

Inducción de hipercolesterolemia en el conejo por dietas semisintéticas. Cambios en la composición de las lipoproteínas de alta densidad

F. J. Sánchez-Muniz* y A. H. M. Terpstra**

Department of Human Nutrition
Agricultural University
De Dreijen 12. 67603 DC Wageningen
The Netherlands

(Recibido el 11 de mayo de 1987)

F. J. SANCHEZ-MUNIZ and A. H. M. TERPSTRA. *Hypercholesterolemic Induction in Rabbits Fed Semisynthetic Diets. Changes in High Density Lipoprotein Composition*. Rev. esp. Fisiol., 44 (1), 45-50, 1988.

The effects on HDL, cholesterol and apoprotein (apo) AI and E contents in New Zealand rabbits fed on casein or soybean protein were studied. The switch from a commercial diet to the semisynthetic diets produced in only 24 hours a cholesterol enrichment of HDL in both groups, being much greater in the group receiving casein. A parallel increase on cholesterol and proteins in HDL in both dietary treatments was noted after 7 days. Apo AI content increased more in the casein group than in the one fed on soybean protein. Apo E increased 100 % in the casein lot, while it did not change or tended to diminish in the soya-group. Results suggest an increase formation of HDL rich in apo E as a metabolic response to hypercholesterolemia due to feeding rabbits casein.

Key words: Casein, Soybean protein, Hypercholesterolemia, Apo(lipo)proteins, Rabbit.

En la actualidad parece evidente que en algunos animales como el conejo, la fuente proteica juega un papel importante regulando el metabolismo del colesterol (2, 14, 20). También se ha indicado que dietas conteniendo caseína inducen niveles elevados de colesterol comparados con

dietas conteniendo proteína de soja (2, 18); sin embargo, los mecanismos por lo que se producen dichos cambios metabólicos aún no se conocen en profundidad, habiéndose propuesto diferentes teorías (2, 6, 23).

En un trabajo previo (21) se estudiaron las alteraciones que tienen lugar en los lípidos séricos de conejos de raza Nueva Zelanda, durante los primeros momentos de sustituir una dieta comercial por otras semisintéticas conteniendo proteína de soja o caseína. El objetivo de este trabajo es estudiar en las mismas condiciones ex-

* Correspondencia y petición de separatas: Departamento de Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid. España.

** Dirección actual: Nutrition and Metabolism. The Miriam Hospital. 164 Summit Avenue. Providence, RI 02906. USA.

perimentales, las modificaciones cuantitativas que tienen lugar en el colesterol y apolipoproteínas (Apo)* AI y E de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) del conejo, tratando de conocer si existe alguna relación entre los cambios lipídicos y apoproteicos encontrados y el tipo de proteína consumida.

Material y Métodos

Se utilizaron 2 grupos de 6 conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 13 semanas de edad y un peso aproximado de 1.800 gramos. Los animales fueron alojados en celdas metabólicas individuales y mantenidos en una habitación con aire acondicionado y luz controlada (12 h/día). Los conejos fueron alimentados con una dieta comercial (Trow and Co. N. V. 3881 L. B. Tutton, Holanda) y transferidos sin periodo de adaptación a dietas semipurificadas conteniendo como fuente proteica caseína y soja respectivamente. La composición de la dieta fue similar a la descrita previamente (5) y contenía 36 % de almidón de maíz, 1 % de aceite de maíz, 13,8 % de grasa de coco, 20 % de caseína o semilla de soja, 21 % de serrín de madera como fibra dietaria, 1,2 % de complejo vitamínico y el resto de complejo mineral. La ingesta de agua fue *ad libitum*, restringiéndose la ingesta sólida a 100 g/día.

Las muestras de sangre fueron obtenidas sin periodo previo de ayuno, a partir de la vena marginal de la oreja, 10 días antes y 1, 7, 14 y 31 días después del cambio dietario.

Las lipoproteínas séricas fueron aisladas mediante ultracentrifugación en gra-

* Abreviaciones:

apo: apo(lipo)proteína(s); HDL: lipoproteínas de alta densidad; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; apo E-HDL: lipoproteínas de alta densidad conteniendo apo E.

diente de densidad (22) y las HDL recogidas mediante sección de los tubos en base a su posición en el gradiente. La concentración de proteínas en la fracción HDL fue valorada mediante un método basado en el de LOWRY *et al.* (8) en el que los lípidos eran eliminados antes de la determinación de la densidad óptica mediante extracción con éter etílico.

