

Evolución de los lípidos hepáticos durante el período embrionario y posnatal del *Gallus domesticus*

J. A. Gómez-Capilla, J. M. Macarulla*, A. Martín-Andrés y C. Osorio

Departamento de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad de Granada

(Recibido el 16 de diciembre de 1974)

J. A. GOMEZ-CAPILLA, J. M. MACARULLA, A. MARTIN-ANDRES and C. OSORIO. *Evolution or the Liver Lipids, During the Embryonic and Postnatal Periods of Gallus domesticus*. Rev. esp. Fisiol., 31, 177-182. 1975.

A study has been made of the concentrations and compositions of the various lipid fractions in the liver (total lipids, total cholesterol, free cholesterol, esterified cholesterol, total phospholipids, lecithins, cephalins and sphingomyelins) at different stages of development in the chick embryo, 14th, 17th, 20th and 21st days of incubation, and in the postincubation period, 5th and 10th days after hatching. From the statistic study made, the existence of significant changes in the biochemical parameters studied during the prenatal and postnatal periods, is deduced.

Se ha reconocido (1, 9, 10) que el pollo doméstico difiere en muchos aspectos de los mamíferos, en el metabolismo de los lípidos y de los hidratos de carbono y en muchas respuestas asociadas a las hormonas.

Una gran parte de los trabajos realizados en los últimos años, estudiando la composición de los tejidos y de la yema en los embriones de pollo, han estado encaminados a obtener información sobre el destino de los lípidos durante el desarrollo del embrión (2-4, 8, 11).

Por otra parte, el análisis de los lípidos del hígado de pollos recién nacidos (17), tanto como en pollos adultos (5), han sido publicados.

Se ha estudiado igualmente la evolución de los lípidos hepáticos en el período embrionario; así, FELDMAN (6) realiza un estudio sobre el colesterol y fosfolípidos hasta embriones de 19 días; NOBLE y MOORE (12, 14) igualmente detienen su estudio a los 21 días del desarrollo, aunque no estiman datos sobre las cifras de colesterol libre.

Debido a la variedad del material genético empleado, así como de los métodos de análisis, la comparación de las cifras de lípidos hepáticos en el período embrionario respecto de las cifras obtenidas en

* Dirección actual: Departamento de Bioquímica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

el período de postincubación no es posible

Con el presente trabajo se pretende realizar un estudio completo de los lípidos hepáticos del *Gallus domesticus*, tanto en el período embrionario como en el período de postincubación, a fin de obtener datos sobre las variaciones que pueden ocurrir en el momento de la eclosión.

Material y métodos

Se utilizan huevos fecundados de gallina de la raza Leghorn blanca. Los huevos se ponen a incubar a 38° C en ambiente húmedo. Se eligió para la experiencia huevos de 14, 17 y 20 días de incubación, el resto se dejó nacer utilizando de este lote los pollitos recién nacidos (21 días de incubación) cinco y diez días después de nacer, los cuales fueron alimentados con piensos compuestos y mantenidos en habitación climatizada.

La extracción del hígado de los embriones y de los pollitos se realiza bajo control microscópico, para lo cual se usa una lupa binocular Nikon. El hígado limpio de residuos extraños se pesa y se obtiene un trozo de unos 100 mg que se coloca en un homogeneizador conteniendo una mezcla de cloroformo:metanol:clorhídrico (200:100:1).

Desde la extracción del hígado hasta depositar un trozo de éste en el homogeneizador se procura no invertir un tiempo superior a los 90 segundos.

Los lípidos se extraen del hígado según el método de SANTIAGO *et al.* (15), llevándose a sequedad, bajo corriente de nitrógeno, la fase orgánica y determinándose lípidos totales por gravimetría. A continuación, se disuelve el extracto lipídico en 1 ml de cloroformo tomándose de esta disolución cuatro alícuotas de 100 μ l cada una, en las que se determina: colesterol total, fosfolípidos totales, cromatografía de lípidos neutros y cromatografía de fosfolípidos.

La determinación de las distintas frac-

ciones de lípidos se realiza según la técnica desarrollada por GÓMEZ-CAPILLA *et al.* (7).

Tratamiento estadístico. Los resultados se someten al siguiente tratamiento: para cada fracción de lípidos estudiados se realiza un análisis de la varianza simple que asegure si existen diferencias entre algunos días; en caso afirmativo se localizan dichas diferencias, bien individualmente o, lo que a veces es más interesante, conjuntamente con arreglo al criterio de crecimiento antes de nacer o decrecimiento después de nacer.

