

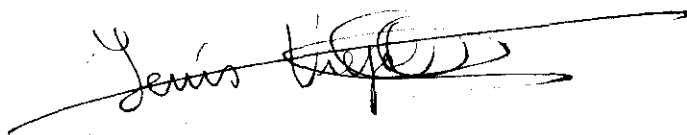
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA I
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

*"UTILIZACION DE SARDINAS FRITAS EN ACEITE DE OLIVA EN EL
TRATAMIENTO DE HIPERCOLESTEROLEMIA EXPERIMENTAL
INDUCIDA POR DIETA"*

JESUS M^a VIEJO GONZALEZ
1992

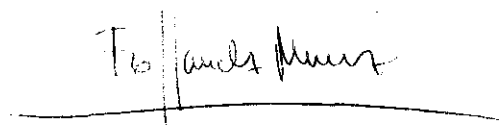
Memoria presentada por D. Jesús M' Viejo González, aspirante al grado de Doctor en Farmacia.

"UTILIZACION DE SARDINAS FRITAS EN ACEITE DE OLIVA EN EL TRATAMIENTO DE HIPERCOLESTEROLEMIA EXPERIMENTAL INDUCIDA POR DIETA"

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jesús Viejo', with a long horizontal line extending to the right.

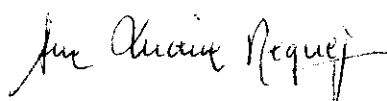
Fdo. Jesús María Viejo González,
aspirante al Grado de Doctor en Farmacia

DIRECTOR:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Francisco Sánchez-Muniz', with a horizontal line underneath.

Fdo. Dr Francisco Jose Sánchez-Muniz

V^o B^a DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ana María Requejo', with a horizontal line underneath.

Fdo. Dra Ana María Requejo Marcos

Deseo expresar mi agradecimiento a:

Al doctor D. Francisco José Sánchez-Muniz, director de esta tesis, pero ante todo un amigo que ha sabido transmitirme su entusiasmo por la investigación.

A las doctoras D' Ana M' Requejo, directora del Departamento de Nutrición y Bromatología I (U.C.M.) y D' Pilar Navarro, directora del Instituto de Nutrición y Bromatología (C.S.I.C.) por su apoyo.

A la doctora Codoceo, del Hospital "La Paz", a Santiago Torrado y al departamento de Galenica, ya que sin su colaboración hubiese sido imposible algunas determinaciones que aparecen en esta memoria.

A Lorenzo del Departamento de Tecnología e Higiene de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria por su colaboración imprescindible en la preparación de las dietas.

A Feliciano por su ayuda en las fases más delicadas de esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a: Enrique, Elena, Carmen, Sara Lopez, Ruth, Pablo, Sara Bastida, Mari Luz, Ana, Teresa, Eva y Laura.

A Marta y Prado, alumnas del Master de Nutrición, por su inestimable ayuda.

A todos gracias.

Esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología I (U.C.M.) y en el Instituto de Nutrición y Bromatología (C.S.I.C.), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040-MADRID; y financiada en su totalidad por los proyectos: n° PA85-0124 de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT) y n° ALI88-0696 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT).

A MI FAMILIA

ABREVIATURAS

- PUFA: ácidos grasos poliinsaturados.
- C.E.A.: coeficiente de eficacia alimentaria.
- P.E.R.: coeficiente de eficacia proteica.
- L.C.A.T.: lecitin colesterol acil-transferasa.
- A.C.A.T.: acil coenzima A acil-transferasa.
- H.D.L.: lipoproteínas de alta densidad.
- H.D.L._n: H.D.L. naciente.
- H.D.L._{1,2,3,c}: otros subtipos de H.D.L.
- V.L.D.L.: lipoproteínas de muy baja densidad.
- L.D.L.: lipoproteínas de baja densidad.
- I.D.L.: lipoproteínas de densidad intermedia.
- E.P.A.: ácido eicosapentaenoico.
- D.H.A.: ácido docosahexaenoico.
- Apo: apoproteínas.
- HMG CoA: hidroximetilglutaril coenzima A
- HMG CoA reductasa: hidroximetilglutaril coenzima A reductasa.
- PC: fosfatidil-colina.
- Met: metionina.
- Cys: cistina.
- Gly: glicina.
- CySH: cisteína.
- Glu: glutatión.
- S-ADO-Met: S-adenosil-metionina.
- HCySH: homocisteína.
- S-ADO-HCySH: S-adenosil-homocisteína.
- PGE₂: prostaglandina E₂.
- 7 α -OH-CHOL: 7 α -hidroxicolesterol.

INDICE

	<u>pág.</u>
1.REVISION BIBLIOGRAFICA.....	6
1.1.Introducción.....	7
1.2.Papel del hígado en el metabolismo lipídico y lipoproteico. Esterificación del colesterol hepático. Componentes grasos hepáticos.....	9
1.2.1.Metabolismo lipoproteico.....	9
1.2.2.Colesterol.....	14
1.2.2.1.Síntesis.....	14
1.2.2.2.Esterificación.....	15
1.2.2.3.Formación de sales biliares.....	16
1.2.3.Componentes grasos hepáticos.....	17
1.3.Influencia de diferentes tipos de proteína sobre el metabolismo lipídico.....	22
1.3.1.Influencia de la composición aminoacídica de las proteínas sobre el metabolismo lipídico.....	25
1.4.Influencia de los diferentes tipos de ácidos grasos sobre el metabolismo lipídico.....	29
1.4.1.Acidos grasos saturados.....	29
1.4.2.Acidos grasos monoinsaturados.....	31
1.4.3.Acidos grasos poliinsaturados.....	32
1.4.3.1.Acidos grasos poliinsaturados de la familia n-6.....	33
1.4.3.2.Acidos grasos poliinsaturados de la familia n-3.....	34
1.4.3.2.a.Principales dife- entre los ácidos Eicosapentaenoico (20:5, n-3), Docosahexaenoico (22:6, n-3) y Linolénico (18:3, n-3).....	38

	<u>pág.</u>
1.4.3.3.Principales diferencias entre los ácidos grasos poliinsaturados de las familias n-3 y n-6.....	39
1.5.Dietas hipercolesterolemiantes.....	40
1.5.1.Efectos del colesterol dietario sobre los ácidos grasos.....	41
1.6.Modificaciones en el alimento y en las grasas culinarias con el proceso de fritura. Influencia de su consumo sobre la colesterolemia y tamaño de hígado.....	43
2.OBJETIVOS.....	46
3.MATERIAL Y METODOS.....	49
3.1.Diseño experimental.....	50
3.1.1.Animales e instalaciones.....	50
3.1.2.Dietas.....	50
3.1.3.Desarrollo de la experiencia.....	51
3.1.3.1.Experiencia A.....	51
3.1.3.2.Experiencia B.....	52
3.1.3.3.Experiencia C.....	53
3.1.4.Parámetros controlados.....	54
3.2.Técnicas analíticas.....	55
3.2.1.Humedad.....	55
3.2.2.Proteínas de las dietas.....	55
3.2.3.Lípidos totales.....	55
3.2.4.Cromatografía en capa fina (T.L.C.).....	57
3.2.5.Cromatografía gaseosa.....	58
3.2.5.1.Obtención de ésteres metílicos...	58
3.2.5.2.Determinación de ácidos grasos...	60
3.2.6.Separación de las lipoproteínas.....	60

	<u>pág.</u>
3.2.7.Otros parámetros lipídicos.....	61
3.3.6.1.Determinación del colesterol total.....	61
3.3.6.2.Determinación del colesterol libre.....	62
3.3.6.3.Determinación del colesterol esterificado.....	62
3.3.6.4.Determinación de fosfolípidos....	62
3.3.6.5.Determinación de triglicéridos...	62
3.3.6.6.Control de calidad.....	62
3.2.8.Determinación de los ácidos biliares.....	63
3.3.Indices utilizados.....	63
3.4.Método estadístico.....	63
4.RESULTADOS.....	64
4.1.Expresión de los resultados.....	65
5.DISCUSION DE RESULTADOS.....	170
5.1.Experiencia A: "Caracterización de la hi- percolesterolemia inducida por dieta con- teniendo caseína más aceite de oliva más colesterol. Factores hepáticos relaciona- dos".....	171
5.1.1.Ingesta.....	171
5.1.2.Crecimiento.....	171
5.1.3.Peso de hígado, composición porcen- tual e índice relativo hepatosomático....	172
5.1.4.Componentes grasos del hígado.....	173
5.1.5.Composición en ácidos grasos totales hepáticos.....	174
5.1.6.Composición en ácidos grasos de tri- glicéridos, fosfolípidos y colesterol esterificado hepáticos.....	176
5.1.7.Variaciones sobre los lípidos plas- máticos.....	177

	<u>pág.</u>
5.1.8.Efectos sobre las lipoproteínas.....	178
5.2.Experiencia B: "Efecto preventivo y/o curativo de dietas conteniendo sardinas fritas en aceite de oliva sobre la hipercolesterolemia inducida por dietas suplementadas con colesterol".....	181
5.2.1.Ingesta.....	181
5.2.2.Crecimiento.....	182
5.2.3.Peso de hígado, composición porcentual e índice relativo hepatosomático....	182
5.2.4.Componentes grasos del hígado.....	183
5.2.5.Composición en ácidos grasos totales hepáticos.....	184
5.2.6.Composición en ácidos grasos del colesterol esterificado hepático.....	185
5.2.7.Variaciones sobre los lípidos plasmáticos.....	186
5.2.8.Efectos sobre tejido adiposo y bazo.....	191
5.2.9.Efectos sobre la excreción total de heces y su contenido de grasa, colesterol y sales biliares.....	192
5.3.Experiencia C: "Efecto diferencial de la proteína y de los ácidos grasos de las sardinas fritas en aceite de oliva sobre ratas hipercolesterolémicas".....	196
5.3.1.Ingesta.....	196
5.3.2.Crecimiento.....	196
5.3.3.Peso de hígado, composición porcentual e índice relativo hepatosomático....	197
5.3.4.Componentes grasos del hígado.....	197
5.3.5.Composición en ácidos grasos totales hepáticos.....	198
5.3.6.Composición en ácidos grasos de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol esterificado hepáticos.....	199
5.3.7.Variaciones sobre los lípidos plas-	

	<u>pág.</u>
máticos.....	201
5.3.8.Efectos sobre las lipoproteínas.....	201
5.3.8.1.Efectos sobre las V.L.D.L.....	201
5.3.8.2.Efectos sobre las L.D.L.....	203
5.3.8.3.Efectos sobre las H.D.L.....	204
5.3.8.4.Distribución de los lípidos en las diferentes lipoproteí- nas.....	205
6.RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	207
7.BIBLIOGRAFIA.....	214

1. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1.1. INTRODUCCION

La incidencia o severidad de lipemia, hipertensión, accidentes cerebrovasculares, enfermedad isquémica coronaria, artritis reumatoide, cáncer, entre otros, son tópicos favoritos en la investigación relacionada con la ingesta de diferentes tipos de ácidos grasos (Lands, 1886; Kremer y Robinson, 1991; Weber y Leaf, 1991). La manipulación dietaria de mezclas de ácidos grasos modifica la composición de los fosfolípidos en todos los sistemas de membranas celulares del cuerpo y altera el tipo de eicosanoides (tromboxanos, prostaciclina, hidroperoxiácidos, leucotrienos, etc.) producidos en muchos tejidos (Spielmann, 1989; Lin y Conner, 1990; Viejo y Sánchez-Muniz, 1990).

En muchas ocasiones el consumo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-6 puede ser excesivo y dar lugar a una sobresaturación en los tejidos de ácido araquidónico, que acentuaría la producción de eicosanoides en respuesta a estímulos normales y facilitaría o exacerbaría el crecimiento de tumores, la artritis y la trombosis (Lands, 1986; Kinsella, 1987; Simopoulos y col., 1991).

Por otra parte, los PUFA n-3 aparecen como mucho más potentes hipotrigliceridémiantes que los aceites vegetales, reducen la síntesis de tromboxanos sin disminuir la síntesis global de prostaciclina, mejoran el tono cardiovascular, inducen potente acción antiagregatoria y vasodilatadora (Von Schacky y col., 1985; Sánchez-Muniz, 1987), reducen la producción de PGE₂ y por tanto el crecimiento de ciertos tumores. Su transformación por la vía de la 5-lipoxigenasa (Sánchez-Muniz, 1987) los convierte en leucotrienos, hidroxiácidos y peroxiácidos con importante papel en el asma, accidentes cerebrovasculares y cardiovasculares, psoriasis, inflamación, etc. (Lands 1986; Nestel, 1991; Allen, 1991).

Estos efectos dramáticos de los ácidos grasos PUFA n-3 reclaman estudios sistemáticos sobre un correcto nivel en la dieta. A este respecto la mayoría de los estudios con PUFA n-3 se han llevado a cabo con concentrados de pescado (Shouten y Beynen, 1986; Kinsella, 1987; Kinsella y col., 1990; Flaten y col. 1990) difícilmente extrapolables por su excesiva cantidad a la realidad de una dieta, incluso rica en pescados, como es la mediterránea o en particular la española (Instituto Nacional de Estadística, 1985). Además, muchos estudios realizados con pescados azules no tienen en cuenta que, tanto la cantidad como la calidad de los ácidos grasos del pescado, pueden afectarse profundamente durante los períodos reproductivos (estacionalidad), zonas de bancos de pesca de donde proceden, así como por el procesado tanto industrial como culinario al que son sometidos previamente a su consumo.

