

Influencia de la ingesta de una grasa tratada térmicamente sobre la lipidemia y lipoproteinemia de ratas

F. J. Sánchez-Muniz *, C. Cuesta, A. Rodriguez y G. Varela

Instituto de Nutrición (C.S.I.C.)
Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Farmacia
28040 Madrid (España)

(Recibido el 21 de febrero de 1985)

F. J. SANCHEZ-MUNIZ, C. CUESTA, A. RODRIGUEZ and G. VARELA. *Influence of the Use of a Heated Fat on the Lipidemia and Lipoproteinemia of Rats*. Rev. esp. Fisiol., 42, 105-110. 1986.

The effect on rats fed on a diet with 15 % solid frying fat (diet B) is compared to the effect of a diet with 15 % of the same fat but in the raw state (diet A). After 10 weeks being fed on these diets serum triglycerides, phospholipids, total cholesterol, free cholesterol, esterified cholesterol, high density lipoprotein-cholesterol and free fatty acid levels were checked. Percentage of very low density lipoproteins (VLDL), low density lipoproteins (LDL) and high density lipoproteins as well as the composition of these lipoproteins was determined in parallel. Rats fed on diet B showed a significant increase in phospholipids and a significant decrease in VLDL when compared to those fed on diet A. Phospholipids on LDL decreased significantly in diet B fed rats. The data obtained seem to indicate that the hypercholesterolemic tendency induced by frying fat is neutralized by a decrease in VLDL levels.

Key words: Frying fat, Lipidemia, Lipoproteinemia, Rats.

En las grasas sometidas a la acción del calor, como es el caso de las empleadas en fritura, se producen alteraciones, como la aparición de peróxidos, polímeros y un decrecimiento de los ácidos grasos poliinsaturados (7, 21, 29) los cuales originan productos de degradación conocidos como especies químicas nuevas (31).

En un estudio anterior se comprobaron los efectos de la ingesta de diferentes

grasas crudas y empleadas en frituras repetidas sobre los niveles lipídicos y lipoproteicos de ratas, sugiriendo los resultados una diferente metabolización de las mismas (20).

Recientemente (21) se ha publicado la influencia del consumo de grasas empleadas en frituras repetidas respecto a las mismas crudas sobre el peso e ingesta.

El objeto de este trabajo es comparar los efectos del consumo de dietas conteniendo grasa cruda y utilizada en frituras repetidas sobre la lipidemia y lipoproteinemia de ratas.

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

Material y Métodos

El experimento se llevó a cabo en ratas Wistar machos al destete, de 21 días de edad y 45 g de peso medio.

Los animales fueron agrupados en dos lotes (A y B) y alojados individualmente en cajas metabólicas en una habitación termorregulada a 22 ± 2 °C con iluminación constante de 12 horas diarias.

Desde el destete y durante un período experimental de 10 semanas todas las ratas ingirieron agua *ad libitum* y su dieta correspondiente.

Las dos dietas ensayadas contenían 10 % de proteína (caseína suplementada con DL-metionina), 15 % de grasa, 8 % de fibra bruta (celulosa microcristalina). El aporte de un 5 % de minerales y 5 % de vitaminas hidrosolubles se ajustó mediante la incorporación de correctores adecuados añadiendo independientemente las vitaminas liposolubles A y D. El 57 % restante estuvo formado por una mezcla de almidón y sacarosa a partes iguales (20).

Ambas dietas, isocalóricas entre sí, diferían únicamente en la calidad de la fuente grasa. La dieta A contenía una grasa cruda y la dieta B, la misma grasa pero después de ser usada en 30 frituras sucesivas de patatas. La composición porcentual de los ácidos grasos aparece en la tabla I.

Las frituras se realizaron utilizando un volumen de 5 l de grasa, adicionando en cada fritura 100 g de patatas (20). El número total de frituras fue 30 y se dejó que la grasa alcanzase la temperatura ambiente entre cada una de ellas.

Análisis de los ácidos grasos de las dietas experimentales. Muestras de la grasa cruda y después de 30 frituras fueron analizadas mediante cromatografía de gases, obteniéndose los ésteres metílicos de los ácidos grasos por el método de METCALFE *et al.* (19). Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 5710, con

columnas de acero empaquetadas con 15 % de succinato de dietilenglicol (DEGS)* sobre Chromosorb WAWAD-MCS 80/100 6 ft, 1/8 inch. La temperatura de columna fue 185 °C; la de inyector y detector, 250 °C.