Para las comparaciones de medias individuales se utiliza la prueba estadística de la amplitud Q modalidad de Student; para el resto se han usado contrastes ortogonales, para hipótesis prefijadas, y la prueba Jit de Scheffe para algunos contrastes especiales surgidos a posteriori.

Todos los resultados se han discutido para $P < 0,05$.

Resultados

El resultado del análisis de los lípidos hepáticos en los embriones de 14, 17 y 20 días de incubación, así como de los pollitos recién nacidos y de 5 y 10 días después de la eclosión, se resume en la tabla I, en donde cada cifra corresponde a la media de cinco determinaciones realizadas en cinco embriones o pollitos diferentes.

Estos resultados se someten al tratamiento estadístico descrito en Material y métodos, para obtener información sobre la evolución de las distintas fracciones de lípidos estudiadas. La tabla II resume las conclusiones de este estudio, en donde las significaciones se alcanzan para niveles del 5 %.

Discusión

El estudio de los lípidos hepáticos del embrión de pollo da como resultado, en

Tabla I. *Análisis de las fracciones lipídicas (en mg/100) en embriones de 14, 17 y 20 días, en pollitos recién nacidos (RN) y de 5 y 10 días después de la eclosión. Cada cifra corresponde a la medida de cinco determinaciones.**

Estadios	14	17	20	RN	5	10
Lípidos totales	5,080	9,460	13,400	15,260	12,200	5,300
Colesterol total	1,260	4,560	8,000	8,780	2,640	0,840
Colesterol esterificado	0,951	3,948	7,215	7,750	2,055	0,303
Colesterol libre	0,310	0,609	0,790	1,031	0,581	0,543
Fosfolípidos totales	2,180	2,130	2,400	2,580	2,320	2,840
Lecitinas	1,338	1,252	1,471	1,631	1,088	1,405
Cefalinas	0,570	0,538	0,643	0,680	0,764	0,879
Esfingomielinas	0,267	0,335	0,281	0,274	0,467	0,591

* Debido a que el tratamiento estadístico a que han sido sometidos los resultados experimentales se realizó en computadora, y ésta permite obtener directamente los valores de F experimentales, no se incluyen en esta tabla las desviaciones standard.

Tabla II. *Resultados de la aplicación del tratamiento estadístico a los valores experimentales resumidos en la tabla I.*

(L.T., lípidos totales; C.T., colesterol total; C.L., colesterol libre; C.E., colesterol esterificado; F.T., fosfolípidos totales; L., lecitinas; C., cefalinas; E., esfingomielinas).

	L.T.	C.T.	C.L.	C.E.	F.T.	L.	C.	E.
Crecimiento significativo antes de nacer	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	—
Crecimiento significativo después de nacer	Sí	Sí	Sí	Sí	—	Sí	—	—
Crecimiento significativo en toda la experiencia	—	—	—	—	Sí	—	—	—
Estabilización significativa antes de nacer	—	—	—	—	—	—	—	Sí
Existen diferencias significativas individuales entre los días:	14 y 17 17 y 20 5 y 10	14 y 17 17 y 20 RN y 5 5 y 10	14 y 17 17 y 10 20 y RN RN y 5	14 y 17 17 y 10 RN y 5 5 y 10	5 y 10	17 y 20 5 y 10	5 y 10	RN y 5 5 y 10

el caso de lípidos totales, un crecimiento significativo desde embriones de 14 días hasta pollitos recién nacidos, donde la cifra de lípidos totales es máxima 15,260 mg/100. Este crecimiento observado por nosotros está de acuerdo con NOBLE y MOORE (12), aunque las cifras de lípidos totales obtenidas por ellos no coinciden con las nuestras; esto podría justificarse

por los distintos métodos empleados y, sobre todo, y más importante, a que sus resultados vienen expresados en función de peso seco de hígado, mientras que los nuestros se expresan en función del peso húmedo de hígado.

