

Niveles de oxidación lípidica en truchas y pollos parrilleros administrados con levofloxacin

Lipoperoxidation levels in rainbow trout and broiler chickens after levofloxacin administration

Weyers, A.¹; Ugnia, L.¹; García Ovando, H.²; Mañas, F.^{2,3}; Gorla, N.^{1,3}

¹Departamento de Salud Pública, ²Departamento Clínica Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, CP 5800, Ruta 36, Km 601, 5800. Río Cuarto, Argentina. ³CONICET.

RESUMEN

La levofloxacin es un antimicrobiano del grupo de las fluoroquinolonas utilizada en medicina humana y con potencial aplicación en animales de producción, si los estudios toxicológicos y farmacológicos lo avalan. Si bien trabajos previos han demostrado que otras fluoroquinolonas y/o sus metabolitos producen peroxidación de lípidos en los tejidos animales, las comunicaciones sobre evaluaciones toxicológicas de levofloxacin son escasas. En el presente trabajo se plantea evaluar la posible oxidación de lípidos en tejidos de pollos parrilleros y truchas (*Oncorhynchus mykiss*), después de la administración de levofloxacin utilizando la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Los valores de nmol de TBARS/g de tejido mostraron diferencias estadísticamente significativas en: músculo de trucha después de una única administración de 10mg/kg de levofloxacin 50,2±3,2 vs control 17,1±3,8 (p<0,05) a las 72 h; en pollo, después de una única administración de 5mg/kg de levofloxacin, los valores fueron, en músculo a las 2 h, 6,2±1,2 vs control 3,7±1,3 (p<0,05) y en hígado a la hora, 6,9±0,2 vs control 0,9±0,1 (p<0,05). Esta información, que sugiere inducción de un efecto oxidativo en tejidos, debe ser profundizada en futuras investigaciones.

Palabras clave: (levofloxacin), (estrés oxidativo), (truchas), (pollos parrilleros).

SUMMARY

Levofloxacin is a fluoroquinolone antimicrobial used in human medicine and with a potential application in food-producing animals, if the toxicological and pharmacological studies support this. Previous studies have shown that other fluoroquinolones and/or its metabolites produce lipid peroxidation in animal tissues but toxicological evaluation of levofloxacin communications are scarce. This work argues evaluate the possible lipid oxidation in broiler chickens and trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues, after levofloxacin administration, using the thiobarbituric acid reactive substances technique (TBARs).

The values, TBARs/g of tissue, showed statistically significant differences in: trout muscle after a 10mg/kg single administration of levofloxacin 50.2 ± 3.2 vs control 17.1 ± 3.8 ($p < 0.05$) at 72 h; in chicken after a single 5mg/kg levofloxacin administration, the values were in muscle at 2 h, 6.2 ± 1.2 vs control 3.7 ± 1.3 ($p < 0.05$) and in liver at 1h, 6.9 ± 0.2 vs control 0.9 ± 0.1 ($p < 0.05$). This information which suggests oxidative effect induction in tissues should be deepened in future research.

Key words: (levofloxacin), (oxidative stress), (TBARs), (trout), (chickens)

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la acuicultura y el consumo mundial de pescado han ido en constante aumento¹⁸. Las truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) son populares en platos occidentales y con frecuencia son cultivadas para la alimentación. Por otro lado, la escala de producción de pollo se ha expandido en todo el mundo. Los antimicrobianos son usados frecuentemente, casi de manera rutinaria, en animales de producción, particularmente las quinolonas son empleadas con fines profilácticos y terapéuticos^{2,9} en la industria avícola y acuicultura. La enrofloxacin es la fluoroquinolona más ampliamente utilizada en la producción aviar²⁰, porcina y bovina⁶, y otras de habitual empleo son sarafloxacin, difloxacin, danofloxacin y marbofloxacin¹³.

La levofloxacin (LFX) es una fluoroquinolona de tercera generación utilizada en medicina humana y con una aplicación potencial en medicina veterinaria. El primer paso para evaluar si su uso es adecuado en animales, es lograr un conocimiento completo del comportamiento farmacológico y toxicológico de este fármaco en individuos sanos. La LFX tiene un amplio espectro antibacteriano, incluyendo bacterias gram negativas, gram positivas, atípicas e intracelulares^{1,5}, mayor que

otras fluoroquinolonas, como ciprofloxacina o norfloxacina. Se han reportado estudios farmacológicos de LFX en terneros⁵, conejos⁸ y gatos¹. Recientemente al determinar los parámetros farmacocinéticos de LFX en pollos parrilleros⁷ y truchas arco iris, se midió un volumen de distribución tisular elevado, Errecalde, C. Comunicación personal (2009).

