

Efecto de dietas con aceites de palma, girasol o pescado sobre la susceptibilidad a la oxidación de las lipoproteínas LDL - HDL del plasma de la rata

María Isabel Giacopini¹ y Virgilio Bosch¹

Resumen. Las modificaciones oxidativas de las lipoproteínas del plasma desempeñan un papel causal e importante en el inicio y progresión de la aterosclerosis. Los estudios *in vitro* indican que la velocidad y extensión de la oxidación de la LDL y HDL está influenciada por su composición de ácidos grasos. En el presente estudio se evaluó el efecto del consumo por 60 días de una dieta purificada al 10% (p/p) en los aceites de palma, girasol o pescado sobre la susceptibilidad de oxidación *in vitro* de las fracciones conjuntas de las lipoproteínas LDL y HDL del plasma de ratas machos Sprague Dawley. Utilizamos dos métodos para la evaluación: La determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRTBA) propuesto por Kosugi et al y el de determinación de peróxidos descrito por El-Saadani. Se encontró por ambos métodos que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la susceptibilidad de oxidación de las fracciones LDL+ HDL de los tres grupos. El mayor grado de oxidación se observó para el grupo suplementado con aceite de pescado seguido de los grupos de girasol y palma. Esto sugiere que la incorporación de ácidos grasos monoinsaturados (oleico) en la dieta en lugar de poliinsaturados, protege las LDL+HDL de las modificaciones oxidativas al reducirse la concentración de AGPI disponibles para la peroxidación. **An Venez Nutr 2008;21 (1): 20-24.**

Palabras clave: Aterosclerosis - Oxidación de lipoproteínas, aceite de palma- girasol- pescado, lípidos.

Effect of diets with oil palm, sunflower or fish on the oxidation of LDL - HDL lipoproteins of the rat plasma

Abstract. Oxidative modifications of lipoproteins of the plasma play a causal and important role in the beginning and progression of the atherosclerosis. Studies *in vitro* indicate that the speed and extension of the oxidation of LDL and HDL are influenced by its fatty acid composition. In the present study the effect of the consumption for 60 days of a diet purified containing 10 % of either palm, sunflower or fish oil were evaluated on the susceptibility to *in vitro* oxidation of LDL + HDL lipoproteins from the plasma of male Sprague Dawley rats. For this evaluation we performed two methods: determination of reactive substances with tiobarbituric acid (SRTBA) proposed for Kosugi et al, and the peroxides as described by Al -Saadani. It was found, by both methods, that a statistically significant difference ($p < 0, 05$) existed between the susceptibility to oxidation of LDL and HDL fractions for the three dietary groups. The greatest degree of oxidation was observed for the group supplemented with fish oil followed by groups of sunflower and palm. This suggests that the incorporation of monounsaturated fatty acids (oleic) in the diet instead of polyunsaturated protects the oxidative modification of LDL and HDL by reducing the concentration of PUFA available for peroxidation. **An Venez Nutr 2008;21 (1): 20-24.**

Key words: Atherosclerosis Oxidation of lipoproteins , palm oil, sunflower-oil, fish oil, lipids.

Introducción

Existen numerosas evidencias que indican que la génesis de la lesión ateromatosa de la pared arterial está relacionada con las modificaciones oxidativas de las lipoproteínas. Los resultados obtenidos en estudios bioquímicos y experimentales en modelos animales en las investigaciones clínicas y epidemiológicas apoyan la hipótesis de que las modificaciones oxidativas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) desempeñan un

papel causal e importante en el inicio y progresión de la aterosclerosis (1-3).

Esta hipótesis oxidativa propone esencialmente que el proceso de aterogénesis se desencadena cuando en la pared arterial, en el espacio subendotelial las LDL son oxidadas y captadas por macrófagos a través de receptores específicos, llamados receptores recolectores, los cuales no son controlados por el colesterol celular, conduciendo a la acumulación de éste y a la formación de células espumosas (4-7). La forma como las LDL oxidadas interactúan con las células y su potencial efecto aterogénico depende de la intensidad de la oxidación (8). Bajo condiciones oxidativas similares a las empleadas para la oxidación de la LDL, la HDL también es oxidada, y reconocida por el receptor recolector de los macrófagos en forma similar a las LDL oxidadas, contribuyendo también a acumulación de colesterol intracelular (9).