Separación de Lp. Para la separación de VLDL, LDL y HDL y de su contenido en lípidos y proteínas se tomaron de cada grupo de ratas 6 sueros al azar. La separación de estas Lp séricas se realizó por ultracentrifugación con una ultracentrífuga (Model L5-50 rotor SW-50.1, Beckman Instruments) a $225.000 \times g$ durante 180 min (22), lo que supone una modificación de la técnica de TERPSTRA *et al.* (26) ya que se reduce considerablemente el tiempo de ultracentrifugación; si bien no es posible valorar el contenido proteico de la HDL (22).

Análisis del suero y de las Lp séricas. HDL-C fue separado del suero por precipitación con heparina y $MnCl_2$ (4). El CL se determinó por el método de ABELL *et al.* (1) después de su precipitación con digitonina (2). Los niveles de CT, HDL-C del suero y CT de las tres Lp separadas por ultracentrifugación se determinaron enzimáticamente usando el kit de la catalasa de Boehringer-Mannheim.

La concentración de fósforo en suero y en las Lp se midió según el método

Abreviaciones: Tg = Triglicéridos; FL = Fosfolípidos, CT = Colesterol Total; CL = Colesterol Libre; CE = Colesterol Esterificado; HDL-C = Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; VLDL = Lipoproteínas de muy baja densidad; LDL = Lipoproteínas de baja densidad; HDL = Lipoproteínas de alta densidad; AGL = Ácidos Grasos Libres; Lp = Lipoproteínas; DEGS = Succinato de Dietilenglicol; UFA = Ácidos Grasos Insaturados; SFA = Ácidos Grasos Saturados; PAGE = Electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida; apo = apoproteínas.

de BÖTTCHER *et al.* (3). Los AGL fueron valorados usando el kit de Boehringer Mannheim. El contenido proteico de las VLDL y LDL se determinó de acuerdo con MARKWELL *et al.* (18). Los niveles de Tg se estimaron enzimáticamente según el kit de Boehringer Mannheim.

Los porcentajes de VLDL, LDL y HDL en suero se determinaron mediante lipoproteinograma por el electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (PAGE) (23).

Todas las determinaciones se llevaron a cabo con control de calidad y los datos obtenidos se trataron estadísticamente con el test *t* de Student.

Resultados y Discusión

Debido al proceso de fritura se produce en la grasa ensayada un descenso de los ácidos grasos insaturados (UFA) que se acompaña de un incremento porcentual de los ácidos grasos saturados (SFA) (tabla I), que no se debe a su formación durante el proceso sino que es consecuencia de la disminución de UFA, resultados que están de acuerdo con los de

Tabla I. Composición porcentual de los ácidos grasos de las grasas de las dietas A y B, obtenidos por cromatografía de gas.

Acido graso	Grasa de la dieta	
	Cruda (A)	Fritura (B)
Láurico (C _{12:0})	0,20	0,62
Mirístico (C _{14:0})	1,11	1,50
Palmitico (C _{16:0})	43,66	45,83
Palmitoleico (C _{16:1})	0,16	0,28
Estearico (C _{18:0})	4,80	5,60
Oleico (C _{18:1})	38,48	38,44
Linoleico (C _{18:2})	9,91	7,05
Linolénico (C _{18:3})	0,78	0,25
Aráquico (C _{20:0})	0,25	0,22
Índice de saturación	0,98	0,85

Tabla II. Lípidos séricos (mg/dl) de ratas alimentadas con grasa cruda y utilizada en frituras.

Entre paréntesis número de animales. Cada valor representa la media \pm S.E.M.

	Dieta A (9)	Dieta B (12)
CT	68,35 \pm 4,21	73,12 \pm 3,57
CE	44,09 \pm 2,46	50,03 \pm 2,82
CL	24,26 \pm 2,77	23,08 \pm 1,20
HDL-c	43,64 \pm 2,97	45,56 \pm 2,46
Tg	114,20 \pm 13,89	90,51 \pm 6,81
FL	50,41 \pm 8,20*	72,04 \pm 5,33
AGL	13,30 \pm 1,64	12,08 \pm 0,91

* $p < 0,05$ vs dieta B.

otros autores (7, 20, 21, 29). Según VIGNERON (31) los UFA descienden al calentar las grasas formándose, a partir de ellos, especies químicas nuevas.

