos mediante la reacción de Griess. Se utilizó al dietilditiocarbamato (DETC) como atrapador del NO, L-NAME como inhibidor inespecífico de la enzima sintasa del NO (NOS), y la aminoguanidina (AG) como inhibidor específico de la NOS inducible (iNOS). Los resultados sugieren que el origen de los niveles elevados de nitritos plasmáticos en pollos de carne que se están criando en condiciones artesanales sería de la iNOS, se requiere de trabajos adicionales para su confirmación definitiva. Se concluye que en pollos de carne criados en forma artesanal los niveles plasmáticos de NO se encuentran elevados.

Palabras clave: óxido nítrico y estrés, óxido nítrico y estrés en pollos de carne.

ABSTRACT

In our country there exists a high consumption of chickens of meat that come from the handcrafted upbringing; nevertheless, till now there is no a scientific sustenance of the possible toxicological implications, which this situation could have in the public health. For what, we proposed to know how they find the levels of nitric oxide (NO) in the plasma of chickens of meat raised in handcrafted conditions and, what is his possible enzymatic origin? The animals came from handcrafted farms located in Villa Salvador (Lima). The determination of NO was indirectly across the nitrites by means of Griess's reaction. One used the dietilditiocarbamato (DETC) as trapping of NO, L-NAME as unspecific inhibitor of the sintasa of NO (NOS), and aminoguanidina (AG) like a specific inhibitor of NOS inducible (iNOS). The results suggest that the origin of the high levels of plasmatic nitrites in chickens of meat that are growing up in handcrafted conditions they would be of the iNOS, it is needed of additional works for a definitive confirmation. One concludes that in chickens of meat raised in handcrafted form the plasmatic levels of NO are high.

Key words: Nitric oxide and stress, nitric oxide and stress in chickens.

¹ Laboratorio de Farmacología, Toxicología y Terapéutica Veterinaria, FMV-UNMSM.

² Laboratorio de Investigación y Desarrollo "Alicia Darg Barbieri", CQFP.

* Mayor información: panguloh@unmsm.edu.pe

Este artículo es el sexto de una serie sobre el Rol del óxido nítrico en el estrés de pollos de carne y su impacto en avicultura



INTRODUCCIÓN

Constantemente se viene investigando para hallar el alimento y la ración que logre mayor peso de los pollos de carne en el menor tiempo. El mejoramiento genético y las condiciones medioambientales también han merecido la atención. Los cambios de temperatura medio ambiental o incrementos en los niveles de gas, polvo, inadecuada ventilación, participan en la etiología de varios síndromes, por lo que su control es obligatorio. Sin embargo, en nuestro país existe un alto consumo de pollos de carne que proceden de la crianza artesanal, lo cual es objeto de frecuentes críticas por parte de los medios de comunicación masiva. Sin embargo, hasta ahora no hay un sustento científico de las posibles implicaciones toxicológicas en la salud pública que pueda tener estas condiciones inadecuadas de crianza y comercialización.

Mediante este trabajo nos proponemos conocer ¿cómo se encuentran los niveles de NO en plasma de pollos de carne criados en condiciones artesanales y cuál es su posible origen enzimático?

El NO es un gas que se libera en las células por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina^(1,2). Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que se encuentra en tres isoformas⁽³⁾. Dos de ellas (endotelial eNOS y neuronal nNOS) son expresadas constitutivamente y dependen del calcio; la otra isoforma (inducible iNOS, descubierta inicialmente en los macrófagos) generalmente se induce en el organismo durante la inflamación por la presencia de ciertas citoquinas inflamatorias y/o productos bacterianos^(4,5) y no depende de calcio. El NO tiene una reactividad limitada pero reacciona rápidamente con el oxígeno, el único producto final

estable de la autoxidación del NO en soluciones acuosas es el nitrito (NO_2^-) (6, 7). Granger *et al.* (8) han encontrado una correlación alta entre la producción endógena del NO y los niveles de nitritos y nitratos (NO_x) en plasma, suero y orina. Por lo tanto, la medición de esos NO_x provee un estimado confiable y cuantitativo de la producción *in vivo* de NO (9).

Angulo y col.(10) han reportado, por primera vez en nuestro medio, que los pollos de carne Cobb criados en condiciones experimentales producen niveles elevados de NO_2^- en comparación con otras especies de mamíferos y concluye que estos valores pueden estar relacionados con la especie animal pero también con las condiciones de crianza. Oscanoa (11) encontró que estos niveles se encuentran (aún) más elevados en pollos que se vienen comercializando en diferentes lugares de Lima Metropolitana.