Según una encuesta del Instituto Nacional de Estadística y el Instituto de Nutrición (Instituto Nacional de Estadística, 1985), España ocupa entre las naciones de la CEE una de las primeras posiciones en el consumo de pescado (72 g/cabeza/día), siendo el de pescado azul de 11 g y en particular el de sardinas

de 6,6 g. Es de suponer dada la costumbre de consumir pescado frito en España y en particular en la zona olivarera-mediterránea, que el pescado que se consume, en gran porcentaje, sea frito.

Esta tesis doctoral, como se comentará en el apartado nº 2: "OBJETIVOS", intenta profundizar en el estudio de la utilidad de un pescado azul -procesado culinariamente mediante fritura en baño de aceite de oliva- en el tratamiento de la hipercolesterolemia inducida por dieta.

Estudios previos realizados en nuestro departamento (Medina, 1986; Sánchez-Muniz y col., 1990) señalan que en frituras repetidas de sardinas se produce una alteración significativamente más elevada en la grasa culinaria cuando se utiliza manteca de cerdo o aceite de girasol que cuando se emplea aceite de oliva, habiendo indicado Morton (1977) que el alimento "limpia" el aceite cuando se frie. Por tanto, se ha evitado en esta memoria la utilización repetida del aceite para freír sardinas, habiéndose seleccionado al aceite de oliva como grasa culinaria.

1.2. PAPEL DEL HIGADO EN EL METABOLISMO LIPIDICO Y LIPOPROTEICO. ESTERIFICACION DEL COLESTEROL HEPATICO. COMPONENTES GRASOS HEPATICOS.

1.2.1. METABOLISMO LIPOPROTEICO.

Los lípidos son unas sustancias que tienen como propiedad común el ser solubles en solventes orgánicos y pobremente solubles en agua. Por esta última razón, no pueden circular libremente por la sangre y para poder hacerlo tienen que unirse a proteínas formando agregados que se conocen con el nombre de lipoproteínas.

Estas lipoproteínas se clasifican según su densidad de flotación en:

- 1.) Quilomicrones.
- 2.) V.L.D.L.: lipoproteínas de muy baja densidad.
- 3.) L.D.L.: lipoproteínas de baja densidad.
- 4.) H.D.L.: lipoproteínas de alta densidad.

Los quilomicrones vehiculizan los lípidos de origen alimentario, siendo su función principal la de transportar ácidos grasos a los puntos donde deben ser utilizados o almacenados. Se forman en el intestino a partir de los ácidos grasos y el colesterol dietarios, los cuales después de su absorción intestinal son reesterificados para formar triglicéridos y colesterol esterificado. Ambos tipos de lípidos se unen a la apoproteína B-48 sintetizada por el intestino (Kane y col., 1980), a varias apoproteínas apo-A y lípidos polares (fosfolípidos y colesterol) formando los quilomicrones. Estos quilomicrones pasan de linfa a sangre adquiriendo en este paso apo C y apo E de la H.D.L. (Havel y col., 1973; Green y col., 1979).

En la sangre, a su paso por el tejido adiposo y músculo, la lipoproteín-lipasa activada por la apo C-II cataliza la hidrólisis de los triglicéridos de los quilomicrones (Fielding y Havel, 1977), produciendo ácidos grasos libres, glicerol y residuos de quilomicrones (quilomicrones remanentes).

Las principales zonas del organismo en que existe lipoproteín-lipasa son tejido adiposo, músculo esquelético, miocardio y glándula mamaria. Probablemente la lipoproteín-lipasa de diversos tejidos no son idénticas (Fielding, 1976; Fielding y col. 1977) y muestran diferentes constantes de afinidad aparente. La lipoproteín-lipasa de corazón y músculo esquelético puede hidrolizar triglicéridos aunque estos se encuentren a bajas concentraciones (Fielding, 1976). Tras una ingesta de grasas el enzima muscular estaría saturado y podría actuar la lipoproteín-lipasa del tejido adiposo de baja afinidad con funciones de almacenamiento.

Estos quilomicrones que pierden sus triglicéridos quedan con un exceso de material de superficie, pudiendo originar partículas con características semejantes a H.D.L. nacientes (Tall y col., 1977) o ser transferida a H.D.L., con formación de H.D.L.₂ (Patsh

y col., 1978).

Los quilomicrones remanentes pueden ser rápidamente captados de la circulación por receptores hepáticos y de otras células, que reconocen las apo E de la superficie de dichas partículas (Canela y Cooper, 1979; Hui y col., 1981; Hui y col., 1981).

Los componentes lipídicos de las remanentes pueden volver a sangre desde el hígado incorporandolos a otras lipoproteínas (Sherrill y col., 1980).

Según Kane y col. (1980) las V.L.D.L. son sintetizadas mayoritariamente en el hígado, a partir principalmente de apo B-100 (de síntesis hepática) y de ácidos grasos. Estos ácidos grasos pueden tener varios orígenes:

-Ácidos grasos no esterificados que llegan al hígado vehiculizados por la albúmina plasmática y proceden de la dieta o de la lipólisis en los adipocitos.

-Ácidos grasos de triglicéridos de H.D.L.

-Ácidos grasos, especialmente saturados, sintetizados de novo a partir de acetato.

Los ácidos grasos no secretados al plasma en forma de lipoproteínas serán oxidados a dióxido de carbono y cuerpos cetónicos.

Los triglicéridos sintetizados en el hígado son almacenados con fosfolípidos, colesterol y apolipoproteínas y secretados como V.L.D.L. en la circulación (Janero y col., 1984).

Higgins y Fieldsend (1987) han detallado el papel del aparato de Golgi y retículo endoplásmico en la formación, empaquetamiento y secreción de las V.L.D.L. por el hígado. También describen la participación de sistemas enzimáticos en la formación de los fosfolípidos de estas V.L.D.L.

Después de su secreción las V.L.D.L. nacientes adquieren apoproteínas. En este proceso de maduración las H.D.L. aportan apo C para que las V.L.D.L. sean degradables (Chajek y Eisenberg, 1978) y contribuye a la esterificación del colesterol de las partículas V.L.D.L. (Nestel y col., 1979). Este último proceso ocurre por un intercambio de colesterol y ésteres de colesterol interviniendo el enzima Lecitín-Colesterol-Acil-Transferasa (LCAT), el complejo de transferencia de ésteres de colesterol (Ha y col., 1981) y la proteína transportadora de triglicéridos (Rajaram y col., 1980). En la rata, no existen estos complejos y, por lo tanto, existe un menor intercambio de lípidos entre las H.D.L. y las V.L.D.L. (Barter y Lally, 1978).

A continuación se citan algunos aspectos importantes de la adquisición de apoproteínas en el metabolismo de las V.L.D.L. hepáticas en la rata:

-Cofactores de la LCAT (Soutar y col., 1975).

-Regulación de la estimulación de la lipólisis de triglicéridos con la adición de apo C-II (LaRosa y col., 1970; Breckenridge

y col., 1978).

-Inhibición del aclaramiento hepático prematuro de V.L.D.L. sin degradar con la apo C-III (Kraus y col., 1973; Shelburne y col., 1980; Wang y col., 1985). Así, la actividad de la lipoproteín-lipasa sobre las partículas V.L.D.L. parece depender de la relación apo C-II/apo C-III de la misma (Carlson y Ballantyne, 1976).

-Aclaramiento hepático de V.L.D.L. mermadas en triglicéridos y apo C (V.L.D.L. remanentes) por un receptor hepático que reconoce la apo E (Sherill y Dietschy, 1977). Las V.L.D.L. normales no interaccionan con los receptores apo B,E específicos (Gianturco y col., 1983) presente en la mayoría de las células. Probablemente, la apo E presente en la V.L.D.L. impide la expresión de los determinantes de unión a receptores de la apo B (Bradley y col., 1984). La apo C actuaría de forma similar sobre los determinantes de unión de apo E. Shelburne y col. (1980) comprobaron que la presencia de apo C impedía la unión de la partícula a receptores específicos. De esta manera, las V.L.D.L., tras la hidrólisis de sus triglicéridos y transferida su apo C, podría interaccionar con los receptores hepáticos apo E completando su transformación en L.D.L., con pérdida de apo E y liberación de los determinantes de unión de la apo B (Bradley y col., 1984), por lo que las L.D.L. se podrían unir a los receptores que reconocen la apo B (Anderson y col. 1976).

En plasma las V.L.D.L. pueden seguir dos vías metabólicas dependiendo de su tamaño. Así las V.L.D.L. de gran tamaño son atacadas por la lipoproteín-lipasa, dando residuos o remanentes de V.L.D.L. que posteriormente serían captadas por el hígado y catabolizadas. Estas V.L.D.L. no darían lugar a la formación de L.D.L.

Sin embargo, las V.L.D.L. de menor tamaño que principalmente proceden del hígado conducen a la formación de L.D.L.

En el proceso de transformación de las V.L.D.L. en L.D.L (Gómez, 1988) interviene la lipoproteín-lipasa endotelial degradando los triglicéridos a ácidos grasos libres, en este proceso interviene la apo C-II como cofactor. Durante este proceso de degradación el exceso de material de superficie de la V.L.D.L. es transferido a la H.D.L. Al disminuir más rápidamente el contenido de apo C-II que de apo C-III llega un momento en el que la V.L.D.L. ya no es degradable por la lipoproteín-lipasa. Esta V.L.D.L. residual recibe el nombre de I.D.L. (Streja y col., 1977). La I.D.L. contiene cantidades reducidas de triglicéridos y conserva la mayor parte de la apo E inicialmente presente en la V.L.D.L. La vida media de la I.D.L. es muy corta, siendo transformada en L.D.L. por degradación de sus triglicéridos y eliminación de la apo E. En la transformación de I.D.L. en L.D.L. parecen intervenir dos vías; por una parte una vía hepática receptor dependiente (apo E, apo B,E) (Brown y col., 1983), y por otra una vía extrahepática. Lo que si parece seguro, en la intervención de la triglicérido-lipasa hepática en este último proceso (Rubinstein y col., 1985).

Uno de los aspectos que más diferencian el metabolismo

lipoproteico en el hombre y en la rata es la formación de L.D.L. Así en humanos la mayor parte de las V.L.D.L., sino toda, es convertida en L.D.L. (Smith y col., 1978), permaneciendo la apo B-100 en el complejo lipoproteico durante su transformación. En la rata, la apo B es aclarada de la circulación por las células hepáticas. La velocidad de desaparición es muy rápida y solo el 10% de apo B aparece en I.D.L. y posteriormente en L.D.L. Esto explicaría los bajos niveles de L.D.L. que se encuentran en rata y que contribuyen a que este animal sea resistente a la hipercolesterolemia.

Se ha señalado la síntesis directa de L.D.L. por el hígado en animales alimentados con colesterol (Dolphin, 1981) y en pacientes hipercolesterolémicos (Kissebah y col., 1984), situación no descrita en animales normales (Guo y col., 1982).

En el hombre, las L.D.L. son las mayores transportadoras de colesterol hacia los tejidos (Parks y Bullock, 1987), los cuales captan dichas lipoproteínas en virtud de mecanismos específicos dependientes de un receptor apo B-100-apo E o mediante pinocitosis (Brown y Goldstein, 1984).

Mediante el mecanismo de captación específico de las L.D.L. se regula la síntesis endógena de colesterol, se activa el enzima acil-colesterol-acil-transferasa y se regula la síntesis de receptores específicos para L.D.L. (Brown y Goldstein, 1984), a estos aspectos nos referiremos más adelante.

Las H.D.L. son las lipoproteínas más pequeñas y constituyen un grupo muy heterogéneo de partículas. Son lipoproteínas muy ricas en apoproteínas, siendo la más abundante la apo A-I.

Las H.D.L. intervienen en el transporte inverso del colesterol (Miller y Miller, 1975; Van Tol, 1989), ya que, transportan el colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para su excreción o degradación en forma de ácidos biliares. Además, el aclaramiento de triglicéridos del plasma esta relacionado con los niveles plasmáticos de H.D.L. (Kekki, 1980).

Según Alpers y col. (1985), en hígado e intestino delgado se producen las H.D.L. nacientes o inmaduras, pobres en ésteres de colesterol. Posteriormente estas H.D.L. nacientes alcanzan los depósitos tisulares de colesterol y por influencia del enzima LCAT este colesterol es esterificado y situado en el centro de las H.D.L., formando las H.D.L. maduras.

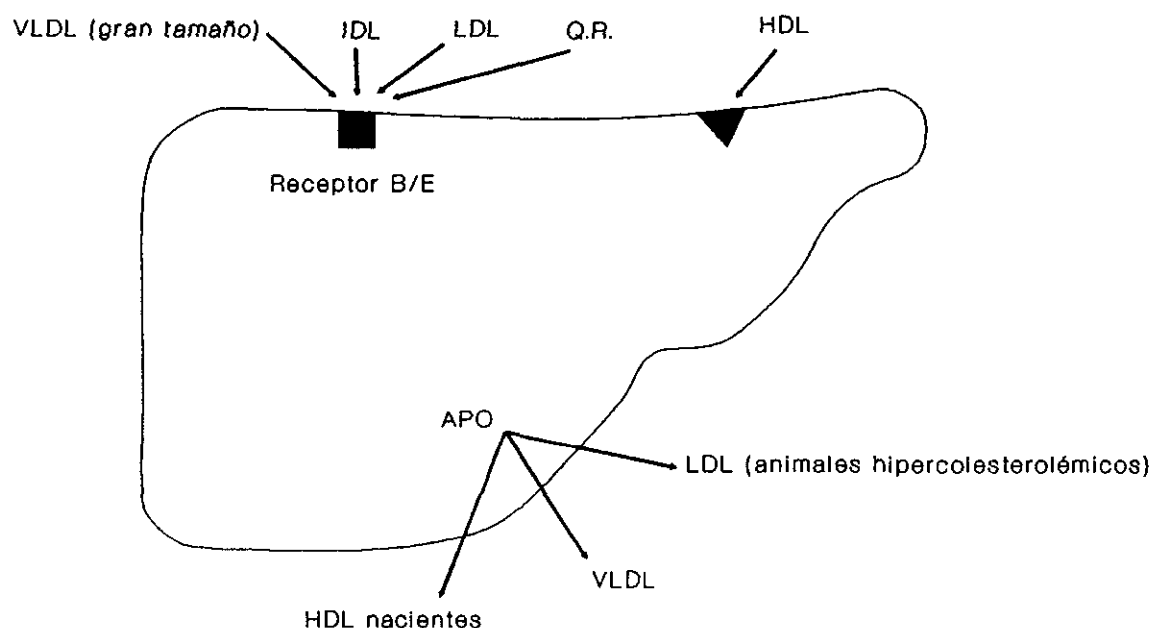
Es decir, en este proceso las H.D.L. captarán colesterol de las membranas celulares y del interior de determinadas células, intercambiando lípidos y apoproteínas con otras lipoproteínas. Las H.D.L. irán disminuyendo progresivamente en densidad y tomarán las formas que se han denominado como H.D.L._n, H.D.L.₃, H.D.L.₂ y H.D.L.₁ (Nichols y col., 1981).