Si bien trabajos previos han demostrado que otras fluoroquinolonas y/o sus metabolitos producen peroxidación de lípidos en los tejidos animales^{16, 24}, las comunicaciones sobre evaluaciones toxicológicas de LFX son escasas. La oxidación lipídica puede producir decoloración, cambios en el olor y sabor, producción de compuestos potencialmente tóxicos^{14, 17} y reducción de la calidad nutricional de los alimentos. Existen riesgos potenciales para la salud asociados con el consumo de alimentos que contienen lípidos oxidados¹¹. Algunos productos de oxidación dan lugar a la generación de distintas moléculas orgánicas y de malondialdehído (MDA), un agente mutágeno y/o carcinógeno¹⁹. La técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), es utilizada en la cuantificación de MDA, producto final mayoritario de la lipoperoxidación, que generalmente está relacionado con los parámetros de calidad de los alimentos¹⁵.

En el presente trabajo se plantea evaluar la

posible oxidación de lípidos en tejidos consumidos habitualmente por el hombre, hígado, riñón y músculo de pollos parrilleros y músculo de truchas (*Oncorhynchus mykiss*), después de la administración de LFX, utilizando la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), por su bajo costo y la sencillez y accesibilidad del procedimiento de detección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del Comité de Ética de Investigación de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Treinta truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de aproximadamente 250 g fueron criadas en tanques, manteniendo un fotoperíodo natural y alimentadas con balanceado. Los animales fueron distribuidos en diez grupos, con tres truchas cada uno. El grupo control recibió solución salina en la vena caudal y las truchas se sacrificaron a la hora. Nueve grupos recibieron 10 mg/kg de LFX (dosis indicada para otras fluoroquinolonas en peces²²) en una única administración endovenosa y fueron sacrificadas a diferentes tiempos pos tratamiento (1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h). Los peces se sacrificaron por concusión. Se obtuvo de cada animal una muestra de aproximadamente 5 g de músculo dorsal y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

Se utilizaron 35 pollos parrilleros de ocho semanas de edad, que fueron alimentados ad libitum con maíz y distribuidos en siete grupos de 5 animales cada uno. El grupo control recibió solución salina en la vena braquial y los pollos fueron sacrificados a la hora. Seis grupos recibieron 5 mg/kg de LFX (dosis utilizada inicialmente para enrofloxacin²⁰) en una única administración endovenosa y fueron sacrificados a diferentes tiempos pos tratamiento (0,25, 0,50, 1, 2, 12 y 24 h). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y posterior exanguinación. El hígado, los riñones y músculo del muslo fueron extraídos, y de inmediato almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

Los niveles de TBARs en los tejidos fueron

cuantificados utilizando el método original de Buege y Aust³ modificado por Marcincak¹², y se determinó la linealidad en cada tejido con diferentes concentraciones de MDA como estándar (0,4; 0,9; 3,7; 7,3; 14,6; 29,3; 58,6nmol/g de tejido).

Se homogeneizó 1 g de tejido en 3 ml de buffer fosfato pH 7,2-7,4 y 60 µl de butilhidroxitolueno (BHT) 0,01%, en baño de hielo. Se agitaron en vortex 600 µl de homogenato con 600 µl de ácido tricloroacético, la mezcla se incubó a 90 °C durante 30 minutos y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Seiscientos µl de sobrenadante se agitaron en vortex con 600 µl de ácido clorhídrico 0,25N y 600 µl de ácido tiobarbitúrico 0,375% y se incubó la mezcla nuevamente a 90°C durante 30 minutos. Se agregaron 1800 µl de butanol, se agitó y centrifugó durante 10 minutos a 2500 rpm y la lectura del sobrenadante coloreado se realizó espectrofotométricamente a 532 nm.

La reacción se llevó a cabo en dos muestras de cada tejido, expresando los resultados como nmol de TBARs/g de tejido. Los valores obtenidos en los diferentes tiempos después del tratamiento con LFX ($p < 0,05$), se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) y Tukey como prueba post-test, utilizando GraphPad Prism versión 5.00¹⁰.

RESULTADOS

El contenido de TBARs en músculo de truchas después de la administración de LFX, se muestra en el Cuadro 1. Los niveles de TBARs en el músculo del grupo control fueron $17,1 \pm 3,8$ nmol de TBARs/g de tejido. Los valores fluctúan hasta llegar a la concentración más alta y estadísticamente diferente con respecto al grupo control ($50,2 \pm 3,2$ nmol de TBARs/g de tejido), a las 72 h ($p < 0,05$).