El objetivo de este trabajo es cuantificar los niveles de NO en plasma de pollos de carne criados artesanalmente, medido a través de la producción de sus metabolitos estables: NO_x , y determinar su posible origen enzimático. Nosotros hipotizamos que en los pollos de carne criados en condiciones inadecuadas, los niveles de NO plasmático se encuentran inducidos, por consiguiente su plasma presenta niveles elevados de NO_2^- .

MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental de este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Investigación y Desarrollo del Colegio Químico Farmacéutico del Perú y el laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria-UNMSM en Lima.

Animales:

Pollos de carne que proceden de dos lugares de crianza artesanal ubicados en Villa el Salvador.

Reactivos:

Todas las sustancias químicas fueron de grado analítico y obtenidas de Sigma Chemical Co.

Técnica:

El NO fue determinado indirectamente mediante la cuantificación de los NO_2^- para lo cual se utilizó la reacción de Griess(12, 13). Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3,500 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma (se utilizó heparina como anticoagulante). El plasma fue desproteinizado utilizando sulfato de zinc en medio alcalino (14). La concentración final del plasma fue $\frac{1}{4}$ del original, las lecturas se hicieron en un digital Spectrophotometer LaboMed a 546 nm y referidas a la absorbancia de soluciones de nitrito de sodio tratadas de la misma manera con el reactivo de Griess.

Método estadístico:

Para la evaluación estadística los datos se sometieron a la prueba de "T student" usando un intervalo de confianza de 95%.

RESULTADOS

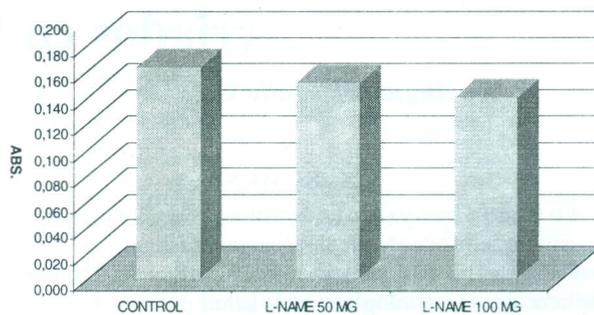


Figura 1. Pollo de 20 días de edad. Efecto del inhibidor L-NAME después de 2 horas

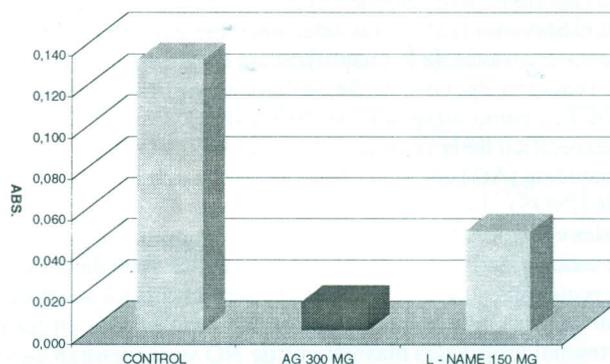


Figura 2. Pollo de 21 días de edad. Efecto de los inhibidores AG y L-NAME después de 2 horas

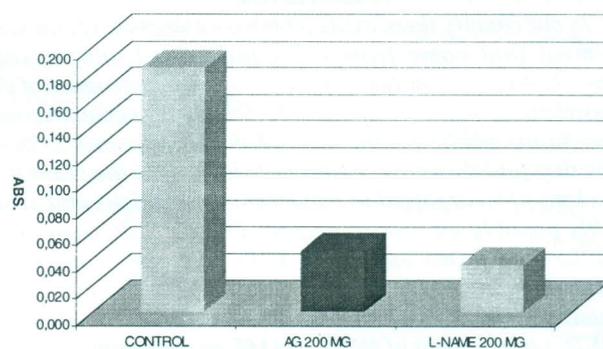


Figura 3. Pollo de 15 días de edad. Efecto de los inhibidores AG y L-NAME después de 3 horas