Schmitz y col. (1985) demostraron que las H.D.L. que contienen apo A-I son capaces de unirse a receptores de macrófagos y otros tipos de células. Tras su unión a receptores, las

H.D.L. serían internalizadas mediante un sistema que no interacciona con lisosomas, captando colesterol no esterificado del citoplasma celular y resecretadas como una forma de H.D.L. más rica en colesterol. La expresión celular de este tipo de receptores estaría regulada por su contenido en colesterol.

Tabas y Tall (1984) sugiere que la captación de colesterol por las H.D.L. es un proceso en parte relacionado con las características fisicoquímicas de estas partículas y en parte con el receptor de apo A-I antes mencionado. Este proceso de captación parece quedar restringido a las formas menos densas de H.D.L. (H.D.L._n y H.D.L.₃), mientras que las formas menos densas interaccionan preferentemente con las otras lipoproteínas (Oram y col., 1981).

PAPEL ESQUEMATICO DEL HIGADO EN EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEINAS



Finalmente, las H.D.L. cargadas de colesterol (H.D.L.₂ y H.D.L.₁) serían eliminadas por el hígado en un proceso que parece ser receptor dependiente. No está claro, si este proceso de eliminación se realiza por reconocimiento de la apo E o depende de receptores hepáticos específicos para apo A-I (Rifici y Eder 1984).

En resumen, el hígado es el mayor lugar de catabolismo de los ésteres de colesterol y de los fosfolípidos de las H.D.L. y otras lipoproteínas (Stein y col., 1983).

El hígado es, por lo tanto, primordial en el metabolismo del colesterol. Por un lado, capta quilomicrones remanentes, V.L.D.L., I.D.L., L.D.L. y H.D.L. y, por otro, sintetiza coles-

terol y otros lípidos. La síntesis de colesterol endógena depende entre otros factores del colesterol dietario, aspecto al que nos referiremos en el punto siguiente.

1.2.2. COLESTEROL.

Como se ha descrito en el apartado anterior, el hígado juega un papel vital en la eliminación del colesterol sérico al captar por diferentes mecanismos las lipoproteínas plasmáticas.

Una vez el colesterol en el hígado puede ser esterificado o puede emplearse en la producción de ácidos biliares. Además en el hígado puede ocurrir la síntesis de colesterol o su reutilización para la síntesis de V.L.D.L. y H.D.L. como ya se ha descrito.

1.2.2.1. SÍNTESIS.

En el animal maduro el hígado es el lugar más activo en la biosíntesis del colesterol.

En 3 grupos de reacciones puede resumirse la colesterogénesis:

- 1.) Conversión del acetyl coenzima A (Co A) en β -hidroxi-metilglutaril-coenzima A (HMG Co A). Los intermediarios en esta reacción derivan del acetyl Co A y de la oxidación de los ácidos grasos. El paso determinante en la biosíntesis del colesterol es la reducción del HMG Co A a mevalonato por acción de la HMG CoA reductasa.
- 2.) Conversión de mevalonato en escualeno. Una pequeña cantidad de mevalonato puede ser convertido mediante un mecanismo desconocido en ácidos grasos y dióxido de carbono (Edmond y Popjak, 1974).
- 3.) Conversión de escualeno en colesterol. Estas reacciones son catalizadas por enzimas ligados a membranas. En este último paso proteínas transportadoras de esteroides aceleran el proceso al facilitar la solubilización de estos esteroides en el citosol (Zakim, 1982).

Varios son los factores descritos que pueden regular la síntesis hepática de colesterol. Algunos de estos factores se resumen en el cuadro adjunto. De entre todos estos factores destacaremos, por el planteamiento experimental de esta memoria: el colesterol, los ácidos grasos y la presencia de sales biliares en las dietas.

Así según Gould y col. (1959), el colesterol libre celular es un regulador directo de la biosíntesis de colesterol.

Por otro lado, Goh y Heimberg (1977) describen que los ácidos grasos libres estimulan la actividad de HMG-CoA-reductasa en hígado perfundido. Esto puede ser explicado por el efecto de los mismos en la secreción de V.L.D.L., ya que el colesterol libre es necesario para la formación de estas lipoproteínas. Así

el aumento en la secreción de V.L.D.L. aumenta las pérdidas de colesterol por las células y hay en compensación un incremento en la síntesis del mismo.

FACTORES QUE REGULAN LA SINTESIS HEPATICA DE COLESTEROL. (BORTZ, 1973).

AUMENTAN LA SINTESIS

- Colestiramina.
- Alimentación grasa.
- Infusión de ácidos grasos.
- Corticosteroides.
- Agentes adrenérgicos.
- Glucagón.

DISMINUYEN LA SINTESIS

- Alimentación con colesterol.
- Alimentación con ácidos biliares.
- Clofibrato.
- Acido nicotínico.
- Inhibidores de la síntesis de proteínas.

Finalmente, las sales biliares alimentarias disminuyen la biosíntesis de colesterol en el hígado (Beher y Baker, 1958).

Las sales biliares son un producto catabólico del colesterol y su síntesis está sujeta a control tipo feedback negativo (Shefer y col., 1969). Así, el aumento del retorno de sales biliares al hígado disminuye el catabolismo del colesterol.

Las sales biliares, por otro lado, inhiben la HMG-CoA-reductasa (Hamprecht y col., 1971). Aunque los datos obtenidos in vivo (Nervi y Diettschy, 1978) y en hígados perfundidos (Cooper, 1976) sugieren que esto no sucede en el hígado intacto y que la mayor parte de los efectos de las sales biliares en la síntesis de colesterol pueden ser debidos a otros aspectos de la homeostasis del mismo, por ejemplo en su absorción.

1.2.2.2. ESTERIFICACION.

La presencia de colesterol esterificado en el hígado parece ser controlada por el enzima Acil Coenzima A-colesterol Acil Transferasa (A.C.A.T.), que contribuiría a disminuir el incremento de colesterol sérico.

Según Eisenberg y Levi (1976) la formación de ésteres de colesterol está relacionada con el aclaramiento del exceso de colesterol libre y lecitina del suero.

Norum y col. (1983) opinan que la variación en la disponibilidad de colesterol libre regula la actividad del enzima A.C.A.T.

La regulación de este enzima ha sido estudiada en diversidad de tejidos, incluyendo hígado de rata y humano (Goodman y col., 1964; Spector y col., 1979; Erickson y Cooper, 1980 y Erickson y col., 1980). Este enzima se localiza originariamente

en el retículo endoplásmico, y de forma más abundante en el retículo rugoso.

La reacción enzimática utiliza colesterol libre de la membrana y acil Co A de ácidos grasos para obtener ésteres de colesterol y Coenzima A libre. Este enzima tiene preferencia por ciertos ácidos grasos. El orden de preferencia en la rata es oleato >palmitato >estearato >linoleato. Esto determina la composición de los ésteres de colesterol formados in vivo (Zakim, 1982).

Parece que sólo una determinada cantidad, quizá el 4%, del colesterol en el retículo endoplásmico está disponible para la esterificación por el enzima. A pesar de todo, parece ser que cambios en la cantidad de colesterol en las membranas pueden ser importantes para determinar la cantidad de colesterol que puede ser esterificado.

Este enzima responde a la manipulación dietética, así se observa aumento en la actividad del mismo después de alimentación con colesterol o ayuno.

La hidrólisis de los ésteres de colesterol es catalizada por dos enzimas: uno encontrado en lisosomas que hidroliza los ésteres de colesterol que llegan al hígado como componentes de las lipoproteínas y que se denomina colesterol estearasa lisosomal o ácida, requiere un pH óptimo de acción bajo y puede ser además capaz de hidrolizar triglicéridos y posiblemente fosfolípidos (Deykin y Goodman, 1962). El otro enzima, asociado a membrana, hidroliza los ésteres de colesterol formados por la reacción catalizada por la A.C.A.T., con un pH óptimo de acción neutro.

1.2.2.3.FORMACION DE SALES BILIARES.

Otros dos procesos importantes en el metabolismo del colesterol se realizan únicamente en el hígado:

- La síntesis de sales biliares, que es la mayor vía catabólica de esteroides.
- La eliminación de colesterol con la secreción directa del mismo en la bilis.

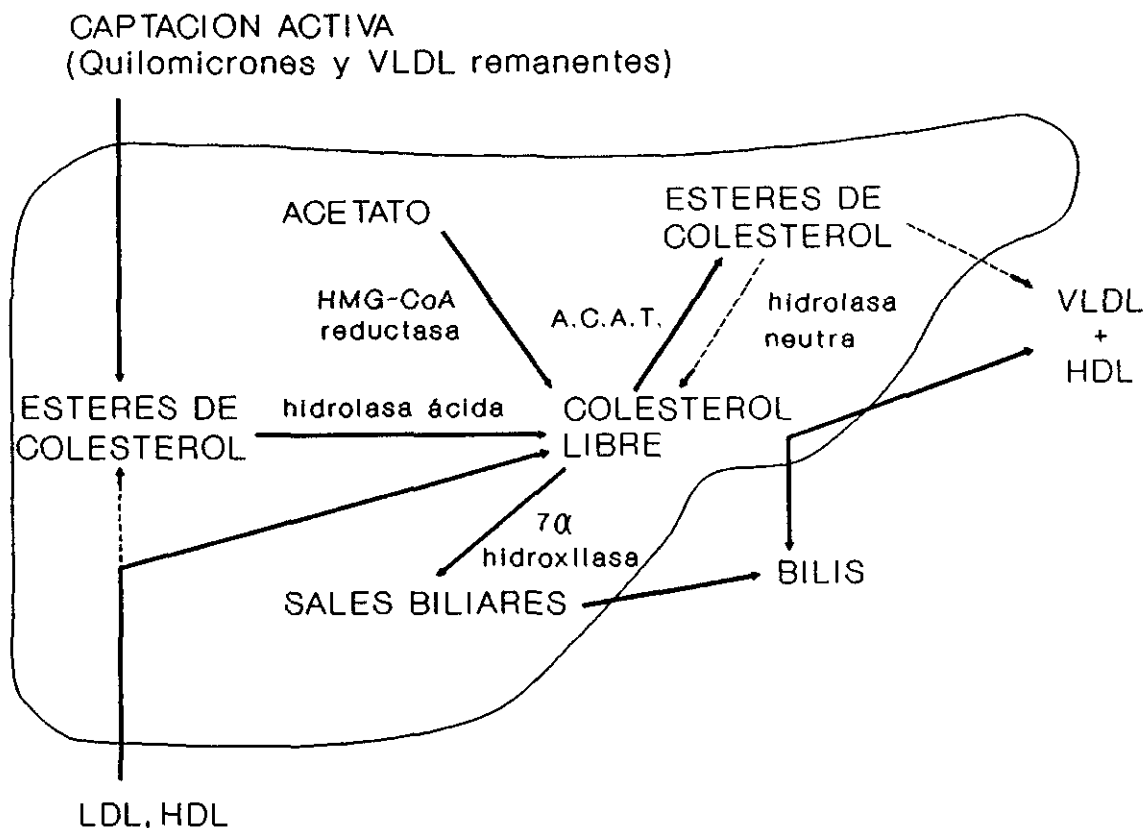
Según Slater y col. (1980) para la producción de ácidos biliares el hígado utiliza principalmente el colesterol sintetizado de "novo" por el mismo y el que le llega vía sanguínea vehiculizado por las L.D.L.

El paso inicial en la síntesis de las sales biliares es la formación del 7 α -hidroxicolesterol a partir de colesterol. Esto es seguido de epimerización del grupo 3 β -hidroxilo a la posición 12, si es el ácido cólico el que va a ser sintetizado (Shefer y col., 1970).

La 7 α -hidroxilación del colesterol no es solamente el primer paso, sino que es también el paso limitante del proceso.

Existen otras primeras etapas en el proceso, aunque la 7α -hidroxilación parece ser la prioritaria, Elliot y Hyde (1971).

HOMEOSTASIA DEL COLESTEROL HEPATICO.



El más importante y bien establecido factor de regulación de la 7α -hidroxilación es la circulación enterohepática de las sales biliares. Mosbach (1972) y Myant y Mitropoulos (1977) indican que la eliminación de sales biliares desde el hígado, por fístula del conducto biliar o por alimentación con colestiramina, origina un aumento en la actividad de colesterol 7α -hidroxilasa y consecuentemente un incremento en la síntesis de sales biliares. La restauración del retorno de sales biliares suprime la actividad enzimática y la síntesis de ácidos biliares. El aumento puede ser prevenido con inhibidores de la síntesis de proteínas sugiriendo que este incremento requiere la formación de nueva proteína enzimática.