En la lipidemia de ambos lotes se aprecian sólo pequeños cambios (tabla II), situación que debe achacarse exclusivamente a la pequeña diferencia en la composición grasa de las dietas (tabla I). Solamente los FL se incrementan significativamente, si bien existe un ligero incremento no significativo de CT, CE y HDL-C junto con una tendencia a reducir los Tg en el grupo B. VERGROESEN y DE BOER (30) indican que los FL séricos reaccionan cualitativamente de manera similar a modificaciones de la grasa dietaria que el CE.

GUILLAUMIN *et al.* (14) alimentando ratas con aceite calentado de cacahuete, palma, soja y girasol encontraron valores similares a los de este trabajo para FL, lípidos totales, Tg y AGL respecto a ratas control alimentadas con dichas grasas crudas.

No obstante, en un estudio paralelo a éste (20), utilizando aceite de oliva procedente de 30 frituras de patatas, frente al mismo crudo, se comprobó un incremento de CT, CE y HDL-C junto con

Tabla III. Distribución de lipoproteínas séricas (%) de ratas alimentadas con grasa cruda y utilizada en frituras.

Entre paréntesis número de animales. Cada valor representa la media \pm S.E.M.

	Dieta A (9)	Dieta B (12)
VLDL	12,44 \pm 1,61	8,39 \pm 0,92 ^a
LDL	4,97 \pm 0,61	5,76 \pm 0,74 ^b
HDL	82,52 \pm 1,61	85,80 \pm 1,26 ^b

t de Student = ^a $p < 0,05$; ^b N.S. = no significativo.

un decrecimiento asimismo significativo de los niveles de Tg.

El grupo B presenta una tendencia a incrementar de forma no significativa su CE manteniendo constantes los niveles de CL (tabla II). Este efecto ha sido corroborado en un trabajo realizado en las mismas condiciones experimentales que éste, pero con otra grasa, en el que se registró un incremento significativo de CE manteniéndose constante el CL (20) lo que está de acuerdo con GLOMSET y NORUM (12) quienes describen la tendencia de la rata a esterificar su CL como un mecanismo que contribuye a bajar la colesterolemia.

En ratas se ha descrito una intensa esterificación del colesterol no sólo por el enzima lecitín-colesterol-acil-transferasa (17), sino hepáticamente por el enzima acil-CoA-colesterol-acil-transferasa (12). De acuerdo con este último autor la mayoría del CE sería formado por este mecanismo e integrado en las VLDL de origen hepático.

Los resultados obtenidos por PAGE (tabla III) y ultracentrifugación del suero (tabla IV) son similares a los observados por otros (5, 8, 20, 27), donde la LDL de rata aparece en pequeña proporción mientras que la HDL aparece en apreciable cantidad comportándose como un importante transportador de lípidos. Esta distribución de las Lp señala las peculiaridades del metabolismo lipoproteico en la rata (5, 8-11, 20, 27, 33).

La ingesta de dieta B respecto a la dieta A indujo una significativa reducción en los porcentajes de VLDL no observándose cambios en los de LDL y HDL (tabla III).

El análisis de las diferentes lipoproteínas mostró un incremento significativo en los FL de las LDL del lote B (tabla IV), lo que parece indicar una posible modificación en la relación de la parte polar/no polar de las LDL y, por tanto, de su tamaño (9, 11).

Si la composición de VLDL en ambos grupos A y B (tabla IV) es casi idéntica en su contenido lipídico y proteico, tales partículas deben tener un tamaño similar (9, 11). La disminución de su porcentaje en el grupo B (tabla III) parece lógico relacionarla con un número menor de partículas debido a una disminución en su síntesis (33) o a un incremento en el aclaramiento hepático de estas VLDL (9, 11).

En este trabajo no se ha procedido a la separación y cuantificación de las diferentes formas de apoproteínas B (apo B), pero es posible que el menor porcentaje de VLDL y la tendencia a la disminución de Tg encontrada en el lote B se relacionen con los datos de WINDMUELLER y SPAETH (33), quienes señalan que la producción hepática de VLDL en la rata está relacionada con la biosíntesis de 3 formas de apo B y que las cantidades relativas de éstas dependen del nivel de biosíntesis de ácidos grasos y salida de Tg a sangre.