NOBLE y MOORE (13, 14), estudiando la distribución de los lípidos entre la yema y las membranas del saco vitelino, en-

cuentran que la concentración de lípidos totales en la yema durante el desarrollo del embrión disminuye hasta el momento del nacimiento. Este hallazgo y el hecho del aumento significativo de lípidos totales en el hígado durante el desarrollo embrionario, hace pensar que los lípidos de la yema son absorbidos por las membranas del saco vitelino y transportados a los tejidos del embrión, aunque todavía no se han establecido claramente los mecanismos de este proceso. Sin embargo, la mayor aportación de nuestras experiencias la constituye el estudio sistemático de las cifras de lípidos totales en el hígado, tanto en el período embrionario como en el período postincubación; así, se observa que los lípidos totales, cuya cifra en el pollo recién nacido es de 15,260 mg/100, descienden bruscamente hasta 5,300 mg/100 de tejido en hígados de pollitos de diez días. Los resultados completos de la evolución de los lípidos hepáticos totales desde embriones de 14 días hasta pollitos de 10 días después del nacimiento demuestran claramente cómo las cifras máximas de lípidos totales se alcanzan significativamente en hígados de pollos recién nacidos.

Respecto al colesterol total, existe, igualmente, un rápido crecimiento hasta pollitos recién nacidos donde se sitúa la máxima concentración (8,780 mg/100), para inmediatamente descender drásticamente hasta niveles de 0,840 mg/100 en pollitos de diez días. Cuando se estudia la evolución del colesterol libre y del colesterol esterificado, los resultados demuestran en ambos un aumento significativo hasta pollitos recién nacidos. Sin embargo, el aumento de los ésteres de colesterol es mucho más acusado que para el colesterol libre, aumentando significativamente a lo largo de los estadios estudiados en la relación colesterol esterificado/colesterol libre, existiendo la máxima diferencia en pollos recién nacidos. Estos resultados están plenamente de acuerdo con los obtenidos por FELDMAN y GRANTHAN (6),

aunque sólo estudian este proceso hasta embriones de 19 días; a similares conclusiones llegan NOBLE y MOORE (12), deteniendo su estudio, igualmente, en embriones de 21 días, y aunque obtienen datos sobre la cifra de ésteres de colesterol hasta pollitos de 21 días de incubación, no lo hacen del colesterol libre, siendo su mayor aportación el establecimiento de la alta proporción de oleato de colesterol respecto de otros ésteres de ácidos grasos.

El crecimiento de los ésteres de colesterol puede ser resultado del paso desde la yema al embrión, ya que TSUJI (18), estudiando la distribución del colesterol libre y esterificado en huevos incubados, concluye que el colesterol es transportado desde la yema al embrión; iguales resultados obtienen BUDOWSKI (2) y CAMERINO (3); más recientemente, CONNOR (4), marcando el colesterol de la yema, concluye que el 90 % del colesterol del cerebro se sintetiza *in situ*, mientras que el colesterol se origina en la yema.

De los resultados obtenidos del estudio del colesterol total, libre y esterificado, se deduce claramente que la situación en el período postincubación difiere del período embrionario, ya que después del nacimiento, la proporción colesterol esterificado/colesterol libre disminuye con el tiempo, llegando a ser la cifra de colesterol libre algo superior a la de esterificado en pollos de 10 días; estos hallazgos, junto con los recogidos por SCHEJEIDE (16), referentes a la alta proporción de ésteres de colesterol en los quilomicrones y lipoproteínas del plasma del embrión de pollo, sugieren que el éster de colesterol sintetizado en la yema juega un papel en la formación de una lipoproteína, la cual se traslada desde la yema al embrión. Los resultados obtenidos por nosotros respecto al decrecimiento brusco de ésteres de colesterol desde pollitos recién nacidos hasta pollitos de 10 días de edad vienen reforzados por los resultados de DEUEL (5), quien afirma que en el pollo adulto la proporción de colesterol esterificado en el

hígado es sólo de un 7 % del total. Todo esto hace suponer que el éster de colesterol cumple una función única en el embrión, bajando la proporción de éster de colesterol cuando el pollo desarrolla sus propios mecanismos para la síntesis y excreción del colesterol.