1.2.3. COMPONENTES GRASOS HEPATICOS.

La composición grasa hepática va a ser un fiel reflejo del estado nutritivo y metabólico del individuo.

Como hemos visto más detalladamente en el apartado 1.2.1., el hígado captará principalmente los quilomicrones remanentes

procedentes del metabolismo de los quilomicrones formados en el intestino y las L.D.L. procedentes del metabolismo de las V.L.D.L. sintetizadas por los hepatocitos.

Además, otras funciones del hígado en el metabolismo de los lípidos son:

-Desdoblamiento de los ácidos grasos para obtener energía. Estos ácidos grasos provienen de la hidrólisis de los triglicéridos del tejido adiposo cuando se activa la lipasa sensible a hormonas en diferentes situaciones metabólicas.

-Síntesis de triglicéridos a partir de carbohidratos y en menor proporción a partir de las proteínas. Esto sólo ocurre cuando la ingesta de estos nutrientes es superior a sus necesidades por parte del organismo. Los triglicéridos así formados son liberados en el tejido adiposo por acción de la lipoproteín-lipasa.

-Síntesis de colesterol y fosfolípidos a partir de los ácidos grasos.

Resumiendo lo anterior podemos concluir que son dos las principales fuentes de la grasa hepática: el tejido adiposo y la grasa dietaria que tras su digestión dará origen a los quilomicrones.

Según Zakim (1982) entre el hígado y el tejido adiposo existe un intercambio continuo de ácidos grasos. El balance entre el almacenaje de triglicéridos en el hígado y en el tejido adiposo se desvía fácilmente hacia la transferencia neta desde el último al primero.

Hay tres hechos que se relacionan con esto. El primero es que la captación hepática de ácidos grasos desde la sangre es una función de su concentración. Cuando se incrementa la presencia de ácidos grasos en la sangre el hígado recoge más ácidos grasos.

El segundo es que el hígado puede oxidar o reesterificar estos ácidos grasos, pero probablemente la capacidad de oxidación por el hígado de ácidos grasos es limitada pero no así la capacidad de esterificación.

La tercera razón es la capacidad limitada del hígado para secretar triglicéridos en forma de V.L.D.L.. Así, defectos en la síntesis de V.L.D.L. pueden conducir a un hígado graso (Farber, 1967), aspecto que ha sido constatado con el uso de agentes que interfieren en la síntesis de proteínas, como la etionina, o en la unión de los componentes de las V.L.D.L., como el ácido orótico (Roheim y col., 1965). En este punto también podrían intervenir los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3, ya que uno de sus posibles efectos, como veremos con posterioridad, es inhibir la secreción de V.L.D.L.

Por otro lado, la dieta va a influir cuantitativa y cualitativamente en la composición grasa del hígado.

Cuantitativamente veremos en el apartado 1.5. que dietas con alta proporción de colesterol aumentan los niveles de lí-

pidos en el hígado, especialmente de colesterol esterificado.

En cuanto al aspecto cualitativo, la distinta composición en ácidos grasos de la grasa dietaria va a tener su reflejo en una diferente proporción de dichos ácidos grasos en las distintas fracciones lipídicas del hígado (Bernadier, 1988; Hwang y col., 1988).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto comentaremos los trabajos que nos han parecido más relevantes, donde se relaciona composición de la grasa dietaria y los niveles de los diferentes lípidos hepáticos.

Harwood y Geyer (1975) encuentran que los valores lipídicos hepáticos de ratas expresados en mg/g de tejido fresco después de 15 semanas de alimentación con diferentes dietas oscilaba para lípidos totales entre un mínimo de $35,2 \pm 0,7$ con dietas libres de grasa a un máximo de $48,0 \pm 1,6$ con dietas conteniendo sebo de vaca. Los ésteres de colesterol variaron entre $4,7 \pm 0,5$ en ratas alimentadas con dietas con aceite de maíz y $7,5 \pm 0,6$ para las que recibían en su dieta sebo de vaca. Por último, los fosfolípidos variaron entre $25,8 \pm 1,1$ en los animales que no recibieron grasa en su dieta y $38,8 \pm 1,0$ para los que ingirieron sebo de vaca.

Los mismos autores después de 20 semanas encuentran que los valores más bajos para lípidos totales, ésteres de colesterol y fosfolípidos, también en mg/g de tejido fresco, correspondían a los hígados de los animales que no recibieron grasa en su dieta: $37,2 \pm 1,0$, $2,5 \pm 0,2$ y $25,2 \pm 0,7$ respectivamente; mientras que, los valores más elevados se encontraron en los animales alimentados con aceite de maíz en lípidos totales y ésteres de colesterol: $58,1 \pm 2,2$ y $3,9 \pm 0,4$ respectivamente o con aceite de semilla de soja para los fosfolípidos: $31,5 \pm 0,8$.

Bochenek y Rodgers (1978) en ratas Sprague-Dawley alimentadas con dietas conteniendo 24,5% de proteína, 4,2% de grasa (sin colesterol) y 49,7% de carbohidratos obtienen unos valores de lípidos expresados en mg en el total hepático de:

- Lípidos totales: 320 ± 74 .
- Colesterol total: $28 \pm 4,2$.
- Esteres de colesterol: $9,4 \pm 4,6$.
- Fosfolípidos: 246 ± 76 .

De este mismo trabajo referimos a continuación el porcentaje de los ácidos grasos mayoritarios de las distintas fracciones lipídicas hepáticas:

- En fosfolípidos: $34,3 \pm 3,6\%$ (palmítico), $38,7 \pm 3,7\%$ (esteárico), $9,6 \pm 0,7\%$ (oleico) y $9,9 \pm 2,4\%$ (linoléico).
- En ésteres de colesterol: $40,3 \pm 7,8\%$ (palmítico), $26,6 \pm 1,2\%$ (esteárico), $25,2 \pm 9,6\%$ (oleico) y $2,6 \pm 2,4\%$ (linoléico).
- En triglicéridos: $58,6 \pm 4,0\%$ (palmítico), $8,1 \pm 2,0\%$ (esteárico), $25,6 \pm 4,3\%$ (oleico) y $1,8 \pm 2,3\%$ (linoléico).

Llama la atención que a pesar de ser la composición de la dieta en ácidos grasos la siguiente: 16,0% (palmítico), 4,2%

(esteárico), 24,4% (oleico) y 48,2% (linoléico); en ninguna de las anteriores fracciones lipídicas comentadas el ácido linoléico fuera el más abundante.

Eklund y Sjöblom (1980) en ratas que recibían dietas que diferían en la fuente proteica encuentran unos valores en hígado fresco comprendidos entre $4,8 \pm 0,2\%$ y $6,5 \pm 0,7\%$ de lípidos totales, salvo en el caso de que la fuente proteica de la dieta procediera del plasma, en cuyo caso los valores fueron de $13,9 \pm 1,7\%$.

Quazi y col. (1983) observan en ratas Wistar alimentadas con dietas conteniendo un 20% de caseína, 71,95% de sacarosa y 2,0% de aceite de maíz los siguientes valores: $7,18 \pm 0,29$ mg/g de colesterol, $67,8 \pm 2,6\%$ mg/g de lípidos totales, $19,6 \pm 4,3$ mg/g de fosfolípidos y $40,1 \pm 4,0$ mg/g de triglicéridos.

Imaizumi y col. (1983) alimentando ratas Wistar con dietas que contenían un 20% de caseína y 10% de aceite de semilla de soja señalan en mg/g de hígado los siguientes valores: $7.3 \pm 1,2$ de triglicéridos, $2,97 \pm 0,12$ de colesterol y $39,6 \pm 0,57$ de fosfolípidos.

Sirtori y col. (1984) en ratas Sprague-Dawley alimentadas con dietas estándar de laboratorio encuentran en hígado niveles de colesterol libre de $1,7 \pm 0,1$ mg/g y de ésteres de colesterol de $0,5 \pm 0,1$ mg/g.

Eklund y Sjöblom (1986) en ratas Sprague-Dawley ingiriendo dietas con un 20% de caseína, un 10% de aceite de oliva y sin colesterol obtienen los siguientes niveles en mg/g de hígado seco: $17,8 \pm 0,4$ de lípidos totales, $14,3 \pm 0,6$ de colesterol total y $6,1 \pm 0,2$ de colesterol libre; los cuales fueron ligeramente más bajos que los obtenidos en el caso de dietas con un 20% de proteína de semilla de soja y 10% de aceite de oliva.

Analizando en detalle estos 2 últimos trabajos, vemos que la proporción de ésteres de colesterol respecto al colesterol total es muy diferente. Esto probablemente es debido a que, como indica Beynen (1988), el aceite de oliva promovería la esterificación del colesterol y su acúmulo en el hígado. Esto es otro ejemplo de como diferentes tipos de dietas pueden alterar la composición grasa del hígado.

Bernadier (1988) con dietas con un 20% de caseína:lactoalbumina (proporción 1:1), 65% de almidón de maíz y un 5% de aceite de maíz o de coco encontró los siguientes valores en mg/g:

- Lípidos totales: 43 ± 2 (maíz) y 50 ± 3 (coco).
- Colesterol: $2,4 \pm 0,2$ (maíz) y $2,0 \pm 0,1$ (coco).
- Fosfolípidos: 28 ± 1 (maíz) y 31 ± 1 (coco).

En este mismo trabajo al estudiar los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos hepáticos encontraron los valores que se resumen en el cuadro adjunto:

ACIDO GRASO

% EN FOSFOLIPIDOS HEPATICOS

	ACEITE DE MAIZ	ACEITE DE COCO
Palmitico	15,16	15,44
Palmitoleico	0,7	2,26
Esteárico	20,78	22,01
Oleico	7,17	12,02
Linoléico	14,38	7,98
Linolénico	0,41	0,35
Araquidónico	29,36	18,01
Eicosapentaenoico	2,14	2,24
Docosahexaenoico	3,53	6,64

Hwang y col. (1988) encuentran como la diferente composición en ácidos grasos de la dieta se refleja en una diferente composición de dichos ácidos grasos en los lípidos hepáticos. En este caso, al estudiar la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos hepáticos entre 6 grupos de ratas Sprague-Dawley, 3 de los cuales ingerían cantidades crecientes de ácido linolénico y los otros 3 cantidades crecientes de concentrado de aceite de pescado, se pueden observar las siguientes diferencias:

-Menor proporción de ácidos linolénico y araquidónico en el grupo alimentado con dietas que contienen el concentrado de aceite de pescado.

-Mayor proporción de ácido docosahexaenoico en las ratas que ingieren el concentrado de aceite de pescado.

Estos datos difieren marcadamente de los obtenidos en ratas controles que consumían dietas con 8% de aceite de coco hidrogenado y 2% de aceite de cártamo, donde los principales ácidos grasos en orden de mayor a menor concentración fueron: araquidónico, esteárico, oleico y linoleico.

Lakshman y col. (1988) obtienen en ratas Wistar-Furth alimentadas con dietas con un 40% en grasa (mezcla de aceite de hígado de bacalao, aceite de maíz y aceite de oliva), 36% de dextromaltosa, 20% de proteína y el resto carbohidratos unos valores hepáticos de colesterol de 158 ± 41 mg/100 g de tejido y de 211 ± 102 mg/100 g de tejido.

1.3. INFLUENCIA DE DIFERENTES TIPOS DE PROTEINA SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO.

Son numerosos los trabajos en animales donde se pone de manifiesto que dietas con alto contenido de caseína son capaces de producir hipercolesterolemia y aterosclerosis, mientras que otras conteniendo soja no lo hacen (Kritchevsky, 1979; Carroll, 1982; Huff y col., 1982; Beynen y col. 1983; Quazi y col., 1984; Nagaoka y col., 1986). Los resultados en humanos son menos claros y abundantes, si bien, se han señalado ligeras modificaciones en la colesterolemia y en el perfil lipoproteico (Wolfe y col., 1981; Van Raaij y col. 1982).

Los mecanismos propuestos para explicar los efectos hipercolesterolemiantes y ateroscleróticos de la caseína frente a la proteína de soja se relacionan con la disminución en la excreción de ácidos biliares y esteroides neutros en heces de animales alimentados con caseína (Nagata y col., 1981; Huff y Carroll, 1980a; Beynen y col., 1986; Yamashita y col., 1990).

Sin embargo, es difícil explicar si los efectos ocurren en el intestino o después de la absorción.

Beynen y col. (1986) y Beynen (1990) han propuesto que al remplazar la proteína de soja por caseína tiene lugar un incremento del flujo de colesterol y ácidos biliares del intestino al hígado. Esto causa un incremento en la concentración de colesterol en el hígado, ya que la captación hepática del colesterol de los quilomicrones remanentes está aumentada y la conversión de colesterol en ácidos biliares deprimida (Kritchevsky y col., 1975).

Ante esto el hígado responde incrementando la salida de colesterol y/o disminuyendo el número de receptores para LDL, e inhibiendo la síntesis "de novo" de colesterol.

El primero y el segundo efecto producen un aumento del colesterol sérico. La concentración de L.D.L en suero se eleva hasta un nivel en el que el catabolismo de L.D.L iguala su producción. En esta nueva situación metabólica la síntesis de colesterol hepático se deprime y la captación intestinal de colesterol y ácidos biliares se estimula. Por tanto, el aumento en la absorción desde el intestino de estas dos sustancias puede ser la llave para explicar los efectos de la caseína sobre los niveles de colesterol sérico.

Para explicar esta estimulación de la absorción intestinal originada por la ingesta de caseína se han propuesto dos teorías.