La fracción HDL fue dializada y delipidada y sus apo, después de solubilizadas, estudiadas en geles poliédricos (slabs) conteniendo lauril sulfato sódico (SDS) en gradiente continuo 3-27 % de poliácridamida (17). El peso molecular aproximado de las apo fue determinado frente a una solución patrón conteniendo fosforilasa (90.000 daltons), transferrina (80.000), albúmina bovina (88.000), gamma globulina (54.000 y 23.500), ovoalbúmina (43.000), lisozima (14.000) y citocromo- C (13.500). Después de electroforesis los geles fueron fijados con isopropanol, teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 y desteñidos con metanol-acético-agua hasta una visión nítida de las bandas apoproteicas.

La concentración de apos AI y E fue calculada por densitometría y posterior referencia a la concentración proteica de su HDL respectiva.

La concentración de colesterol en HDL fue determinada mediante el método de ABELL *et al.* (1).

Los resultados fueron analizados estadísticamente usando el test de «t» de Student.

Resultados y Discusión

La transferencia de una dieta estándar a dietas semisintéticas induce, ya desde las 24 horas, marcadas modificaciones en la composición de las HDL séricas de conejos de raza Nueva Zelanda.

Así, en el lote que recibió caseína los niveles de colesterol en HDL aparecen incrementados en un 104,7 % a las 24

Tabla I. Concentraciones de colesterol y proteína (mg/dl) y cociente colesterol/proteína, en lipoproteínas de alta densidad (HDL), y cociente HDL colesterol/colesterol total en suero de conejos alimentados con caseína y proteína de soja antes y después del cambio dietario.
Número de animales por dieta: 6. Cada valor es la media \pm SEM.

Días	Dieta	HDL-colesterol	HDL-colesterol/ colesterol total	Proteínas HDL	Colesterol/ proteína en HDL
-10	Basal caseína	17,0 \pm 2,2	0,42 \pm 0,03	87,8 \pm 9,9	0,20 \pm 0,03
	Basal soja	20,3 \pm 1,6	0,45 \pm 0,03	99,9 \pm 6,1	0,21 \pm 0,03
1	Caseína	34,8 \pm 3,2*	0,39 \pm 0,04	93,7 \pm 6,1	0,37 \pm 0,02* ^a
	Soja	26,9 \pm 4,0	0,39 \pm 0,04	92,2 \pm 6,6	0,29 \pm 0,02*
7	Caseína	47,7 \pm 6,3*	0,36 \pm 0,04	130,6 \pm 17,8	0,38 \pm 0,05*
	Soja	41,8 \pm 7,9*	0,41 \pm 0,04	137,4 \pm 17,7	0,29 \pm 0,02*
14	Caseína	47,7 \pm 6,6*	0,32 \pm 0,04	139,1 \pm 15,2*	0,35 \pm 0,04* ^a
	Soja	34,5 \pm 7,1	0,36 \pm 0,07	121,8 \pm 17,6	0,28 \pm 0,03
31	Caseína	49,9 \pm 6,2*	0,36 \pm 0,06	150,3 \pm 9,2* ^a	0,33 \pm 0,03*
	Soja	35,2 \pm 6,6	0,48 \pm 0,06	110,6 \pm 9,0	0,31 \pm 0,04*

* P < 0,05 respecto a su basal respectivo. ^a p < 0,05 entre caseína y soja mismo día.

horas, manteniéndose superior al 180 % durante el resto del experimento. En el lote de soja el incremento fue de menor cuantía durante la primera semana (105,9 %) encontrándose posteriormente una tendencia al descenso (tabla I).

El cociente HDL-colesterol/colesterol total (tabla I) denota en ambos lotes una expansión de los *pools* de otras lipoproteínas (p. e.: VLDL y LDL), si bien este cociente fue casi siempre más elevado en el lote de soja. Similares resultados han sido encontrados por TERPSTRA *et al.* (19).

LACOMBE y NIBBELINK (7) encontraron, en conejos con colesterolemias próximas a 100 mg/dl alimentados con caseína o soja, concentraciones más altas de colesterol en VLDL que en los alimentados con dietas comerciales. A niveles superiores, el incremento se produce primero a nivel de LDL y después de VLDL (15).

Se piensa que el incremento de colesterol en estas fracciones puede ser debido a una estimulación de la producción de

VLDL y LDL (2), a un catabolismo disminuido de estas lipoproteínas (2, 13) o a una menor excreción de esteroides neutros fecales (2, 4, 12).