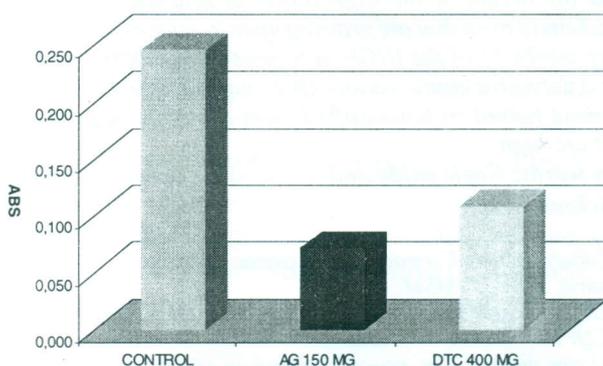


Figura 4. Pollo de 11 días de edad. Efectos del inhibidor AG y el barredor DETC de NO después de 3 horas

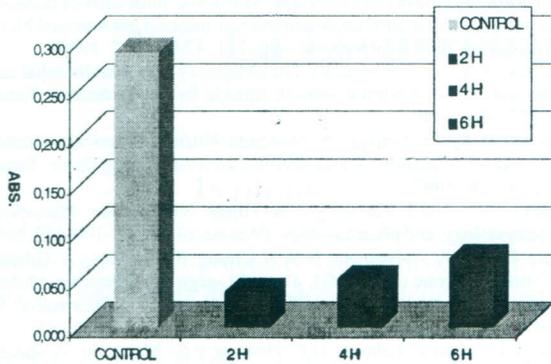


Figura 5. Pollo de 18 días de edad. Inhibidor AG 300 mg/kg.

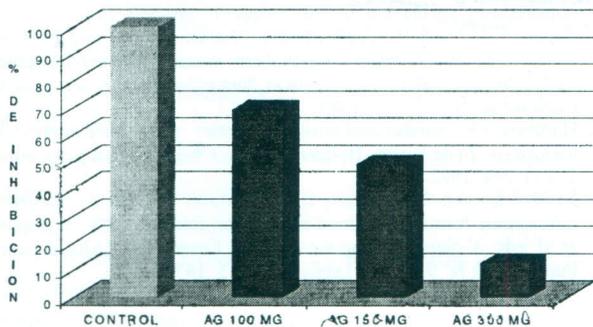


Figura 6. Efecto de diferentes dosis de AG después de 3 horas.

DISCUSIÓN

En 1980 Furchgott y Zawadzky descubren que las células endoteliales producen un factor que causa la relajación del músculo liso adyacente y lo denominan factor relajante derivado del endotelio (FRDE) (15). En 1987 Palmer *et al.* (16) da evidencias que el FDRE es el NO y lo refiere como óxido nítrico derivado del endotelio, lo que creó un gran interés en el mundo científico. Al NO se le considera como una espada de doble filo, ya que producido por las células en un momento y magnitud apropiada sirve como molécula de señalización en procesos fisiológicos, en la defensa del huésped, comunicación neuronal y regulación vascular (17). Mientras que una excesiva producción se ha implicado como un mediador del daño neurotóxico y de la vasodilatación resistente a vasopresores en el choque séptico (17).

Actualmente se viene trabajando con sustancias sintéticas que inhiben la función de la NOS, como los análogos de la L-arginina: L-nitroarginina (L-NARG), nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), L-monometilarginina (L-NMMA) (18, 19). Debido a que hay diferentes isoformas de la NOS y que el NO dependiendo de su origen constitutivo o inducible pueden tener diferentes efectos biológicos, actualmente se busca trabajar con inhibidores selectivos de las diferentes isoformas de la NOS como por ejemplo la aminoguanidina (AG) que inhiben la NOS inducible (iNOS) (14).

Oscanoa (2003) (11) sugiere que los niveles elevados de NO_2^- encontrados en pollos de carne que se vienen comercializando en diferentes lugares de Lima Metro-

litana, puede ser por: 1) las condiciones de comercialización, ii) las condiciones de crianza; o iii) ambas situaciones. Entonces, nos propusimos investigar ¿cómo se encuentran los niveles de NO en plasma de pollos de carne criados en condiciones artesanales y cuál es su origen enzimático?

Al no contar con datos en pollos de carne, tuvimos que proceder a establecer las posibles dosis de los inhibidores (L-NAME y AG); así como, el tiempo de duración del experimento (figuras 1, 2 y 3). El efecto inhibitorio significativo logrado con el L-NAME y la AG nos indica que los NO_2^- plasmáticos proceden del NO y son de origen inducible (figura 2 y 3). Para confirmar que los NO_2^- medidos proceden del NO en la producción de NO_2^- hemos utilizado al dietilditiocarbamato (DETC) un atrapador específico del NO (figura 4). Los resultados de la figura 5 y 6 nos inducen a pensar que el origen del NO es inducible.