En la primera se señala que la caseína es más digestible que la proteína de soja, por lo que la parte no digerida de esta última se uniría a los ácidos biliares y esteroides neutros reduciendo su absorción. Este concepto coincide con experimentos "in vitro" (Sklan y col. 1979) y con los resultados obtenidos por Roy y Schneeman (1981) en los que ratones alimentados con caseína tenían menores cantidades de nitrógeno y ácidos biliares en su

intestino que los animales alimentados con proteína de soja. Sugano y col. (1990) aislaron una fracción de alto peso molecular de la proteína de soja que estimulaba la secreción fecal de ácidos biliares y esteroides neutros y que era más hipocolesterolemianta que la proteína intacta. Hay evidencias indirectas que esta fracción, que es un péptido hidrofóbico, puede ligarse a los ácidos biliares en el intestino. Sin embargo, esta fracción es rica en saponinas (Sugano y col., 1990), lo que puede contribuir a su efecto hipocolesterolemianta.

La segunda teoría para explicar la mayor absorción de esteroides de las dietas con caseína respecto a las que contienen proteína de soja, es la diferente fosforilación de estas 2 proteínas (Van Der Meer y col., 1985).

La caseína, respecto a la proteína de soja, es una proteína altamente fosforilada, cerca del 40% de los residuos de serina están esterificados con fosfato. La caseína y los fosfopéptidos derivados liberan el calcio de los sedimentos intestinales de fosfato cálcico solubilizando el fosfato, y reduciendo así el número de posibles uniones de este sedimento con los ácidos biliares, por lo que aumenta la concentración de estos ácidos en forma libre y, por lo tanto, su absorción. El problema de esta teoría es que sólo se puede aplicar a la caseína y no a otras proteínas que no tienen alta fosforilación pero incrementan los niveles plasmáticos de colesterol.

Sin embargo, a pesar de lo indicado hasta ahora, no existe una evidencia directa de que la caseína aumente la absorción de los ácidos biliares. Saeki y Kiriyawa (1990) demostraron que ni la yeyuotomía ni la ileotomía en ratas afectaba los niveles de colesterol plasmático comparando la caseína frente a la proteína de soja. Eso puede excluir que la interacción entre la proteína dietaria y los esteroides intestinales sea la responsable de los efectos sobre la colesterolemia.

Por otro lado, los trabajos de otros grupos de investigadores señalan un efecto postabsortivo de la caseína respecto a la proteína de soja que pudiera ser el primer paso que originara posteriormente la diferente excreción de ácidos biliares y esteroides neutros.

Para Nagata y col(1981) el tipo de proteína dietaria puede afectar los niveles de apoproteínas séricas. Así, Tanaka y col. (1983) observaron en ratas alimentadas con soja frente a otras que recibían caseína una disminución de la secreción de apo A-I por el hígado.

Roberts y col., (1981) indicaron que la disminución del colesterol sérico en conejos alimentados con soja frente a los alimentados con caseína puede ser el resultado de la composición y metabolismo de las diferentes apoproteínas.

Sánchez y col (1990) y Hubbard y Sánchez (1990) encontraron que la caseína respecto a la proteína de soja incrementa la relación insulina:glucagón, pero este efecto no se relaciona

fácilmente con el efecto sobre el colesterol.

Huang y col. (1990) describieron que la caseína inhibe la delta-5-desaturasa respecto a la proteína de soja, pero no se conoce si es un efecto o una causa de los cambios producidos en el colesterol plasmático.

Otros autores sugieren que la regulación de la colesterolemia por diferentes proteínas dietarias ocurre por la modificación de los enzimas hepáticos y de los receptores lipoproteicos. Chao y col. (1982a) mostraron que dietas enriquecidas en caseína pueden deprimir marcadamente la actividad de receptores en preparados de membranas hepáticas de conejo. Estos descubrimientos fueron confirmados posteriormente en hígado perfundido (Chao y col., 1982b). El enriquecimiento del colesterol hepático inducido por caseína conduce a una marcada reducción en los receptores de alta afinidad hepáticos por β -V.L.D.L., acompañado por un declive en la actividad de la HMG-CoA-reductasa y activación de la colesterol 7 α -hidrolasa y ACAT (Sirtori y col., 1984).

Lovati y col. (1987) mostraron que la ingesta de proteína de soja en la dieta incrementa la actividad de los receptores de L.D.L. y células monoclonales en pacientes hipercolesterolémicos.

En resumen, la disminución en la excreción de ácidos biliares y esteroides neutros en heces de animales alimentados con caseína respecto a la proteína de soja es la llave para explicar el efecto hipercolesterolemiante de la caseína. Sin embargo, este efecto no se deberá exclusivamente a este mecanismo, pues estudios con otros tipos de proteínas, entre ellas la de arroz, mostraron una excreción fecal de ácidos biliares y esteroides neutros elevada, pero con niveles plasmáticos de colesterol también altos (Yoshida y col., 1990; Sautier y col. 1990). Es muy posible, que los efectos se deban a una combinación de los mecanismos hasta ahora mencionados.

En relación a la proteína de pescado, a diferencia de otras proteínas de origen animal, puede tener efectos menos marcados sobre la colesterolemia. Así Eklund y Sjöblom, (1980); Kritchevsky y col. (1982) y Jacques y col., (1986) indican en ratas que la proteína de pescado mantiene más bajos los niveles de colesterol sérico que la caseína.

Terpstra y col. (1983) señalan efectos diferentes entre la caseína y mezcla de proteínas compuesta por caseína, proteína de pescado y gelatina. Los animales alimentados con esta última dieta no modifican su colesterol frente a basales, mientras que los alimentados con caseína lo aumentan de forma significativa.

En el trabajo de Jacques y col. (1986) se observa que en las dietas sin colesterol los valores más altos de colesterol total sérico se obtuvieron en ratas alimentadas con caseína (89,8 \pm 7,8 mg/dl), carne de vaca (91,1 \pm 6,3 mg/dl) y avena (95,6 \pm 4,7 mg/dl); mientras que los valores más bajos aparecen en las alimentadas con gluten de trigo (76,6 \pm 3,2 mg/dl), colza

(73,9±3,2 mg/dl), guisante (70,1±4,1 mg/dl) y soja (73,7±2,3 mg/dl). En las ratas alimentadas con proteína de pescado los valores fueron intermedios (82,5±3,5 mg/dl).

Cuando se estudiaron dietas suplementadas con colesterol se observó unos valores más altos de colesterol en caseína (313±17 mg/dl), seguido de soja (241±15 mg/dl), carne de vaca (233±11 mg/dl) y avena (225±11 mg/dl), mientras que los más bajos aparecen en las proteínas de pescado (188±20 mg/dl), guisante (180±11 mg/dl), colza (167±17 mg/dl) y gluten de trigo (163±16 mg/dl).

1.3.1. INFLUENCIA DE LA COMPOSICION AMINOACIDICA DE LAS PROTEINAS SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO.

Los efectos colesterolemiantes de los diferentes tipos de proteínas se han relacionado con su composición aminoacídica, su estructura y, como ya hemos comentado, con los grupos fosfato unidos a la misma (Van Der Meer y col., 1985).

Diferentes autores sugieren una relación entre el efecto hipocolesterolemiantes de la proteína de soja y su composición en aminoácidos.

Para Kritchesvsky y col. (1982) y Sugano y col. (1984) la elevada relación del cociente arginina/lisina de la proteína de semilla de soja puede estimular la actividad de la arginasa hepática (Cittadini y col., 1964) pudiendo lentamente disminuir la formación de apolipoproteínas transportadoras de colesterol reduciendo la colesterolemia. Así, Eklund y Sjöblom (1980) observan una correlación negativa entre la arginina dietaria y el contenido de VLDL + LDL del suero. También, Sautier y col. (1990) encontraron una relación negativa entre el contenido de arginina de la dieta y los niveles plasmáticos de colesterol.

Otros autores con la adición de arginina a la caseína obtienen niveles de colesterol más bajo en conejos (Kritchevsky, 1979; Kritchevsky y col., 1982); y en ratas (Vahouny y col., 1984).

Vahouny y col. (1985) mostraron que la suplementación de una dieta de caseína con arginina originaba una reducción de los lípidos ($d < 1,006$) en suero y una elevación de la 7 α -hidroxilasa hepática.

Sánchez y col. (1987) sugirieron que la caída del colesterol plasmático debida puede ser causada por un incremento en la arginina plasmática, originando un incremento en el glucagón y disminuyendo la actividad HMG-CoA reductasa hepática.

Sugano y col. (1982) señalaron que la adición de arginina a las dietas incrementaba los niveles de glucagón y apo E, ya que habría más arginina disponible para la incorporación en la apo E, o bien, la arginina podría disminuir el turnover de la apo E.

Katan y col. (1982), sin embargo, no observan disminución en los niveles de colesterol añadiendo arginina a una dieta de caseína, pero sí con la adición de glicina, por lo que los efectos hipocolesterolemiantes de la soja podrían ser atribuidos a la alta cantidad de glicina de esta proteína.

Huff y Carrol (1980b) encuentran una correlación positiva entre la relación aminoácidos esenciales/aminoácidos no esenciales de varias fuentes proteicas dietarias, animales o vegetales, con los niveles de colesterol en plasma.

Jacques y col. (1986) encuentran una correlación positiva entre los niveles de colesterol total plasmático de ratas alimentadas con dietas ricas en colesterol y el contenido de tirosina o la relación leucina/isoleucina. Esta correlación es más alta con los productos de digestión de las fuentes proteicas que con las mismas fuentes proteicas intactas. Esto sugiere que la liberación de tirosina o de la relación leucina/isoleucina de las proteínas dietarias durante la digestión puede jugar, directa o indirectamente, un papel en el control del metabolismo del colesterol.

Barth y col. (1990) indican que la caseína dietaria respecto a la proteína de soja, decrece la concentración sérica de tiroxina, y esto teóricamente explicaría la disminución de la síntesis hepática de colesterol, incremento de la salida de colesterol en las lipoproteínas, descenso del número de receptores hepáticos para apo B/E y descenso de la síntesis hepática de ácidos biliares y consecuentemente una disminución de la excreción fecal de los mismos. Sin embargo, esta teoría no aclararía como estos cambios plasmáticos de tiroxina podrían explicar el incremento de la absorción del colesterol en animales alimentados con caseína y ni si todos los cambios ocurridos en el metabolismo del colesterol podrían ser debidos a las pequeñas fluctuaciones de la tiroxina en plasma.

Huff y Carrol (1980b) y Sugano y col. (1982) sugirieron que los aminoácidos o péptidos liberados durante la digestión de la proteína tienen un efecto estimulante de la secreción de hormonas como: insulina, glucagón, tiroxina y catecolaminas; que están involucradas en el metabolismo del colesterol, pudiendo activar enzimas como la HMG-CoA reductasa (Edwards, 1973).

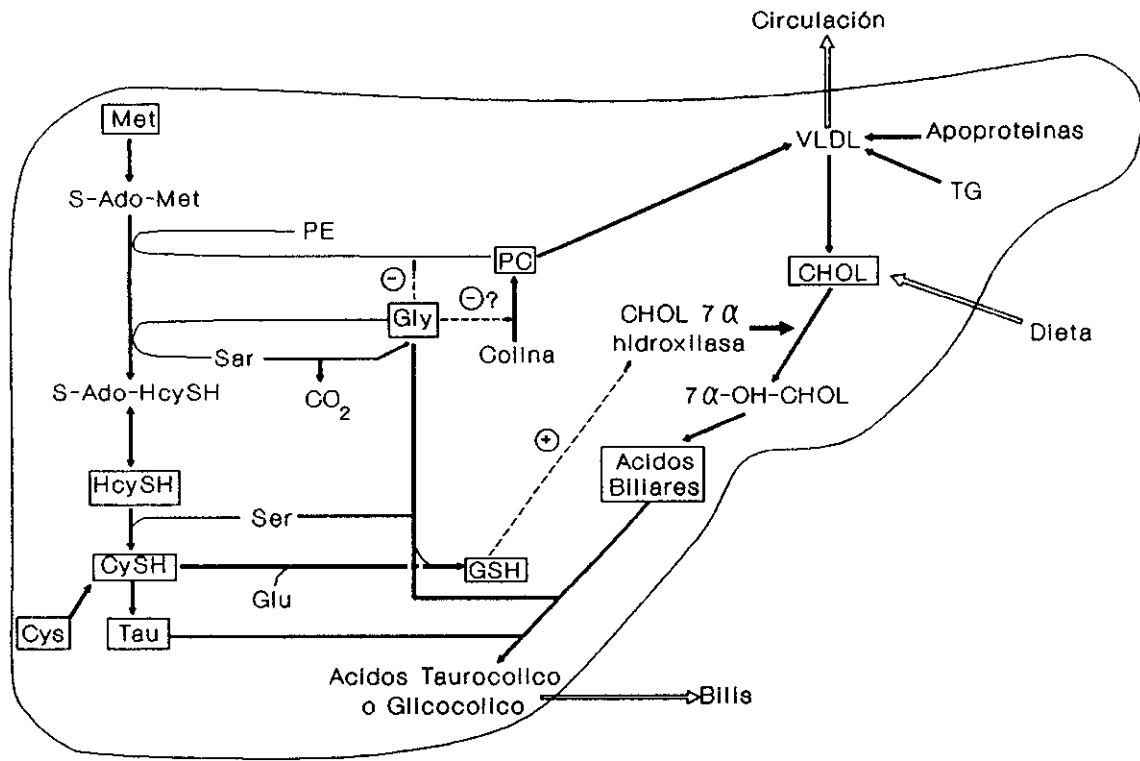
Huff y col., (1977) observan propiedades reductoras de los niveles de colesterol en hidrolizados con tripsina de proteína de soja pero no con la correspondiente mezcla de aminoácidos. Esto es probablemente debido al diferente orden de liberación de péptidos y aminoácidos durante la digestión.