Por otra parte, en rata se ha descrito (9, 11) una intensa captación de VLDL por el hígado no sólo como VLDL *remanentes* (disminuidas en Tg y enriquecidas en CE), sino como VLDL sin modificar (6).

La disminución en el porcentaje de VLDL en el lote B puede ser consecuencia de un incremento de su aclaramiento por el hígado, no dependiente de su

Tabla IV. Niveles de lípidos y proteínas (mg/dl) en las lipoproteínas de ratas alimentadas con dietas conteniendo 15 % de grasa cruda (dieta A) o grasa procedente de frituras (dieta B). Número de animales por dieta=6. Cada valor es la media \pm S.E.M. N.D.=No determinado.

Lipoproteínas	Dieta	Triglicéridos	Colesterol total	Fosfolípidos	Proteínas
VLDL	A	47,46 \pm 8,12	8,27 \pm 0,94	6,09 \pm 0,60	21,43 \pm 1,75
VLDL	B	42,83 \pm 5,55	7,34 \pm 1,51	5,71 \pm 0,71	18,64 \pm 1,50
LDL	A	8,73 \pm 1,42	5,94 \pm 0,49	2,09 \pm 0,55*	12,59 \pm 1,85
LDL	B	12,56 \pm 2,68	5,79 \pm 1,34	4,75 \pm 0,89	17,24 \pm 3,96
HDL	A	39,55 \pm 1,95	44,57 \pm 2,25	66,52 \pm 4,86	N.D.
HDL	B	45,36 \pm 5,74	47,83 \pm 2,82	70,39 \pm 4,32	N.D.

* $p \leq 0,05$ vs la misma lipoproteína dieta B.

composición lipídica (32), ya que en ambos grupos A y B la composición de las VLDL es casi idéntica (tabla IV), sino de otros mecanismos relacionados con apos específicas (apo B y apo E), los cuales serían reconocidos por los receptores del hepatocito, determinando su aclaramiento (13, 15, 16, 25, 32).

Así, se ha señalado que las partículas VLDL-apo B 48 son aclaradas más rápidamente que las VLDL conteniendo apo B 100-apo B 95, contribuyendo a prevenir la acumulación de VLDL ricas en Tg (33).

En este estudio se ha valorado el contenido total proteico en VLDL (tabla IV), no observándose ningún cambio, pero no ha sido posible la cuantificación de las diferentes apo B o apo E.

Según SHELBURNE *et al.* (24) la captación de quilomicrones remanentes y VLDL inhibe la síntesis hepática de colesterol, lo cual contribuiría a bajar la colesterolemia. Estos datos apoyan los obtenidos en este estudio en los que paralelamente a una bajada de VLDL se observan niveles no modificados de CT (tablas II y III).

Los resultados de este estudio, coincidentes con otro previo (20) sugieren la adaptación del metabolismo lipídico de la rata al ingerir en su dieta grasas o aceites procedentes de frituras repetidas.

La secuencia metabólica parece relacionar de forma inversa la bajada de los niveles de VLDL con la esterificación del colesterol manteniendo constantes los niveles de CL, lo cual se corresponde con un aumento de la fosfolipemia.

Resumen

Se compara en ratas el efecto del consumo de una dieta conteniendo un 15 % de grasa empleada en frituras repetidas de patata (dieta B), con el debido a otra que contiene un 15 % de la misma grasa pero en estado crudo (dieta A). Después de un periodo experimental de 10 semanas se determinaron en suero triglicéridos, fosfolípidos, colesterol total, colesterol libre, colesterol esterificado, colesterol en la fracción lipoproteica de alta densidad y ácidos grasos libres. Paralelamente se determinó en suero el porcentaje de lipoproteínas (Lp) de muy baja densidad (VLDL), baja densidad (LDL) y de alta densidad, así como la composición lipídica y proteica de dichas lipoproteínas obtenidas por ultracentrifugación. Las ratas alimentadas con dieta B mostraban en suero un incremento significativo de fosfolípidos y una bajada significativa en el porcentaje de VLDL. Respecto a las Lp sólo los fosfolípidos de las LDL bajaron significativamente en el grupo que ingirió dieta B. Los resultados parecen indicar que las ratas que ingieren dietas conteniendo grasa frita regulan su colesterolemia bajando los niveles de VLDL en suero.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado en parte por el Consejo Oleícola Internacional.