El contenido proteico de las HDL también aumentó, especialmente para el lote caseína, aun cuando estos cambios sucedieron después del incremento en el contenido de colesterol, situación que incrementó el cociente colesterol/proteína después de 24 horas del cambio dietario, permaneciendo posteriormente casi constante en ambos grupos (tabla I). Según SHEPHERD *et al.* (16) este cociente es una medida de la capacidad de transporte en una lipoproteína, por lo que sugiere una hipertrofia lipídica de las HDL en ambos lotes, si bien superior en el lote alimentado con caseína. Ya que el contenido de colesterol en las HDL se incrementa después de 24 horas mientras que el cociente permanece constante, parece que el número de estas «nuevas» HDL también debe elevarse.

La concentración de apo AI (tabla II) permaneció constante durante los prime-

Table II. Concentraciones de apoproteínas A1 y E (mg/dl) y correlaciones entre el contenido de apo A1 y apo E y colesterol en lipoproteínas de alta densidad (HDL) de conejos alimentados con caseína y proteína de soja antes y después del cambio dietario.

Entre paréntesis número de animales. Cada valor es la media \pm SEM.

Días	Dieta	Apoproteína A1	Apoproteína E	Correlación apo A1: colesterol en HDL	Correlación apo E: colesterol en HDL
-10	Basal caseína	37,25 \pm 4,53 (6)	5,57 \pm 2,26 (6)	—	—
	Basal soja	38,47 \pm 1,35 (5)	5,64 \pm 0,78 (5)	—	—
1	Caseína	33,58 \pm 3,54 (6)	5,87 \pm 0,58 (6)	—	0,6545
	Soja	36,42 \pm 3,61 (6)	3,92 \pm 0,45 (6)	—	0,5367
7	Caseína	50,84 \pm 4,30 (5)	10,62 \pm 3,27 ^a (5)	0,6003	0,9993
	Soja	57,00 \pm 7,11* (6)	5,70 \pm 0,81 (6)	0,9320	0,7028
14	Caseína	57,35 \pm 8,46 (2)	11,98 \pm 3,78 ^a (3)	0,8788	0,9779
	Soja	58,36 \pm 15,63 (4)	4,41 \pm 0,99 (4)	0,6859	—
31	Caseína	77,03 \pm 6,43* (5)	10,19 \pm 2,19 ^a (5)	—	0,9082
	Soja	59,91 \pm 8,17* (5)	3,78 \pm 0,68 (5)	0,8665	—

* $p < 0,05$ respecto a su basal respectivo; ^a $p < 0,05$ entre caseína y soja mismo día. Correlaciones menores a 0,5 no se señalan.

ros momentos y se incrementó posteriormente, quizá por su papel en la esterificación del colesterol y en el mantenimiento estructural de las HDL (3).

La concentración de apo E (tabla II) y su contenido relativo (datos no mostrados) aumentaron en el lote alimentado con caseína, no observándose diferencias significativas en el lote de soja. Los niveles más elevados de apo E y la mayor y muy elevada correlación existente entre los niveles de apo E y colesterol en HDL en el lote de caseína (tabla II), parece se relacionan con el mayor efecto hipercolesterolemizante de la caseína respecto a la proteína de soja.

Según MAHLEY e INNERARITY (11) la apo E está presente en VLDL y quilomicrones y en una subclase de HDL referida como HDL con apo E (apo E-HDL).

El nivel de apo E-HDL se incrementa después de la ingesta de altos niveles de grasa y colesterol (9, 10), habiéndose sugerido que se forman a partir de HDL, sin apo E, que han captado colesterol de

células musculares lisas, macrófagos, etc. (10, 11), como posible mecanismo para transferir el colesterol de unas células a otras y eliminar su exceso mediante producción hepática de bilis (11). Esta captación hepática de apo E-HDL se produce, al aparecer, mediante un mecanismo dependiente de un receptor para apo E cuya expresión, a diferencia del receptor, para apo B-apo E no disminuye en animales alimentados con colesterol (10, 11).

En resumen, los resultados sugieren que ante el cambio dietario se produce enriquecimiento de colesterol en las HDL en ambos lotes, tendiendo a continuación, el de soja, a la normalización. Sin embargo, en el lote de caseína se produce un elevado número de partículas apo E-HDL ricas en colesterol.

Agradecimientos

Agradecemos la importante contribución de los doctores M. P. Katan y R. J. J. Hermus en la ejecución de este trabajo.