En relación a la metionina, se ha descrito que la adición de este aminoácido a dietas con caseína originaba hipercolesterolemia en conejos (Terpstra y col., 1983) y en ratas (Yagasaki y col., 1986).

Muramatsu y Sugiyawa (1990) han descrito una posible relación entre el metabolismo de la metionina y del colesterol

en los hígados de ratas alimentadas con dietas enriquecidas en colesterol (esquema adjunto).

POSIBLE RELACION ENTRE EL METABOLISMO DE LA METIONINA, CISTINA Y TAURINA Y EL METABOLISMO DEL COLESTEROL EN EL HIGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON COLESTEROL.



La metionina (Met) dietaria estimularía la síntesis de fosfatidil colina (PC) a través de la N-metilación de la fosfatidil-etanol-amina (PE) (Zeisel, 1981). Ya que la fosfatidil colina es el fosfolípido mayoritario en las lipoproteínas plasmáticas, esta molécula sería necesaria para la secreción de las V.L.D.L. por las células hepáticas (Vance y Vance, 1985; Yao y Vance, 1988). Por lo tanto, es posible que la metionina dietaria incremente los niveles plasmáticos de colesterol al aumentar la síntesis de PC. Aunque Vance y col. (1986) demostraron que la PC obtenida por esta vía (N-metilación de PE) no es utilizada para la secreción de lipoproteínas por los hepatocitos de la rata, esto no excluye la posibilidad de que cantidades relativamente altas de metionina en la dieta estimulen la síntesis de PC, por lo que aumentaría la concentración de este fosfolípido facilitando que la PC obtenida a partir de colina se incorpore a las V.L.D.L.

Muramatsu y Sugiyawa (1990) también discutieron los efectos de la cistina (Cys) y la glicina (Gly) sobre el colesterol plasmático (esquema superior adjunto).

La cistina es convertida en cisteina (CySH) que puede incorporarse al glutatión (Glu) o metabolizarse hasta taurina (Tau), y ya que el glutatión es un estimulante de la actividad de la colesterol 7 α -hidroxilasa (Danielsson y col., 1984; Hassan y col., 1984) y la taurina participa en la conjugación de los ácidos biliares, esto podría explicar, al menos en parte, el efecto de la cistina disminuyendo los niveles plasmáticos de colesterol. También, la metionina podría ser metabolizada hasta cisteina y taurina, pero los efectos netos de la metionina originarían una elevación del colesterol plasmático.

En cuanto a la glicina, Muramatsu y Sugiyawa (1990) explican su efecto hipocolesterolemizante por 3 razones:

- Participaría en la conjugación con los ácidos biliares.
- La glicina podría aceptar el grupo metilo de la S-adenosilmetionina (S-Ado-Met), compitiendo con la fosfatidiletanol amina e inhibiendo la síntesis de fosfatidil colina.
- Por otro lado, ya que la glicina prevendría el incremento de colesterol plasmático provocado por dietas enriquecidas en colina (Sugiyawa y col., 1987), es posible que la glicina inhiba la síntesis de PC a través de la vía de la CPD-colina, aunque el mecanismo es desconocido.

Finalmente indicar, en lo que se refiere al contenido de aminoácidos, que la lisina y relación lisina/arginina es más alta en proteínas animales (caseína, pescado y carne de vaca), y que el contenido de tirosina es más alto en caseína y carne de vaca, mientras que la lisina es más abundante en la proteína de pescado.

1.4. INFLUENCIA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ACIDOS GRASOS SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO.

1.4.1. ACIDOS GRASOS SATURADOS.

Ya en 1957 Keys y col. (1957) indicaron la relación positiva entre la sustitución de hidratos de carbono por ácidos grasos saturados y el incremento de la colesterolemia. Estos mismos autores señalan que no todos los ácidos grasos saturados tienen el mismo efecto hipercolesterolemizante, asignando al ácido esteárico un papel neutral.

Bonanome y Grundy (1988) comparando el efecto de los ácidos esteárico, oleico y palmítico concluyeron que los dos primeros originaban igual descenso de los niveles séricos de colesterol al compararlos con el palmítico. Una posible explicación al diferente efecto de los ácidos palmítico y esteárico podría ser que este último ácido graso saturado es pobremente absorbido debido a su mayor insolubilidad. Sin embargo, Bonanome y Grundy (1988) en un estudio en humanos señalaron que una dieta rica en esteárico es bien absorbida. Según Grundy y Denke (1990) el efecto diferencial entre estos dos ácidos grasos saturados, se debería a que el ácido esteárico, al ser la desaturación un proceso muy rápido, es velozmente transformado en el organismo en ácido oleico, mientras que el ácido palmítico se podría acumular en los tejidos debido a que el proceso de elongación es un proceso lento.

En otros trabajos se indica que con la ingesta de grasas saturadas, con o sin la adición de colesterol, se induce una marcada hipercolesterolemia, asociada a elevados niveles de apo E en suero y la presencia de lipoproteínas anormales: β -V.L.D.L. y H.D.L._c en ratas (Swift y col., 1980), monos (Nicolasi y Hayes, 1980), perros (Mahley y col., 1974), conejos (Ross y Zilvermit, 1977) y cerdos (Chapman y col., 1977). En cambio, Durand y col. (1985) no encuentran correlación entre la colesterolemia y los ácidos grasos saturados de la dieta o del suero en ratas.

Mattson y Grundy (1985), Grundy y Vega (1988), Bonanome y Grundy (1988) indicaron que el incremento de las concentraciones séricas causadas por la ingesta de ácidos grasos saturados se debía al aumento de las L.D.L.

Las causas de este supuesto efecto hipercolesterolemizante de la grasa saturada no están aún muy claras. Así, Green y Green (1983) indican que la absorción de colesterol no está influenciada por la grasa saturada dietaria, por lo que este efecto hipercolesterolemizante se debería a otras causas, entre las que cabría destacar su influencia sobre el metabolismo lipoproteico. Estos mismos autores, indican que el metabolismo extrahepático de lipoproteínas difiere en las ratas alimentadas con dietas que contienen ácidos grasos de variada saturación.

La sustitución extrema de ácidos grasos saturados por

ácidos grasos poliinsaturados puede disminuir los niveles de H.D.L. en suero (Mattson y Grundy, 1985). De igual forma el remplazamiento isocalórico de ácidos grasos saturados por carbohidratos disminuye los niveles de H.D.L.-colesterol, efecto que no tiene lugar si se utilizan ácidos grasos monoinsaturados (Grundy, 1986). Con respecto a las L.D.L., sustituciones dietarias equivalentes de la grasa saturada provocarían un descenso de sus niveles (Mensink y Katan, 1987).

El mecanismo que relaciona el incremento de las L.D.L. con la ingesta de grasa saturada parece estar relacionado con una disminución de la síntesis de receptores hepáticos para apo B-100 de las L.D.L. (Brown y Goldstein, 1984; Shepherd y col. 1980; Nicolasi y col., 1990). Para estos autores la ingesta de estos ácidos grasos disminuiría la actividad del receptor de L.D.L.

Spady y Dietschy (1989) indicaron que la ingesta de estos ácidos grasos saturados reduce la eliminación de las L.D.L. via receptor.

Loscalzo y col. (1987) sugirieron que el enriquecimiento con ácidos grasos saturados de los fosfolípidos de membrana interfieren la función normal del receptor de L.D.L., probablemente reduciendo la unión o internalización de las L.D.L. circulantes.

Green y col. (1984) observan en ratas que los quilomicrones ricos en ácidos grasos saturados tienden a ser metabolizados más lentamente que los quilomicrones ricos en ácidos grasos poliinsaturados.

Estos mismos autores (Green y col., 1984) en ratas alimentadas con grasa saturada y colesterol respecto a otras que recibían ácidos grasos poliinsaturados y colesterol señalan un incremento de la trigliceridemia, consecuencia de una elevación de la producción hepática de V.L.D.L. ricas en triglicéridos. Estos autores sugieren que dicho incremento puede relacionarse con el menor aclaramiento de quilomicrones ricos en ácidos grasos saturados y colesterol.

Esta hipótesis estaría de acuerdo con la observación de Floren y Nilsson (1977) de que la alimentación con dietas ricas en ácidos grasos saturados y colesterol puede estar asociada a un incremento en la secreción de V.L.D.L. ricas en triglicéridos y colesterol por el hígado. Así, Spady y Dietschy (1989) observaron un incremento en la producción de L.D.L., aunque Sorci-Thomas y col. (1989) señalaron que una dieta rica en ácidos grasos saturados no incrementa la cantidad hepática de RNAm para Apo B en monos.

El incremento de triglicéridos plasmáticos observados en ratas después de la alimentación con grasa saturada y colesterol podría ser explicada según Parks y Rudel (1982) por una disminución de la lipoprotein-lipasa o/y por estar afectado el reconocimiento y aclaramiento de los quilomicrones y V.L.D.L. remanentes (Floren y Nilsson, 1977).

1.4.2.ACIDOS GRASOS MONOINSATURADOS.

Desde los trabajos de Keys y col. (1957) las grasas monoenoicas han sido consideradas como neutras respecto a sus efectos colesterolemiantes. La sustitución de forma isocalórica de carbohidratos por ácidos grasos monoinsaturados no tiene efectos sobre el colesterol sérico.

Sin embargo, muchos autores han olvidado que, obviamente, la sustitución en la dieta de grasas saturadas por monoinsaturadas causa un decremento en la colesterolemia y han utilizado el aceite de oliva (prototipo de grasa monoinsaturada) como dieta basal. Naturalmente si a una persona que consume una dieta diaria de 2700 Kcal sustituimos 3 gramos de grasa saturada por 3 gramos de aceite de oliva se conseguirá un descenso aproximado en los niveles de colesterol de 2,7 mg/dl, por término medio, y si la sustitución es en vez de 30 gramos de 30 gramos el descenso esperado en la colesterolemia sería de 27 mg/dl.

Más recientemente los efectos de las grasas de diferente composición en ácidos grasos sobre los niveles de H.D.L.-colesterol y L.D.L.-colesterol han sido estudiados por varios investigadores (Grundy, 1987; Nestel, 1987).

Varios autores han demostrado que las grasas monoinsaturadas, como el aceite de oliva, originan unos niveles de colesterol total sérico similares a los producidos por las grasas poliinsaturadas (Grundy, 1987; Oya y col., 1989; Mensink y col., 1989). Estos mismos estudios han indicado que tales grasas monoinsaturadas no descienden los niveles de H.D.L.-colesterol sino que incluso las puede aumentar.

El hallazgo más interesante del trabajo de Oya y col. (1989) es el aumento de los valores de H.D.L.-colesterol tanto a los dos como a los siete meses en los individuos que ingieren las dietas con aceite de oliva, disminuyendo el cociente colesterol total/H.D.L.-colesterol. Los niveles de apo B y A-I se modificaron de forma paralela a los cambios de L.D.L. y H.D.L.-colesterol respectivamente.

Esta es la razón que explica, según el profesor Grande (1989), el actual interés por el papel que juegan las grasas monoinsaturadas en general, y el aceite de oliva en particular, en la prevención de las enfermedades cardiovasculares.

Según Grundy (1987) el mayor efecto de los ácidos grasos monoinsaturados cuando sustituyen a los ácidos grasos saturados en la dieta es la disminución de los niveles de L.D.L.-colesterol. Esta respuesta puede ocurrir por uno o más de los tres mecanismos siguientes:

- a) Decreciendo la salida de V.L.D.L., el precursor de las L.D.L.
- b) Reduciendo el contenido de colesterol de las L.D.L.
- c) Incrementando la actividad de los receptores para L.D.L.

Esta última posibilidad parece ser la más probable, evitando la supresión de la actividad de los receptores para L.D.L.

por el consumo de grasas saturadas. El mecanismo debe ser pasivo, es decir no se estimularía la síntesis de los receptores, sino que aumentaría la actividad. Beynen (1988), a este respecto, indica que la disminución observada en ratas que consumen dietas con aceite de oliva en los niveles de colesterol libre hepático favorece la actividad de los receptores de L.D.L. del hígado, al ser esta la forma metabólicamente activa que inhibe el funcionamiento de dichos receptores. Hay que indicar que en experimentos a más largo plazo, tal y como indican Kritchevsky y col. citados en el trabajo de Beynen (1988), aparece un aumento de la concentración de colesterol libre hepático, debido probablemente a una capacidad limitada del hígado a almacenar ésteres de colesterol.

Beynen (1988) observa que dietas ricas en aceite de oliva provocan en ratas y conejos un incremento de la concentración de colesterol total hepático, aunque, como hemos visto disminuya el colesterol libre, lo que parece indicar que el aceite de oliva promueve la esterificación del colesterol hepático.

Con respecto a los lípidos plasmáticos, Cuesta y col. (1987) estudiando en ratas los efectos de dietas conteniendo aceite de oliva o una grasa sólida de características similares al aceite de palma sobre la lipemia y lipoproteinemia no encuentran variaciones significativas en el colesterol ni en los triglicéridos, pero si en la fosfolipemia y en el contenido en fosfolípidos en todas las lipoproteínas que fueron más bajos en el lote alimentado con la grasa sólida. El cociente colesterol total/fosfolípidos de este último lote señaló un mayor riesgo de aterogénesis.

En lo referente a los triglicéridos, Bonanome y Grundy (1988), Grundy y col. (1988) y Garg y col. (1988c) señalaron que dietas ricas en ácido oleico disminuían la concentración de triglicéridos al compararlas con dietas ricas en ácidos grasos saturados, por lo tanto, estas dietas podrían ser utilizadas en el control de la hipertrigliceridemia.