1. Sección de Lipidología, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Instituciones: Sección de Lipidología, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Solicitar copia a: María Isabel Giacopini. Sección de Lipidología, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Teléfonos: 6053419/3423, 0212-7815128. Cel. 0424-1156483 e-mail giacopim@gmail.com

La susceptibilidad de oxidación de la LDL y HDL, presenta gran variabilidad como resultado en parte de diferencias en las concentraciones de antioxidantes (10) asociadas a esas estructuras y de su composición en ácidos grasos (11-12), y son en parte la causa de la diferencia en la aterogenesidad de las lipoproteínas LDL y HDL de diferentes sujetos. Los resultados publicados por nosotros, sugieren que el grado de oxidación de las lipoproteínas LDL y HDL depende de su composición en ácidos grasos, y por consiguiente de la dieta (13).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de dietas al 10%(p/p) en los aceites de palma, girasol o pescado como fuente de ácidos grasos sobre la susceptibilidad de oxidación *in vitro* de la fracción conjunta de LDL y HDL de plasma de rata (Sprague Dawley) por el método del ácido tiobarbitúrico, TBARS, propuesto por Kosugi et al y el de peróxidos de El-Saadani. El modelo animal empleado en este estudio se caracteriza por una concentración de LDL baja y HDL alta, por lo que se utilizan las fracciones conjuntas de lipoproteínas LDL y HDL que llamaremos LDL+HDL, ambas susceptibles a oxidarse, y contribuir en el desarrollo de la placa ateromatosa.

Métodos

Animales y dietas

En este estudio se utilizaron 27 ratas machos de la cepa *Sprague Dawley*, con un peso promedio de 200 ± 20 g de peso, Los animales fueron colocados en jaulas individuales y separados en tres grupos de 9 ratas/grupo y alimentados *ad libitum* por un lapso de ocho semanas.

La composición de la dieta experimental se muestra en la Cuadro 1. La dieta de cada uno de los grupos contiene 10% p/p de aceite siendo las fuentes de ácidos grasos los siguientes aceites: Grupo I: aceite de palma refinado de uso no comercial suministrado por CAI Productora de Grasas (Valencia, Venezuela); Grupo II: aceite de girasol Dorada (Caracas, Venezuela); Grupo III: aceite de pescado de Schering Labs (Caracas, Venezuela). Las dietas fueron preparadas semanalmente y conservadas bajo refrigeración en atmósfera de nitrógeno. El consumo de la dieta y peso de los animales fue controlado diariamente durante el periodo que duró el experimento.

Obtención del plasma

Después de ocho semanas, los animales, previo ayuno de 14 horas, fueron anestesiados con Neosdonal (Specia-París-Francia) por vía intraperitoneal (5mg/100 g de peso corporal) y se exanguinaron por punción cardíaca. La sangre fue colectada en tubos con 10 μ l/mL de EDTA al 10%, y centrifugada a 2000 g por 15 min., a 10°C. El plasma obtenido se conservó bajo refrigeración a 4°C, hasta su procesamiento.

Cuadro 1. Composición de la dieta experimental.

Componentes	Composición (g/100)
Caseína	22,47
D-L Metionina	0,3
Mezcla de minerales ¹	3,5
Mezcla de vitaminas ²	1,0
Bitartrato de Colina	0,2
Celulosa	5,0
Almidón de maíz	57,53
Aceite ³	10

¹ Teklad Test Diets Mineral Mix, Ain – 76 # 170915.

² Teklad Test Diets Vitamin Mix, Ain – 76 A # 40077

³ Aceite de girasol - palma o pescado.

Aislamiento de las lipoproteínas

Las fracciones de lipoproteínas fueron aisladas por sucesivas ultra centrifugaciones y ajustes de la densidad del medio con bromuro de potasio, según el método de Havel, (14). Primero se separó la fracción correspondiente a la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), ajustando la densidad del plasma a 1,006 g/ml con bromuro de potasio. Las lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL + HDL) fueron aisladas conjuntamente ajustando la densidad del infranadante que queda después de separar la VLDL, a la densidad de 1,21 g/ml y ultracentrifugando a 105000g por 24 horas y 15°C. Esta fracción, LDL+HDL fue desalinizada con una columna Pharmacia PD -10 empacada con Sephadex G-25M (Sigma Chemical Co. St. Louis) y como intercambiador una disolución buffer (tris 10 mM – NaCl 0,14 M, pH 7,2). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry modificado por Shacterlec y Pollack (15).