En los tejidos de pollos parrilleros, el contenido de TBARs después de la administración de LFX, se muestra en el Cuadro 2. Los niveles de TBARs del grupo control en hígado, riñón y músculo fueron de $0,9 \pm 0,1$; $6,7 \pm 3,0$ y $3,7 \pm 1,3$ nmol de TBARs/g de tejido, respectivamente. Los niveles de TBARs

Horas después de la administración de Levofloxacin	nmol de TBARs/g de músculo
Control	17,1 ± 3,8
1	20,9 ± 7,5
3	21,9 ± 5,3
6	14,4 ± 5,5
12	22,6 ± 8,2
24	17,9 ± 0,5
48	17,4 ± 7,5
72	50,2 ± 3,2 ^a
96	21,2 ± 7,3
120	14,5 ± 4,4 ^b

Cuadro 1. nmol de TBARs/g de tejido en músculo de trucha después de una única administración en vena caudal de 10 mg/kg de Levofloxacin. ^aDiferencia con grupo control. ^bDiferencia con 72 h ($p < 0,05$).

no presentaron diferencias estadísticamente significativas en riñón a través de los tiempos evaluados. En el hígado, después de una hora de la administración del antimicrobiano, se obtuvo un valor de $6,9 \pm 0,2$ nmol de TBARs/g de tejido ($p < 0,05$) y en el músculo, después de 2 h, se cuantificaron $6,2 \pm 1,2$ nmol de TBARs/g de tejido ($p < 0,05$), valores estadísticamente diferentes de los respectivos grupos controles.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

La presente demanda mundial de alimentos a gran escala y los nuevos escenarios epidemiológicos plantean el empleo de antimicrobianos en la producción animal y desafíos como el desarrollo de nuevos fármacos, que deben ser probados en diferentes especies antes de su uso.

Es importante determinar si los tratamientos antimicrobianos en animales de producción pueden provocar efectos adversos en la calidad de los alimentos con potencial impacto en la salud de los consumidores.

En este estudio el tratamiento con LFX en truchas arco iris y pollos parrilleros mostró efecto oxidativo sobre los lípidos en músculo de truchas y en hígado y músculo de pollos, con la probable capacidad de modificar la calidad de estos alimentos.

Si bien los niveles de TBARs presentaron máximas concentraciones en un tiempo de muestreo en algunos tejidos de ambas especies, en el resto de los tiempos de muestreo las concentraciones se mantuvieron similares a las del grupo control. Los altos niveles de TBARs son transitorios, ya que en condiciones naturales los antioxidantes de los tejidos tienen la capacidad de captar los radicales libres, con

Horas después de la administración de Levofloxacin	Hígado (nmol de TBARs/g de tejido)	Riñón (nmol de TBARs/g de tejido)	Músculo (nmol de TBARs/g de tejido)
Control	0,9 ± 0,1	6,7 ± 3,0	3,7 ± 1,3
0,25	1,3 ± 0,4	6,2 ± 3,8	5,7 ± 1,2
0,50	2,0 ± 0,9	6,2 ± 2,6	5,6 ± 0,8
1,00	6,9 ± 0,2 ^a	3,2 ± 3,0	5,2 ± 0,5
2,00	1,8 ± 0,5	6,7 ± 6,4	6,2 ± 1,2 ^b
12,00	0,4 ± 0,3	3,5 ± 1,2	3,6 ± 1,6
24,00	1,3 ± 0,5	4,8 ± 2,2	3,3 ± 0,8

Cuadro 2. nmol de TBARs/g de tejido en pollos parrilleros después de una única administración en vena braquial de 5mg/kg de Levofloxacin. ^aDiferencia entre grupos ($p < 0,05$). ^bDiferencia con grupo control, 2 h ($p < 0,05$).

la posibilidad de reducir la oxidación de los alimentos y sistemas biológicos²⁵.

En un trabajo anterior²⁴, también se ha observado un aumento transitorio de hidroperóxidos lipídicos producidos por radicales libres intermedios, supuestamente generados por la oxidación del nitrógeno del anillo piperazinil ciprofloxacina. La molécula de LFX con una demetilación, puede generar radicales libres intermedios.

La doble dosis de antimicrobiano utilizada en las truchas y los elevados niveles de ácidos grasos poliinsaturados reportados para peces y por lo tanto, su alta susceptibilidad a la oxidación²¹, pueden relacionarse con los mayores valores de TBARs para truchas con respecto a los de pollos parrilleros obtenidos en este trabajo. En la bibliografía consultada los niveles de TBARs en truchas son muy variables, debido a que la composición de los filetes de pescado generalmente se correlaciona con la composición de las dietas de los peces.

El valor de TBARs es un indicador muy importante de la calidad oxidativa de los productos alimenticios y se ha correlacionado con una mayor rancidez y menor aceptación entre los consumidores de estos productos^{4, 23}.

En la práctica actual, la fluoroquinolona LFX no es utilizada en truchas arco iris ni en granjas de pollos, pero representa un buen recurso potencial en terapéutica veterinaria cuando su empleo en humanos prescriba.