Uno de los campos de investigación más prometedores ha surgido de la hipótesis que el ácido oleico ejerce un papel sinérgico sobre el ácido eicosapentaenoico incrementando la captación de tal ácido graso por las células corporales y, por tanto, posiblemente sus efectos fisiológicos (Sanders, 1991).

1.4.3. ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS.

Keys y col. (1957) señalan a los ácidos grasos poliinsaturados como hipocolesterolemiantes. A esta misma conclusión llegan numerosos autores (Vega y col., 1982; Vessby y col., 1982; Ehnholm y col., 1984).

La reducción del colesterol producida por la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados ocurre a nivel de todas las lipoproteínas, descendiendo sobre todo los niveles de L.D.L.-colesterol, pero también de V.L.D.L. y H.D.L.-colesterol

(Shepherd, 1978).

Esta disminución de H.D.L.-colesterol ha sido descrita también por otros autores (Vessby y col., 1980). Esto originaría que la relación L.D.L.-colesterol/H.D.L.-colesterol no variará por lo que el supuesto efecto beneficioso desde el punto de vista de las enfermedades cardiovasculares probablemente es de menor cuantía. Hay que tener en cuenta que estos estudios se realizaron en periodos cortos de tiempo y con una ingesta excesiva y poco realista de ácidos grasos poliinsaturados. En estudios más largos e ingestas menos marcadas de estos ácidos grasos (Shwandt y col., 1982) obtienen un balance favorable entre L.D.L.-colesterol y H.D.L.-colesterol.

Por otro lado, Lock y col. (1983) sugieren que los bajos niveles de L.D.L.-colesterol obtenidos con la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados son protectores frente a la aterosclerosis a pesar de la disminución de las H.D.L.-colesterol.

Todos estos efectos de los ácidos grasos poliinsaturados discutidos hasta ahora sobre la colesterolemia y demás parámetros lipídicos, se han referido a la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados en general, si bien, hay que señalar que dependiendo de la familia de ácido graso que se trate, n-6 ó n-3, incluso, para distintos ácidos grasos dentro de la misma familia, los efectos van a ser muchas veces diferentes.

1.4.3.1. ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE LA FAMILIA N-6.

El ácido graso más estudiado de esta familia es el ácido linoléico (C 18:2 n-6) presente en muchos aceites vegetales como el de cártamo, el de maíz, el de soja o el de girasol.

El efecto de la ingesta de estos ácidos grasos sobre los niveles de lípidos hepáticos y de lipoproteínas plasmáticas ha sido estudiado por numerosos autores, no habiéndose obtenido siempre resultados equivalentes.

Así, Hostmark y col. (1982) encuentran en ratas alimentadas con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados n-6 disminución del colesterol plasmático, pero Rifkind (1983) observa un aumento del mismo, mientras que, Hostmark y col. (1980) no encuentran ningún efecto.

Con respecto a la concentración H.D.L.-colesterol, Hostmark y col. (1980) observan una disminución con dietas con un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados n-6.

Kris-Etherton y col. (1984) señalan que ratas alimentadas con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados n-6 tienen concentraciones más bajas de triglicéridos y presentan una mayor producción de H.D.L.-colesterol hepático, pero similares de H.D.L.-colesterol plasmático que ratas que recibían en su dieta aceite de oliva o de palma. Como el aclaramiento de lipoproteínas ricas en triglicéridos es proporcional a la concentración de

H.D.L. en plasma (Kekki, 1980), y esta concentración proporcional a la de apo C-II y C-III (Kashyap y col., 1983), un aumento en la producción de H.D.L. hepáticas puede explicar en parte el efecto hipotrigliceridemiante de los ácidos grasos poliinsaturados quizás debido a un aumento de la síntesis y secreción de apoproteínas C.

Por otro lado, la presencia de ácidos grasos poliinsaturados n-6 en las lipoproteínas puede influir en su metabolismo acelerando su captación. Así Gavigan y Knight (1981) observan que a mayor cantidad de linoleato en las L.D.L., mayor es su captación por los fibroblastos al compararlas con las L.D.L. conteniendo ácidos grasos más saturados.

Bochenek y Rodgers (1978) después de analizar varias posibilidades indican que el efecto hipocolesterolémico de las grasas insaturadas n-6 se debe a la redistribución del colesterol plasmático en los tejidos tisulares.

Según Vega y col. (1982) la sustitución de ácidos grasos saturados de la dieta por ácido linoleico conduce a una disminución paralela de L.D.L.-colesterol y del número de partículas de L.D.L., por lo que la hipótesis de Spritz y Mishkel (1969) en la que los ácidos grasos poliinsaturados excluyen estéricamente al colesterol de la partícula de L.D.L. no parece la más adecuada.

Estudios cinéticos de apo B-L.D.L. han señalado un efecto claro de los ácidos grasos poliinsaturados sobre el metabolismo de las L.D.L., particularmente a nivel de receptor para apo-B, lo cual conduce a una disminución sustancial de la concentración de L.D.L. plasmática (Spady y Dietschy, 1985).

1.4.3.2. ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE LA FAMILIA N-3.

Destacan dentro de esta familia, por su posible papel en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, el ácido docosahexaenoico (DHA, C 22:6 n-3) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, C 20:5 n-3), muy abundantes en los aceites de pescado.

Su consumo es beneficioso desde el punto de vista de la enfermedad cardiovascular por dos razones:

-Disminuyen la agregación plaquetaria, al interferir en el metabolismo de prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos (Lands, 1986; Sánchez-Muniz, 1987; Nestel, 1990; Kinsella y col., 1990; Simopoulos y col., 1991).

-Disminuyen los lípidos plasmáticos tanto en personas sanas como en hiperlipémicas y en diferentes animales de experimentación, como se indica en los trabajos de Huang y col. (1986), Sánchez-Muniz (1987), Nestel (1990); Kinsella y col. (1990); Simopoulos y col. (1991).

Estudiaremos en este apartado el efecto del consumo de n-3 sobre las diferentes fracciones lipídicas en hígado y plasma.

Efectos sobre lípidos hepáticos.

El contenido lipídico total hepático raramente es alterado con el consumo de aceite de pescado (Kinsella, 1987). En la revisión de este último autor solamente en el trabajo de Kobatake y col., (1983) se aprecia una reducción en los lípidos hepáticos en ratas alimentadas con dietas conteniendo un 5% de aceite de pescado frente a otras alimentadas con manteca de cerdo.

Efecto sobre los ácidos grasos hepáticos.

El consumo de aceite de pescado se acompaña generalmente de cambios en la composición de los ácidos grasos de los lípidos hepáticos. Así, se observan incremento en los niveles de ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico (De Escrijver y Privett, 1982; Bruckner y col., 1984; Iritani y Norita, 1984) y disminución en los de araquidónico (Iritani y Fujikawa, 1982; Bruckner y col. 1984; De Scrijver y Privett, 1982). En lo referente al ácido linoleico los resultados comentados por Kinsella (1987) son controvertidos.

La variación en la composición de los ácidos grasos en los lípidos hepáticos puede observarse muy rápidamente en ratas después de consumir 100g/Kg de aceite de arenque. Así, sólo después de un día se observaron incrementos marcados en la proporción en ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico en los ácidos grasos microsomales hepáticos (citado en la revisión de Kinsella, 1987).

Cuando ratas alimentadas durante 14 días con una dieta libre de grasa, recibieron posteriormente durante el mismo periodo una dieta conteniendo un 5% de aceite de pescado el nivel de $C_{20:3}$ n-6 en los fosfolípidos hepáticos disminuyó rápidamente, mientras que se incrementó la proporción de ácidos grasos poliinsaturados n-3. Dicho incremento se estabilizó a partir del cuarto día habiendo casi desaparecido el ácido graso $C_{20:3}$ n-6 después del sexto día de consumir pescado. Cuando el proceso dietario se invirtió los niveles de ácidos grasos, poliinsaturados n-3 cayeron más lentamente que antes habían incrementado, ya que en el sexto día de recibir de nuevo una dieta libre de grasa el valor de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 se encontraba en la mitad del valor máximo (Iritani y Norita, 1984).

Según Iritani y Fujikawa (1982), los niveles de ácidos grasos hepáticos parecen ser fisiológicamente importantes, permaneciendo la cantidad total de ácidos grasos con más de tres dobles enlaces a un nivel constante entre 31% y 35%, sea cual sea el tipo de dieta recidido. Este afectará sólo a la familia de ácidos grasos, obteniéndose en el caso de animales alimentados con dietas libres de grasas o con grasa hidrogenadas altos niveles de $C_{20:3}$ n-9, mientras que el contenido de n-3 se elevará cuando los animales reciban en su dieta grasa de pescado.

Efecto sobre los triglicéridos hepáticos.

Los efectos del consumo de aceite de pescado sobre los niveles de triglicéridos hepáticos no son claros. Así, Los trabajos de Ruitter y col. (1978) y Kobatake y col. (1983) indican que no se alteran los niveles de estos lípidos hepáticos con el consumo de aceite de pescado, mientras que Wong y col. (1984) observan un aumento del 38% en la concentración de triglicéridos hepáticos en ratas alimentadas con un suplemento del 15% de Max-EPA respecto a basales sin dicho suplemento.

Efectos sobre el colesterol hepático.

En la revisión de Kinsella (1987) se observa que la disminución de los niveles de colesterol hepático fue proporcional a la ingesta de aceite de pescado. Kobatake y col. (1983) observan unas reducciones del colesterol hepático proporcionales a la sustitución de metil oleato de la dieta por aceite de pescado.

Efectos sobre triglicéridos plasmáticos.

La reducción de triglicéridos asociada al consumo de ácidos grasos poliinsaturados n-3 ha sido descrita en muchos trabajos, entre ellos podemos citar a Ruitter y col. (1978), Von Lossonczy y col. (1978), Harris y col. (1983), Kobatake y col. (1983), Wong y col. (1984), Nestel y col. (1984), Nestel (1986). Pero, hay que indicar que ingestas pequeñas de n-3 no producen tal disminución (Hamazaki y col., 1982; Morisaki y col., 1983; Sánchez-Muniz y col., 1991a).

Para Harris y col. (1984) y Nossen y col. (1986) este efecto hipotrigliceridemiante se debería a que el ácido eicosapentaenoico inhibiría la síntesis y/o secreción de triglicéridos asociada a las V.L.D.L., como comprobaron en cultivos de hepatocitos de rata.

La baja síntesis y/o secreción de triglicéridos no puede ser explicada por la reducción de la captación por las células de ácido eicosapentaenoico ya que por medidas de radioactividad se ha visto que las células si captan este ácido graso.

Para Nossen y col. (1986) tampoco es probable que las causas de la disminución de la síntesis de triglicéridos se deban a un aumento de la oxidación de ácidos grasos, sino a una disminución de la actividad de la triacilglicerol sintetasa, posiblemente debido a que el ácido eicosapentaenoico sea debilmente activado por la acil Co A o que el eicosapentanoil-Co A sea un sustrato pobre para dicha sintetasa. En cuanto a la inhibición en la secreción de triglicéridos puede ser explicada principalmente por la inhibición de su síntesis. En resumen, para este autor se secretarían la misma cantidad de partículas V.L.D.L. pero con menor cantidad de triglicéridos.

Efectos sobre colesterol plasmático.

Con respecto a los niveles de colesterol en plasma, en la revisión de Herold y Kinsella (1986), se observa que ratas alimentadas con n-3 reducen sus niveles plasmáticos en relación a ratas alimentadas con el mismo porcentaje de grasa total en forma de manteca de cerdo. Este efecto es dependiente de la dosis. Así, Kobatake y col. (1983) observan que mezclas de n-3 y metiloleato producen cambios en la colesterolemia proporcionales al contenido ingerido de n-3. Durand y col. (1985) encuentran, también en ratas, una correlación negativa entre los niveles de colesterol sérico y del contenido tanto de ácidos grasos poliinsaturados n-3 de la dieta como de ácidos grasos poliinsaturados n-3 del suero. En monos, Parks y col. (1989) describieron que el aceite de pescado reduce el contenido de ésteres de colesterol en lipoproteínas, pero no el número de partículas vertidas al plasma.

En cambio, Ruitter y col. (1978), Morisaki y col. (1983) y Wong y col. (1984) encuentran que los niveles de colesterol plasmático en animales no se alteran con el consumo de n-3.

En humanos, los datos también son contradictorios, ya que mientras que Brongesst-Shoute y col. (1981) y Sanders y col. (1981) no aprecian cambios en los niveles de colesterol plasmático cuando se usa como suplemento dietario aceite de hígado de bacalao o abadejo, otros autores (Von Lossonczy y col., 1978; Harris y col., 1983; Illingworth y col. 1984) sólo observan efectos con dietas conteniendo altas cantidades de grasa de pescado y Max-EPA. En cambio, Sanders y Roshanai (1983) señalan un efecto dosis-respuesta en individuos alimentados con cantidades crecientes de Max-EPA (a más dosis menor concentración de colesterol total en plasma). Phillipson y col. (1985) observan una reducción entre el 27% y 48% de los valores iniciales de colesterol plasmático en individuos hipertriglicéridémicos que consumen dietas con aceite de pescado durante 4 semanas y Von Lossonczy y col. (1978) indican una disminución de colesterol en plasma en sujetos normolipémicos alimentados con dietas enriquecidas en n-3. Recientemente nuestro grupo en mujeres normo(hipo)lipémicas observó una disminución del 6% en los valores de colesterol total, no significativa, después del suplemento de la dieta habitual con 3 g/día durante 10 días de un preparado estandarizado de aceite de pescado (Pulse^R) (Sánchez-Muniz y col., 1991a).

También Nestel (1986) señala que incluso cuando la ingesta de colesterol es alta los n-3 son capaces de frenar la hipercolesterolemia.