Marletta (20) ha propuesto que el NO es un intermediario en la formación endógena de los N-nitroso compuestos. Green *et al.* (21) ha revisado la toxicidad de los nitrosos, nitritos y compuestos N-nitroso en humanos; y los roles de nitrato y nitrito en cáncer gástrico ha sido revisado por Hartman (22). Mohler *et al.* (23) ha descrito los posibles mecanismos para la formación de nitrosaminas en los alimentos.

Nuestros resultados sugieren que el origen de los niveles elevados de NO_2^- plasmáticos en pollos de carne que se vienen criando en condiciones artesanales proceden de la iNOS; sin embargo, se requieren de trabajos adicionales para su confirmación definitiva. También es necesario conocer i) cuál o cuáles son las mayores fuentes (órganos) de producción del NO, ii) la participación de otras variables fisiológicas (como la línea de producción) y ambientales que pueden estar interfiriendo sobre la producción de NO; iii) si los niveles de NO y NO_2^- puede influir en la performance del animal, ganancia de peso, eficiencia de producción, etc. y en consecuencia en la salud pública. Tampoco se debe descartar la posibilidad que estos resultados puedan tener un papel relevante en la productividad del sector avícola y en la farmacia veterinaria.

CONCLUSIONES

Se concluye que en pollos de carne criados en forma artesanal los niveles plasmáticos de NO se encuentran elevados, lo cual sugiere una posible asociación entre las condiciones de crianza y la sobreproducción de NO con posibles implicancias en salud pública.

Bibliografía

- Palmer, R.M.; D.S. Ashton; S. Moncada. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333: 664-667, 1988.
- Nathan, C.F. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 6: 3051-3064, 1992.
- Knowles, R.G. y S. Moncada. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298: 249-258, 1994.
- Michel, T.; O.W. Xie; C. Nathan. Molecular biological analysis of nitric oxide synthases. In: Feilisch, M.; J. Stamler (eds) *Methods in Nitric Oxide Research*. John Wiley and Sons, NY, 161-175, 1996.
- Pozo, D. *et al.* Producción de óxido nítrico y su modulación en el siste-

- ma inmune y el sistema nervioso. *Arch Neurocienc (Mex)*, 2: 84-94, 1998.
6. Award, H. H. y D.M. Stanbury. Autoxidation of NO in aqueous solution. *Int J Chem Kinet*, 25: 375-381, 1993.
 7. Ignarro, L. J.; J.M. Fukuto; J.M. Griscavage; N.E. Rogers y R.E. Byrns. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not to nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 8103-8107, 1993.
 8. Granger, D.L.; R.R. Taintor; K.S. Boockvar y J.B. Hibbs, Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol*, 268: 142-151, 1996.
 9. Cascos M.P.; A.I. Morales Martín; P. Angulo H.; C. Silva Do Amaral; M.D. Núñez Bravo y M.P. Míguez S. Determinación de los niveles de nitratos / nitritos en plasma como indicador de la producción de óxido nítrico. *Química Clínica*, 20 (5): 402, 2001.
 10. Angulo, H.P.; J.A. Espinoza, B.; S.A. Cueva M.; V.F. Fernández A.; D. Díaz C. y M.E. Vásquez C. Primer reporte sobre niveles elevados de nitritos en plasma de pollos de carne, un hallazgo trascendental? *En prensa*, 2003.
 11. Oscanoa Lagunas, Julio. Reporte de niveles elevados de nitritos en plasma de pollos de carne que se comercializan en diferentes lugares de Lima Metropolitana. *Tesis Profesional. Facultad de Ciencias de la Salud*, Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica. Universidad Peruana Los Andes, Huancayo. 60 p., 2003.
 12. Green, L.C.; D.A. Wagner; J. Glogoski; P.L. Skipper; J.S. Wishnok; S.R.; et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Ann Biochem*, 126: 131-138, 1982.
 13. Miranda, K.M.; M.G. Espey; D.A. Wink. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1): 62-71, 2001.
 14. Unno, N.; H. Wang; M.J. Menconi; S.H.A.J. Tytgat; V. Larkin; M. Smith; M.J. Morin; A. Chavez; R.A. Hodin; M.P. Fink. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology*, 113: 1246-1257, 1997.
 15. Furchgott, R.F.; y J.V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 377-386, 1980.
 16. Palmer, R.W.J.; A.S. Ferrige y S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526, 1987.
 17. Moncada, S.; R.M.J. Palmer y E.A. Higgs. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109-142, 1991.
 18. Moore, P.K.; O.A. Al-Swagan; N.W.S. Chong; R.A. Evans y A. Gibson. L-N^G-nitro-arginine (L-NARG), a novel L-arginine reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation in vivo. *Br J Pharmacol*, 99: 408-412, 1990.
 19. Rees, D.D.; R.M.J. Palmer; H.F. Hodson y S. Moncada. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol*, 96: 418-424, 1989.
 20. Marletta, M.A. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol*, 1: 249-257, 1988.
 21. Green, L.C.; y S.R. Tannenbaum. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: Biochemistry, metabolism, toxicity and carcinogenicity. In Neuberger, Jukes, eds: *Human Nutrition*. Jack K Burgess Inc, Englewood, NJ: 87-140, 1982.
 22. Hartman, P.E. Nitrates and nitrites: ingestion, pharmacodynamics, and toxicology. In de Serres, Hollaender, eds: *Chemical Mutagens*, volume 7: 211-294, 1982.
 23. Mohler, K.; O.L. Mayrhofer y E. Hallermayer. Possible mechanisms of nitrosamine formation in food and animal feeding stuffs. In Bogovski et al. eds: *N-Nitroso Compounds in the Environment*. IARC Scientific Publications N° 9, IARC, Lyons: 142-143, 1975.