Estos resultados preliminares que sugieren que la LFX induce un efecto oxidativo en tejidos, deben ser profundizados en futuras investigaciones, a los efectos de ser considerados junto con la determinación de los tiempos de espera.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarellos, G., Ambros, L., Landoni, M. Pharmacokinetics of levofloxacin after single intravenous and repeat oral administration to cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2005; 28:363–369.
- Amjad, H., Iqbal, J., Naeem, M. Analysis of some residual antibiotics in muscle, kidney and liver samples of broiler chicken by various methods. *Proceedings Pakistany Academy of Sciences*, 2005; 42:223-231.
- Buege, J., Aust, S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods of Enzymology*, 1978; 52:302-307.
- Chen, Y., Nguyen, J., Semmens, K., Beamer, S., Jaczynski, J. Physicochemical changes in ω -3-enhanced farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 2007; 104:1143-1152.
- Dumka, V. K., Srivastava, A. K. Kinetic disposition, urinary excretion and dosage regimen of subcutaneously administered levofloxacin in cross bred calves. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2007; 8:313-318.
- EMEA European Medicines Agency. Veterinary Medicines and Inspections, Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP) reflection paper on the use of fluoroquinolones in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health, EMEA/CVMP/SAGAM/184651. 2005.
- Errecalde, C., Prieto, G., Mañas, F., García Ovando, H. Disposición plasmática y tisular de levofloxacin en pollos parrilleros. *XVII Jornadas Latinoamericanas de Fármaco- Toxicología Veterinaria*, 2009. Córdoba, Argentina.
- Fernandez, J., Barrett, J., Licata, L., Amaratunga, D., Frosco, M. Comparison of efficacies of oral levofloxacin and oral ciprofloxacin in a rabbit model of a staphylococcal abscess. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999; 43:667-671.
- Fortt Z. A., Cabello C.F., Buschmann, R. A. Residuos de tetraciclina y quinolonas en peces silvestres en una zona costera donde se desarrolla la acuicultura del salmón en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 2007; 24:14-18.
- GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPadSoftware, San Diego, California USA, www.graphpad.com.
- Kubow, S. Lipid oxidation products in foods and atherogenesis. *Nutrition Reviews*, 1993; 51:33-40.
- Marcincak, S., Sokol, J., Turek, P., Rozanska, H.,

- Dicakova, Z., Mate, D., Popedka, P., Kozim, P. Comparative evaluation of analytical techniques to quantify malondialdehyde in broiler meat. *Bulletin Veterinary Institute Pulawy*, 2003; 47:491-496.
13. Martinez, M., McDermott, P., Walker, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 2006; 172:10-28.
14. Morrissey, P.A., Buckley, D.J., Sheehy, P.J.A., Monahan, F.J. Vitamin E and meat quality. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1994; 53:289-295.
15. Oduor-Odote PM., Obiero M. Lipid oxidation and organoleptic response during shelf storage of some smoked marine fish in Kenya, African. *Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, 2009; 30:885-900.
16. Pouzaud, F., Dutot, M., Martin, C., Debray, M., Warnet, J., Rat, P. Age-dependent effects on redox status, oxidative stress, mitochondrial activity and toxicity induced by fluoroquinolones on primary cultures of rabbit tendon cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2006; 143:232-241.
17. Rhee, K., Anderson, L., Sams, A. Lipid oxidation potential of beef, chicken and pork. *Journal of Food Science*, 1996; 61:8-12.
18. Sargent, J.R., Tacon, A.G.J. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1999; 58:377-383.
19. Shamberger, R.J., Andreone, T.L., Willis, C.E. Antioxidants in cancer, 4. Initiating activity of malonaldehyde as carcinogen. *Journal of the National Cancer Institute*, 1974; 53:1771-3.
20. Sumano López, H., Gutiérrez Olvera, L. Problemática del uso de enrofloxacin en la avicultura en México. *Veterinaria*. México, 2000; 31:137-145.
21. Tang, S., Kerry, J., Sheehan, D., Buckley, D., Morrissey, P. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish to lipid oxidation. *Food Research International*, 2001; 34:651-657.
22. Tyrpenou A.E., Iossifidou E.G., Psomas I.E., Fotis G.D. Tissue distribution and depletion of sarafloxacin hydrochloride after in feed administration in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 2003; 215:291-300.
23. Viciario Romero, I., Guillen Sans, R., Guzman Cozas, M. Utilización del ensayo 2 tiobarbiturico para evaluar el proceso autooxidativo en alimentos. *Grasas y Aceites*, 1997; 48:96-102.
24. Weyers, A., Ugnia, L., García Ovando, H., Gorla, N. Ciprofloxacin increases hepatic and renal lipid hydroperoxides levels in mice. *Biocell*, 2002; 26:225-228.
25. Wu T.H., Bechtel P.J. Salmon by-product storage and oil extraction. *Food Chemistry*, 2008; 111:868-871.