Del análisis estadístico se deduce que en todas las fracciones (lecitinas, cefalinas y esfingomielinas más lisolecitinas) existe un crecimiento antes de nacer — excepto para esfingomielinas más lisolecitinas —, que muestran una estabilización hasta el momento del nacimiento. Estos resultados, junto con los hallazgos de que los fosfolípidos mayoritarios en los estudios evolutivos estudiados son las lecitinas seguidas de las cefalinas y esfingomielinas más lisolecitinas, están de acuerdo con los resultados de FELDMAN (6) y de NOBLE y MOORE (13), aunque estos últimos investigadores indican que las esfingomielinas descienden conforme se aproxima el momento del nacimiento; los resultados obtenidos por nosotros de 0,335 mg/100 en el día 17 de incubación, 0,281 mg/100 en el 20 y 0,274 mg/100 en el 21 días, no son significativamente distintos ni tampoco muestran un decrecimiento significativo. Estas divergencias pueden ser originadas a que NOBLE y MOORE no someten sus resultados a un conveniente tratamiento estadístico. Por otra parte, FELDMAN (6), sólo expone que existe un crecimiento de fosfolípidos totales durante el desarrollo del embrión; sin embargo, las fracciones de fosfolípidos que estudia no las somete a estudio estadístico, como tampoco las incluye en la discusión de sus resultados, no obteniendo conclusiones acerca de estos fosfolípidos.

Nuestros resultados permiten deducir que los fosfolípidos totales crecen significativamente a lo largo de toda la experiencia, aun después del nacimiento, y aunque la cifra de 2,320 mg/100 en hígados de pollitos de 5 días respecto de 2,580 mg/100 en pollitos recién nacidos pudiera indicar un descenso de fosfolípi-

dos totales, esto no se alcanza con niveles de significación del 5 %. Más claros son los resultados de las cefalinas y de las esfingomielinas más lisolecitinas hepáticas, que muestran un claro aumento significativo después del nacimiento hasta pollitos de 10 días. Respecto a las lecitinas, son la única fracción estudiada en donde existe una disminución significativa de los niveles hepáticos después del nacimiento 1,631 mg/100 en pollitos recién nacidos frente a 1,088 mg/100 en pollitos de 5 días, contrario a lo que ocurre con las cefalinas y con las esfingomielinas.

Resumen

Se estudia la evolución de lípidos totales, colesterol total, colesterol libre, colesterol esterificado, fosfolípidos totales, lecitinas, cefalinas y esfingomielinas en el período embrionario y posnatal del *Gallus domesticus*, para lo cual se utilizan embriones de 14, 17 y 20 días de incubación, pollitos recién nacidos y de 5 y 10 días después de la eclosión.

Del estudio estadístico realizado se deduce la existencia de cambios significativos en los parámetros bioquímicos estudiados durante el período perinatal.

Bibliografía

1. BELL, D. J. y STURKIE, P. D.: *Avian Physiology*. Comstock, Ithaca. N. Y., 1965.
2. BUDOWSKI, P., BOTTINO, N. R. y REISER, R.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **93**, 483, 1961.
3. CAMERINO, P. W. y WRIGHT, C. D.: *J. Lipid Res.*, **3**, 416, 1962.
4. CONNOR, W. E., JOHNSTON, R. y LIN, D. S.: *J. Lipid Res.*, **10**, 388, 1969.
5. DEUEL, H. J.: *The Lipids*. Interscience Publisher. New York, 1955.
6. FELDMAN G. I. y GRANTHAM, C. K.: *Poultry Sci.*, **43**, 150, 1964.
7. GÓMEZ-CAPILLA, J. A., MACARULLA, J. M., MARTÍN-ANDRÉS, A. y OSORIO, C.: *Laboratorio*, **30**, 301, 1975.
8. GOODRIDGE, A. G.: *Biochem. J.*, **108**, 655, 1968.
9. HOUP, T. R.: *Poultry Sci.*, **37**, 1452, 1958.
10. LEPKOVSKY, S., DIMICK, M. K. y FUTURA, F.: *Endocrinology*, **81**, 1001, 1967.

11. LEVEHLE, G. A.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **28**, 431, 1969.
12. NOBLE, R. C. y MOORE, J. H.: *Biochem. J.*, **95**, 144, 1965.
13. NOBLE, R. C. y MOORE, J. H.: *Can. J. Biochem.*, **45**, 627, 1967.
14. NOBLE, R. C. y MOORE, J. H.: *Can. J. Biochem.*, **45**, 949, 1967.
15. SANTIAGO, E., GANSER, A., MACARULLA, J. M. y GUERRA, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **24**, 37, 1968.
16. STHJEIDE, D. A.: Progress on the Chemistry of fats and other lipids. Vol. 6 (Holman, R. T., edit.). Pergamon Press, Londres, 1963.
17. SGOUTAS, D.: *Can. J. Biochem.*, **44**, 763, 1966.
18. TSUJI, F. I., BRIN, M. y WILLIAMS, H. H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **56**, 290, 1965.