Bibliografía

1. Abell, L. L., Levy, B. B., Broads, B. B. y Kendall, F. F.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 357-366, 1962.
2. Babson, A. L., Shapiro, P. O. y Philips, G. E.: *Clin. Chim. Acta*, **7**, 800-804, 1962.
3. Bötcher, C. J. F., Van Gent, C. M. y Pries, C.: *Anal. Chim. Acta*, **24**, 203-204, 1961.
4. Bürnstein, M., Scholnick, H. R. y Morstin, R.: *J. Lipid Res.*, **11**, 583-595, 1970.
5. Chapman, M. J.: *J. Lipid Res.*, **21**, 789-853, 1980.
6. Cooper, A. D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **488**, 464-474, 1977.
7. Díaz-Alonso, A. L.: *Grasas y Aceites*, **28**, 235-241, 1977.
8. Dolphin, P. J.: *J. Lipid Res.*, **22**, 271-289, 1981.
9. Eisenberg, S. y Levy, R. I.: *Adv. Lipid Res.*, **13**, 1-89, 1975.
10. Faergeman, O. y Havel, R. J.: *J. Clin. Invest.*, **55**, 1210-1218, 1975.
11. Faergeman, O., Sata, T., Kane, J. P. y Havel, R. J.: *J. Clin. Invest.*, **56**, 1396-1403, 1975.
12. Glomset, J. A. y Norum, K. R.: *Adv. Lipid Res.*, **11**, 1-65, 1973.
13. Goldstein, J. L., Kita, T. y Brown, M. S.: *N. Engl. J. Med.*, **309**, 288-296, 1983.
14. Guillaumin, R., Coquet, B. y Rouand, J. L.: *Ann. Nutr. Alim.*, **32**, 467-481, 1978.
15. Jones, A. L., Hradek, G. T., Hornick, C., Renaud, G., Windler, E. E. y Havel, R. J.: *J. Lipid Res.*, **25**, 1151-1158, 1984.
16. La Rosa, J. C., Levy, R. I., Herbert, P. N., Lux, S. E. y Fredrickson, D. S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 57-62, 1970.
17. Lacko, A. G., Rutemberg, A. L. y Soloff, L. A.: *Atherosclerosis*, **19**, 297-307, 1974.
18. Markwell, M. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. y Tolbert, N. E.: *Anal. Biochem.*, **87**, 206-210, 1978.
19. Metcalfe, L. V., Schmitz, A. A. y Pelka, J. R.: *Anal. Chem.*, **38**, 514-515, 1966.
20. Rodríguez, A.: Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 1982.
21. Rodríguez, A., Cuesta, C., Sánchez-Muniz, F. J. y Varela, G.: *Grasas y Aceites*, **35**, 22-28, 1984.
22. Sánchez-Muniz, F. J., Cuesta, C., Rodríguez, A., Terpstra, A. H. M., Herrero, R. y Varela, G.: *Rev. esp. Fisiol.*, **38**, Supl., 281-284, 1982.
23. Schaafma, G. y Van Oudheusden, A. P. M.: *Pharmaceutisch weekblad*, **109**, 713-717, 1974.
24. Shelburne, F., Hanks, J., Meyers, W. y Quarfordt, S.: *J. Clin. Invest.*, **65**, 652-658, 1980.
25. Sherrill, B. C. y Dietschy, J. M.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 1859-1867, 1978.
26. Terpstra, A. H. M., Woodward, C. J. H. y Sánchez-Muniz, F. J.: *Anal. Biochem.*, **111**, 149-157, 1981.
27. Terpstra, A. H. M., Sánchez-Muniz, F. J., West, C. E. y Woodward, C. J. H.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **71B**, 669-673, 1982.
28. Van't Hooft, F. M., Hardman, D. A., Kane, J. P. y Havel, R. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 179-182, 1982.
29. Varela, G., Moreiras-Varela, O. y Ruiz-Roso, B.: *Grasas y Aceites*, **34**, 101-107, 1983.
30. Vergroesen, A. J. y De Boer, J.: En «Wissenschaftliche Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung». «Polyenfettsäuren». Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1971, Vol. 22, pp. 76-89.
31. Vigneron, P. Y.: *Rev. Franç. Corps. Gras.*, **20**, 463-469, 1973.
32. Windler, E., Chao, Y. y Havel, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 5475-5480, 1980.
33. Windmueller, H. G. y Spaeth, A. E.: *J. Lipid Res.*, **26**, 70-81, 1985.