Oxidación de las LDL+HDL

La oxidación de las LDL+HDL se indujo por la adición de iones cobre según método de Thomas et al (16). El grado de oxidación de las lipoproteínas se evaluó por los métodos de determinación de sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (SRTBA) propuesto por Kosugi et al (17) y el método de determinación de peróxidos descrito por El-Saadani et al (18). La cuantificación de SRTBA, se realizó por comparación con una curva patrón de equivalentes de malondialdehído generado por hidrólisis ácida de soluciones de diferente concentración de 1, 1, 3,3 -tetrametoxipropano y la de peróxidos utilizando una curva de calibración elaborada con peróxido de hidrógeno. Los resultados son expresados como nmoles de SRTBA/mg de proteína o nmoles de peróxido/mg de proteína de la LDL+HDL.

Composición de ácidos grasos

Se separaron los lípidos totales de las lipoproteínas por el

método propuesto por Folch et al (19). Estos son metilados agregándoles una mezcla metanol/tolueno/ácido sulfúrico en proporción 86:10:4 e incubación por 90 min a 80°C. Los metil ésteres de ácidos grasos fueron extraídos y analizados por cromatografía gas/liquido. Los aceites, se metilaron directamente y se procedió como se describió para las lipoproteínas.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media aritmética de los valores individuales \pm la desviación estándar (DE). Las diferencias de los resultados obtenidos por los métodos de detección de peroxidación TBARS y peróxidos de los diferentes grupos dietarios fueron evaluados utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA). El criterio de significación estadística fue de 5% ($p < 0,05$) después de la corrección de Bonferroni.

Resultados

El peso promedio de las ratas alimentadas con la dieta que contenía 10% p/p de los aceites de palma, girasol o pescado después de las ocho semanas fue 427 ± 12 , 414 ± 11 , y 409 ± 16 g. respectivamente, no se observó diferencia significativa en el crecimiento de las ratas de los diferentes grupos.

La composición de AGs., tanto de los aceites constituyentes de las dietas, como de la fracción LDL + HDL del plasma de rata de cada uno de los grupos experimentales, se muestran en los Cuadros 2 y 3. Los AGs más abundantes en la fracción LDL + HDL del grupo I fue el oleico C18:1 n-9, y el palmítico C18:0; en el grupo II fue el linoleico C18:2 n-6 y oleico C 18:1 n-9., y en el grupo III el AG predominante es el mirístico C14:0, Los AGs de la serie n-3 el eicosapentanoico (C20:5 n-3) y el docosahexanoico (C22:6n-3) solamente son detectados en la fracción LDL+HDL del grupo III.

Cuadro 2. Composición de ácidos grasos de los aceites de girasol- palma y pescado (%).

AGs	14:0	16:0	18:0	18:1n-9	18:2 n-6	20:4	20:5n-3	22:6n-3
Palma	nd	36.5	1.3	52.1	9.3	nd	nd	nd
Girasol	nd	7.0	nd	29.6	63	nd	nd	nd
Pescado	14.8	15.3	0.6	16.0	nd	1.1	21.6	5.8

nd = no detectable.

Cuadro 3. Composición de ácidos grasos de las LDL + HDL de rata alimentadas con dietas al 10% de aceites de girasol- palma 0 pescado (%).

AGs.	14:0	16:0	18:0	18:1n-9	18:2 n-6	20:4	20:5n-3	22:6n-3
Palma	6.6	18.8	nd	23.6	3.4	15.2	nd	nd
Girasol	3.4	14.7	1.2	12.1	19.5	20.7	nd	nd
pescado	27.8	12.1	5.6	10.7	3.3	4.3	3.2	5.8

nd= no detectable

En el Cuadro 4 se reporta la media \pm DE del grado de peroxidación *in vitro* de las fracciones de lipoproteínas HDL + LDL a las 3 horas, determinado por los métodos del TBARS y el de peróxido. Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos por ambos métodos, indican que hay una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el grado de oxidación de las lipoproteínas LDL+HDL de los tres grupos. Se observa que transcurrido el tiempo experimental de oxidación, las lipoproteínas LDL+HDL de las ratas del Grupo III presentan la mayor concentración de TBARS y de peróxidos, mientras que las fracciones LDL+HDL del Grupo I presentan el menor grado de oxidación.

Cuadro 4. Grado de oxidación de la fracción LDL + HDL de plasma de rata con dieta del 10% aceite de: palma – girasol o pescado.