A la memoria de Pedro Javier Yi Araujo

9 de marzo 1964 - 21 de enero 2007

Nació en Lima el 9 de marzo de 1964, en consecuencia, podría haber cumplido este mes de marzo 43 años de edad. Demasiado poco para la enorme sed de conocimientos de este ejemplar profesional y mejor persona.

Si es verdad que todo aquel que ama a los animales tiene buen corazón, Pedro Javier cumplió a cabalidad dicho precepto. Por ello se inclinó por la Veterinaria. Se graduó en la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM en 1989 y, para encontrar el sentido a su vocación de transmitir conocimientos, estudió postgrado en Administración de la Educación en la Universidad Garcilaso de la Vega.

De estudiante ya mostró un tremendo deseo de aprender, o mejor, de aprender enseñando. Se hizo ayudante alumno del Laboratorio de Histología y Embriología de su Facultad. Allí lo conocimos ya como Jefe de Prácticas y luego Profesor Auxiliar a Dedicación Exclusiva, labor que concluyó en 1994.

Después de su desempeño como Coordinador Académico y Administrativo de la recién creada Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Alas Peruanas, hasta 1999, tuvo un breve paso por la Universidad San Luis Gonzaga de Ica, nada menos que como Secretario General.

A fines de ese año fue invitado a formar parte de la plana docente de la novísima Facultad de Veterinaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, que inició sus funciones en el año 2000. Comenzaba el nuevo siglo y con éste la nueva faceta del Dr. Pedro Yi como hombre múltiple: Secretario Académico, profesor de Histología y Patología y jefe de Laboratorio de Histopatología. Además, formó parte de los órganos de gobierno de la Facultad, fue miembro del Comité Editorial de SPIRAT, la revista institucional, e integró diferentes comisiones dentro de la Universidad. Todo ello con la eficacia y responsabilidad inherente a su dedicación y a su alto sentido de responsabilidad.

Su sed de conocimientos lo llevó, de un curso internacional en Buenos Aires hasta Malasia, donde estudió Patología Veteri-



na. No descansó hasta ser aceptado por la Universidad Pablo Olavide de Sevilla, España, en el programa de doctorado en "Neurociencia y Biología del Comportamiento". Su proyecto de tesis no podía ser más veterinario: "Efectos de la altura y mecanismos de adaptación del Sistema Nervioso Central de la Alpaca".

Como el programa de estudios le permitía alternar con periodos de trabajo de campo en el Perú, fue aquí y próximo a cumplir, no un título, y sí el imperativo mandato propio de ser mejor y más útil, es que se truncó su sueño.

Hombre bueno y solidario y joven; tus amigos pensamos que no debíamos despedirnos nunca. Tal vez aún estés con nosotros. Por siempre (FDV).