Resumen

Se valora en conejos de raza Nueva Zelanda los efectos sobre la composición de las HDL por el consumo de dietas semipurificadas conteniendo caseína o proteína de soja. Sólo después de 24 horas de transferir los animales de una dieta comercial a dietas semipurificadas se detecta un enriquecimiento en el contenido de colesterol de las HDL de ambos lotes, mucho más marcado en el grupo con caseína. Posteriormente existe un paralelismo entre el incremento de colesterol y proteínas en HDL en ambos grupos. El contenido en apo AI se incrementa en ambos lotes, pero de forma más neta en el que consume caseína. El contenido en apo E en las HDL se incrementa un 100 % tras el consumo de caseína, no variando o tendiendo a disminuir en el lote con soja. Estos datos sugieren la formación de HDL enriquecidas en apo E como respuesta metabólica al incremento de colesterol plasmático producido en el conejo al consumir dieta con caseína.

Palabras clave: Caseína, Proteínas de soja, Hipercolesterolemia, Apo (lipoproteínas).

Bibliografía

1. Abell, L. L., Levy, B. B., Broads, B. B. y Kendall, F. F.: *J. Biol. Chem.*, 195, 357-366, 1962.
2. Beynen, A. C., Van der Meer, R., West, C. E., Sugano, M. y Kritchevsky, D.: En «Nutritional effects on cholesterol metabolism» (Beynen, A. C., ed.). Transmondial, Voorthuizen, 1986, pp. 29-45.
3. Fielding, C. J., Shore, V. G. y Fielding, P. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 1493-1498, 1972.
4. Fumagalli, R., Paoletti, R. y Howard, A. N.: *Life Sci.*, 22, 947-952, 1978.
5. Hermus, R. J. J.: «Experimental atherosclerosis in rabbits on diets with milk fat and different proteins». Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen (Holanda), 1975.
6. Huff, M. W. y Carroll, K. K.: *J. Nutr.*, 110, 1676-1685, 1980.
7. Lacombe, C. y Nibbelink, M.: *Artery*, 6, 280-289, 1980.
8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
9. Mahley, R. W.: En «Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism» (Dieschy, J. M., Gotto, A. M., Jr. y Ontko, J. A., eds.). Clinical Physiology Series, American Physiological Society, Bethesda, 1978, pp. 181-192.
10. Mahley, R. W.: *Diabetes*, 30 (suppl), 60-65, 1980.
11. Mahley, R. W. e Innerarity, T. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 737, 197-222, 1983.
12. Martínez de Prado, M. T., Sánchez-Muniz, F. J., Katan, M. B. y Hermus, R. J. J.: *Rev. esp. Fisiol.*, 37, 407-412, 1981.
13. Ross, A. C. y Zilversmit, D. B.: *J. Lipid Res.*, 18, 169-181, 1977.
14. Sánchez-Muniz, F. J., Beynen, A. C., Terpstra, A. H. M. West, C. E.: *Rev. Clin. Esp.*, 172, 181-186, 1984.
15. Scholz, K. E., Beynen, A. C. y West, C. E.: *Atherosclerosis*, 44, 85-97, 1982.
16. Sherpherd, J., Packard, C. J., Grundy, S. M., Yeshurun, D., Gotto, A. M. y Tauton, O. D.: *J. Lipid Res.*, 21, 91-99, 1980.
17. Swaney, J. B. y Kuehl, K. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 446, 561-565, 1976.
18. Terpstra, A. H. M., Harkes, L., Sánchez-Muniz, F. J. y Van der Veen, F. H.: *Voeding*, 41e, 265-267, 1980.
19. Terpstra, A. H. M., Harkes, L. y Van der Veen, F. H.: *Lipids*, 16, 114-119, 1981.
20. Terpstra, A. H. M., Hermus, R. J. J. y West, C. E.: En: «Animal and Vegetable Proteins in Lipid Metabolism and Atherosclerosis» (Gibney, M. J. y Kritchevsky, D., eds.). Alan R. Liss, Inc., Nueva York, 1983, pp. 19-49.
21. Terpstra, A. H. M. y Sánchez-Muniz, F. J.: *Atherosclerosis*, 39, 217-227, 1981.
22. Terpstra, A. H. M., Woodward, C. J. H. y Sánchez-Muniz, F. J.: *Anal. Biochem.*, 111, 149-157, 1981.
23. West, C. E., Beynen, A. C., Scholz, K. E., Terpstra, A. H. M., Schutte, J. B., Deuring, K. y Van Gils, L. G. M.: *J. Nutr.*, 114, 17-25, 1984.