Grupo	(nmoles/ mg de proteína)		
	Aceite de Palma ^a	Aceite de Girasol ^b	Aceite de Pescado ^c
TBARS	$0,76 \pm 0,14^{bc}$	$1,46 \pm 0,07^{ac}$	$2,76 \pm 0,08^{ab}$
Peróxido	$0,88 \pm 0,07^{bc}$	$1,83 \pm 0,087^{ac}$	$8,37 \pm 0,52^{ab}$

Cada resultado corresponde al promedio \pm desviación estándar de los valores obtenidos en cada grupo n=9.

Las letras indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos.

Discusión

Al comparar los resultados obtenidos de la composición de AGs de las muestras de los aceites con los de las lipoproteínas LDL+HDL del plasma de las ratas de los tres grupos dietarios, se observa la influencia de la dieta en la composición de AGs de la fracción LDL+HDL del plasma de rata, así como en la susceptibilidad de oxidación de las mismas. Los resultados del grado de oxidación de la fracción LDL + HDL de los tres grupos dietarios, por los métodos de peróxido El-Saadani y el TBARS, muestran que por ambos métodos hay una diferencia estadísticamente significativa entre el grado de oxidación de los grupos. Sin embargo, el grado de oxidación de las fracciones LDL+HDL estimado por el método de detección de hidroperóxidos, da valores mayores que los obtenidos por el método del ácido tiobarbitúrico. El Saadani et al, atribuyen esto a que los peróxidos de lípidos son los productos que se forman mayoritariamente al principio de la reacción de oxidación, mientras que el malondialdehído y otras sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, son productos secundarios que provienen de la ruptura de los hidroperóxidos (18).

Las fracciones LDL+HDL de las ratas del grupo I presentaron el grado de oxidación promedio más bajo, en comparación a las fracciones de LDL+ HDL de las ratas de los otros grupos. Esto posiblemente obedece a que el aceite de palma tiene una alta concentración de ácido oleico, ácido graso monoinsaturado (AGMI) y su consumo enriquece las lipoproteínas con este ácido graso, como se observa en el Cuadro 3, resultando lipoproteínas más resistentes a la oxidación. De hecho, Aviram et al; observaron que la LDL incubada con ácido oleico era menos susceptible a oxidarse que otra incubada con ácido linoleico o araquidónico (20).

Así mismo, estudios recientes realizados en pacientes hipercolesterolémicos indican que las LDL ricas en ácido oleico y pobres en AGPI, tras ingerir una dieta rica en aceite de oliva, son más resistentes a la oxidación (21). Igualmente se observó que las fracciones de lipoproteínas LDL+HDL de ratas que consumieron la dieta con aceite de girasol, presentaron mayor concentración de SRTBA y de peróxido en comparación con las lipoproteínas LDL + HDL del grupo que consumió aceite de palma. Este aumento en el grado de oxidación de la fracción LDL + HDL de las ratas del grupo II está posiblemente relacionada con el enriquecimiento de sus lipoproteínas con el AGPI linoleico, el cual presenta dos insaturaciones, lo que las hace más susceptibles a oxidarse.

Al comparar el grado de oxidación de las fracciones LDL+HDL de estos dos grupos con respecto al grupo que

consumió la dieta con aceite de pescado, se observa una diferencia altamente significativa, lo cual se puede atribuir a la presencia de los AGPI eicosapentanoico y docosahexanoico que poseen cinco y seis insaturaciones respectivamente. De manera que el enriquecimiento de las LDL+HDL con AGPI n-3 provoca una mayor susceptibilidad a la oxidación en las mismas, en comparación a las lipoproteínas con alto porcentaje de ácidos grasos oleico o linoleico.

Estos hallazgos concuerdan con resultados obtenidos por nosotros sobre la susceptibilidad de oxidación de las lipoproteínas LDL y HDL humanas y su composición de ácidos grasos, donde se encontró que no hay correlación estadísticamente significativa entre la producción de SRTBA y el porcentaje de ácido oleico, pero si existe una correlación estadísticamente negativa con respecto el porcentaje de ácido linoleico y una correlación positiva estadísticamente significativa con el porcentaje de ácido docosahexanoico y eicosapentanoico de los fosfolípidos de las LDL y HDL humanas (22).

Esta notable diferencia en el grado de oxidación de las fracciones LDL+HDL entre los grupos I y II respecto al grupo III, puede atribuirse a la posible incorporación de antioxidantes a las lipoproteínas, ya que el aceite de palma contiene tocoferoles y tocotrienoles y el de girasol tocoferoles, los cuales se ha demostrado inhiben la oxidación de las LDL (23-26).

Estos resultados sugieren que los ácidos grasos de la dieta pueden influir de un modo directo en la susceptibilidad de oxidación de las lipoproteínas, a través de la modificación de su composición en ácidos grasos. La introducción de ácidos grasos monoinsaturados en lugar de poliinsaturados protege las LDL+HDL de las modificaciones oxidativas simplemente reduciendo la concentración de AGPI disponibles para la peroxidación.

Referencias

1. Steimberg D, Witztum JL. Lipoprotein and atherogenesis: current concepts. *J Am Med Assoc* 1990; 246: 3047-52.
2. Steimberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915 -24.
3. Streinbrecher U.P., Zhang H., y Loughheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radical Biology y Medicine* 1990; 9: 155 – 168.
4. Brown, M.S. y Goldstein, J.L. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34 – 47.
5. Goldstein JL, Brown MS. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977; 46: 897 – 930.
6. Aquel NM, Ball RY, Waldman H, Mitchinson MJ. Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1984; 53:265-271.

7. Morel D.W., DiCorleto P.E., y Chisholm G.M. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation, *Arteriosclerosis* 1984; 4: 357.
8. Parhami F, Fang ZT., Fogelman, AM Andalibi A Territo, MC, Berliner JA Minimally modified low density lipoprotein – induced inflammatory responses endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest* 1986; 77: 641- 43.
9. La Ville. A.E., Sola R., Balanya J., Turner P.R., Masana L. In vitro oxidized HDL is recognised by the scavenger receptor of macrophages: implications for its protective role in vivo. *Atherosclerosis* 1994; 105: 179-189.
10. Diplock AT. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: S189 - 193.
11. Esterbauer H, Jürgens G, Quehenberger O, Koller E. Autoxidation of human low density lipoprotein : loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res* 1987; 28: 495 -509.
12. Lapointe A, Couillard C, Lemieux S. Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *J Nutr Biochem* 2006;17: 645- 658
13. Giacopini M.I. Peroxidación de ácidos grasos. *Arch Latinoamer Nutr* 1995; 45:307 -308
14. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 4: 1345-1353.
15. Schacterle G. y Pollack R. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biological material. *Anal Biochem* 1973; 51: 654 - 655.
16. Thomas CE, Jackson RL. Lipid hydroperoxide involvement in copper – dependent and independent oxidation of low density lipoproteins. *J. Pharmacol – Exp- ther* 1991; 256: 1182- 1188.
17. Kosugi H, Kojima T, Kikugawa K. Characteristics of the thiobarbituric acids reactivity of oxidized fats and oils. *JAOCS* 1991; 68:51-55.
18. El-Saadani M, Esterbauer H, El-Sayed M. Goher M, Nassar AY, Jurgens G. Espectrophotometric assay for peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. *J Lipid Res* 1989; 30: 627-630.
19. Folch J, Lees M, Sloane GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 228: 497.-509
20. Aviran M, Elias K. Dietary olive oil reduces low density lipoprotein uptake by macrophages and decrease the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. *Ann Nutr Metab* 1999; 37: 75-84.
21. Baroni SS, Amelio M, Sangiorfi Z, Gaddi A, Baffino M. Solid monoinsaturated diet lowers LDL unsaturation traíd and oxidisability in hipercholesterolemic patients. *Free Radic Res* 1999; 30:275-285.
22. Giacopini MI, Bosch V. Oxidación de las lipoproteínas de alta y baja densidad del plasma humano y su correlación con la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos. *Rev Facultad Medicina* 2002; 25: 10-12.
23. Babiy AV, Gebick JM, Sullivan DR. Vitamin E content and low density lipoprotein oxidizability induced by free radicals. *Artherosclerosis* 1990; 81: 175-182.
24. Rifici VA, Khachadurian AK. Effects of dietary vitamin C and E supplementation on the copper mediated oxidation of LDL and on HDL mediated cholesterol efflux. *Atherosclerosis* 1996; 127:19-26.
25. Baracaldo CM; Poveda E, Ordoñez E, Rodríguez M, Ayala P, Delgado W, Guerra M. Concentraciones de tocoferoles y tocotrienoles en ratas, como respuesta a la suplementacion con aceites vegetales de diferentes fuentes. *Lect Nutr.* 2004; 11(1):36-43.
26. Aguilera CM, Mesa MD, Ramirez-Tortosa MC, Nestares MT, Ros E, Gil A. Sunflower oil does not protect against LDL oxidation as virgin olive oil does in patients with peripheral vascular disease. *Clin Nutr* 2004; 23:673-81.

Recibido: 10-07-2007

Aceptado: 06-02-2008