A este respecto, Higón y col. (1987) y Sánchez-Muniz y col. (1991b) indican que la inducción hipercolesterolemia de dietas conteniendo colesterol y bilis de buey se frena de forma acusada cuando dichas dietas contienen moderadas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados n-3 en forma de sardinas fritas en aceite de oliva o girasol.

Efectos sobre fosfolípidos plasmáticos.

Los datos bibliográficos sobre la influencia de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 sobre la fosfolipémia son controvertidos.

Huang y col. (1986) observan que ratas alimentadas con dietas en las que se incrementaba la proporción de aceite de pescado disminuían los fosfolípidos plasmáticos.

Iritani y Fujikawa (1982) encuentran una disminución de fosfolípidos plasmáticos en ratas proporcional al consumo de aceite de pescado dietario, pero no encontraron diferencias significativas entre los fosfolípidos de ratas alimentadas con dietas conteniendo aceite de sardina o de maíz.

Por último, en contraposición a lo anterior, Nossen y col. (1986) indica un aumento en la secreción y síntesis de fosfolípidos en hepatocitos en presencia de ácido eicosapentaenoico.

1.4.3.2.a. PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE LOS ACIDOS EICOSAPENTAENOICO (20:5, N-3), DOCOSAHEXAENOICO (22:6, N-3) Y LINOLENICO (18:3, N-3).

A pesar de pertenecer a la misma familia, estos ácidos parecen tener un efecto diferente sobre la lipemia al ser ingeridos. Kinsella (1987) encuentra que los niveles de H.D.L.-colesterol parecen ser más sensibles a la ingesta de DHA que a la de EPA, ya que en ratas se incrementan una media del 11% después de la ingesta de 100 mg diarios de DHA durante 2 semanas, mientras que no se observan cambios cuando ingieren la misma cantidad de EPA.

Huang y col. (1986) observan una diferente incorporación de estos ácidos a los distintos órganos. Así, el DHA se incorpora más a fosfolípidos de plasma, hígado y corazón; mientras que el EPA se incorpora mejor a fosfolípidos de riñón.

Según Durand y col. (1985) cuando la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados n-3 es muy bajo, el EPA puede no representar más que 0,2% de los ácidos grasos séricos, mientras que el DHA nunca es menor del 1%, lo que hace pensar en diferentes papeles fisiológicos de dichos ácidos séricos.

Otras diferencias se encuentran en la inhibición del metabolismo del ácido araquidónico. Hwang y col. (1988) en ratas Sprague-Dawley alimentadas con cantidades crecientes de linoléico o concentrado de aceite de pescado en presencia de cantidades constantes de linoléico llegan a las siguientes conclusiones:

-Los ácidos grasos n-3 de cadena más larga parecen ser más efectivos que el ácido linoléico en la supresión de los niveles de ácido araquidónico en pulmón y fosfolípidos plasmáticos y en la inhibición de la capacidad de los tejidos de sintetizar productos derivados de la ciclooxigenasa.

-La ingestión de aceite de pescado conduce al aumento de la formación de productos derivados de la lipoxigenasa, disminuyendo la formación de productos derivados de la ciclooxigenasa. El ácido linolénico no es sustrato para la síntesis de leucotrienos, mientras que el EPA es preferido sobre el ácido araquidónico como sustrato de la 5-lipooxigenasa (Ochi y col., 1983).

-Los ácidos grasos n-3 de cadena larga parecen ser más efectivos que el ácido linolénico suprimiendo la formación de tromboxano B-2.

1.4.3.3. PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE LOS ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE LAS FAMILIAS N-3 Y N-6.

Son numerosos los trabajos donde se aprecia que los ácidos grasos poliinsaturados n-3 producen mayor reducción de lípidos en plasma que los ácidos grasos poliinsaturados n-6.

Así, Wong y col. (1984) encontraron en ratas alimentadas con un 15% (en peso) de Max-EPA durante 2 semanas tuvieron un 40% más bajo los niveles plasmáticos de triglicéridos que las alimentadas con igual cantidad de aceite de cártamo (rico en ácido linoléico).

Huang y col. (1986) compararon el efecto de dietas conteniendo diferentes tipos de aceite (cártamo o pescado) sobre los lípidos plasmáticos de ratas macho Sprague-Dawley. Observan que, en general, los lípidos plasmáticos son más bajos en ratas alimentadas con aceite de pescado en comparación con las que recibían aceite de cártamo.

También en el trabajo de Wong y col. (1984) se indica en ratas alimentadas con suplementos de aceite de pescado, frente a las alimentadas con aceite de cártamo, una disminución de la lipólisis, aumento de la cetogénesis, aumento de la oxidación de ácidos grasos y disminución de la secreción de triglicéridos (V.L.D.L.-triglicéridos).

Illingworth y col (1984) encuentran niveles un 20% más bajos de L.D.L.-colesterol usando dietas con Max-EPA (2% de PUFA n-6, 30% de ácidos grasos saturados y 35% de PUFA n-3) frente a dietas con 37% de ácidos grasos saturados y 18% de PUFA n-6.

A pesar de todo, existen otros trabajos donde este efecto diferencial entre PUFA n-3 y n-6 no es tan claro (Harris y col., 1983; Nestel y col. 1984).

Sin embargo, las principales diferencias entre estas dos familias de ácidos grasos se centra en la síntesis de leucotrienos, prostaciclina y tromboxanos, aspecto al cual, debido al contenido de este tema, no nos referiremos.

1.5. DIETAS HIPERCOLESTEROLEMIANTES.

Es bien conocido que un incremento en el colesterol dietario produce un incremento en el colesterol plasmático (Quazi y col., 1983; Huang y col., 1986) principalmente debido al incremento de la fracción esterificada de este esterol (Ross y Zilversmit, 1977). Por otro lado, Rudel y col. (1985) observaron en monos que dietas enriquecidas en colesterol incrementaban el tamaño y número de las L.D.L. en plasma, así como el contenido de ésteres de colesterol de estas partículas. Además, la ingesta de estas dietas conduce en animales de experimentación a la aparición de 2 lipoproteínas anormales ricas en ésteres de colesterol: las β -V.L.D.L. ricas en apo B y apo E, y con poco o nada de apo C (Mahley, 1982) y las H.D.L._c que además contienen apo E y apo A y algo de apo C (Mahley y col., 1974). Ambas lipoproteínas se creen asociadas con estados prematuros de aterosclerosis (Rodríguez y col., 1976).

La acumulación de partículas ricas en ésteres de colesterol en el suero de distintas especies animales alimentadas con esta sustancia puede ser enteramente debida al incremento en la síntesis de estas partículas por el hígado e intestino y/o a una saturación del mecanismo hepático de eliminación. A este respecto, diversos estudios han demostrado que no hay defectos en el mecanismo de eliminación en la rata de partículas ricas en ésteres de colesterol del suero (Wong y Rubinstein, 1979), o en preparaciones de hígado perfundido de rata (Kris-Etherton y Cooper, 1980).

Para estos últimos autores, el mecanismo que conduciría a la hipercolesterolemia sería la biosíntesis de lipoproteínas enriquecidas en ésteres de colesterol a expensas de los triglicéridos. Este efecto no iría acompañado de un incremento de la secreción de lipoproteínas al plasma. Johnson y col. (1983) sostienen la misma teoría. Sin embargo, para otros autores (Kovanen y col., 1981; Brown y Goldstein, 1984; Sorci-Thomas y col., 1989) el mecanismo implicado en el incremento de las concentraciones séricas de colesterol sería la inhibición de la actividad del receptor L.D.L. Dietas ricas en colesterol no incrementaban el RNAm para Apo B en hígado, mientras que reducían al 50% el RNAm para los receptores hepáticos de L.D.L.

En lo que se refiere al hígado estas dietas hipercolesterolemiantes van a provocar un incremento de su contenido lipídico (Quazi y col., 1983), sobre todo, ésteres de colesterol (Eklund y Sjöblom, 1986; Bochenek y Rodgers, 1978). Por otro lado, al introducir colesterol en la dieta disminuye la actividad de la HMG CoA reductasa hepática y aumenta la excreción fecal de esteroides neutros y ácidos (Bochenek y Rodgers, 1978), debido quizás a un aumento de la síntesis de ácidos biliares (Vega y col., 1982).

Con la ingesta de colesterol el hígado progresivamente se enriquece de colesterol esterificado como resultado de la captación de partículas de quilomicrones remanentes ricas en colesterol de origen intestinal (Klein y Rudel, 1983); pero también,

cuando hay gran cantidad de colesterol en la dieta, la captación hepática del mismo se retrasa (Zilversmit, 1979).

Posteriormente por acción de una estearasa los ésteres de colesterol en el hígado se hidrolizan en ácidos grasos y colesterol libre que puede tener diferentes destinos:

- Reesterificado y almacenado como ésteres de colesterol.
- Convertido en ácidos biliares.
- Secretado a la bilis como colesterol.
- Secretado al plasma como lipoproteínas.

Estos tres primeros puntos explicarían el acúmulo de ésteres de colesterol en hígado, el aumento de la síntesis de ácidos biliares y de la excreción de esteroides antes señalados.

El último punto explicaría el aumento de los ésteres de colesterol en lipoproteínas plasmáticas con dietas hipercolesterolemiantes, debido a una secreción por parte del hígado de partículas ricas en este tipo de ésteres.

Estos últimos compuestos se formarían por un aumento de la actividad del enzima hepático A.C.A.T., tal y como aparece en el trabajo de Norum y col. (1983) en ratas y cobayas alimentadas con dietas ricas en colesterol.

Según esto, el hígado secreta más V.L.D.L. y L.D.L. que contienen ésteres de colesterol producidos por este mecanismo, siendo, por tanto, la mayor parte del colesterol esterificado de la rata de origen hepático (Noel y col., 1979; Kris-Etherton y Cooper, 1980).

1.5.1.EFECTOS DEL COLESTEROL DIETARIO SOBRE LOS ACIDOS GRASOS.

Según Bochenek y Rodgers (1978), el colesterol de la dieta altera el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado. Estos autores observan que el consumo de colesterol disminuye el porcentaje de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales en fosfolípidos hepáticos. Así, el ácido araquidónico disminuye en esta fracción lipídica en los 2 grupos experimentales alimentados con suplementos de colesterol. Para estos autores se incorporó más ácido linoleico (fuente del ácido araquidónico) a los ésteres de colesterol hepáticos, disminuyendo la cantidad de este ácido graso disponible para la producción de fosfolípidos hepáticos.

También Morin y col. (1962), citados por Huang y col. (1986), indican una disminución de estos ácidos grasos en el hígado consecuente a un exceso en la ingesta de colesterol.

Swell y col. (1964) y Pfeifer y col. (1955), citados por Bochenek y Rodgers (1978), explican este efecto debido a que cuanto más colesterol se ingiere más se acumula en los tejidos y más ácidos grasos poliinsaturados se requieren para la síntesis de ésteres de colesterol. También se necesitan estos ácidos en mayor cuantía para la síntesis de fosfolípidos, uno de los materiales que constituyen las lipoproteínas utilizadas para el

transporte de colesterol. Es decir, con la ingesta de grandes cantidades de colesterol el hígado secreta más V.L.D.L. y se verá obligado a consumir ácido araquidónico (principal ácido graso presente en los ésteres de colesterol en plasma (Swell y col., 1964), para la síntesis de colesterol esterificado y de fosfolípidos de las V.L.D.L.

Otros autores indican un posible bloqueo de la síntesis de ácido araquidónico. Morin y col., (1962) muestran que manipulaciones más extremas en la dieta del colesterol pueden producir acumulación del ácido 8, 11, 14-eicosatrienoico y del ácido 5, 8, 11-eicosatrienoico, intermediarios en la vía del linoleato a araquidónico (Howton y Mead, 1960), citados por Bochenek y Rodgers, (1978), y un incremento de estos intermediarios en fosfolípidos hepáticos puede reflejar un bloqueo en la parte final de la conversión del linoleato a araquidónico.

Bochenek y Rodgers (1978) no encuentran estos isómeros del ácido eicosatrienoico en fosfolípidos hepáticos. Pero en ese trabajo no se añadieron cantidades de lípidos neutros y colesterol tan grandes como en otros, ni tampoco se adicionaron sales biliares. Por lo que en este caso, la explicación del bajo nivel de araquidónico en fosfolípidos hepáticos, puede deberse a la rápida utilización de este ácido graso.

Huang y col. (1986) también observan con la ingesta de colesterol acumulación de ácido linoleico y reducción de araquidónico en plasma e hígado. También indican aumento de ácido eicosapentaenoico y reducción de docosahexaenoico en estos mismos órganos. Esto implica que la conversión del ácido eicosapentaenoico a docosahexaenoico puede estar también reducida con el colesterol dietario. Para estos autores, la inhibición puede localizarse en la elongación de eicosapentaenoico a docosapentaenoico y/o desaturación de docosapentaenoico a docosahexaenoico.

Todos estos cambios por efecto del colesterol dietario no se observan en corazón o riñón debido, seguramente, a la más baja actividad de desaturación de ácidos grasos y a la mayor capacidad de conservar los ácidos grasos esenciales en estos órganos.

Finalmente, Bochenek y Rodgers (1978) indican que dietas conteniendo colesterol inhiben la desaturación de los ácidos grasos n-6 en los animales que las consumen. Esta afirmación también es apoyada por Huang y col. (1985), trabajo citado en Huang (1986).

1.6. MODIFICACIONES EN EL ALIMENTO Y EN LAS GRASAS CULINARIAS POR EL PROCESO DE FRITURA. INFLUENCIA DE SU CONSUMO SOBRE LA COLESTEROLEMIA Y TAMAÑO DE HIGADO.

La fritura es un proceso culinario consistente en el introducción del alimento en un baño de aceite a una temperatura entre 170°C y 200°C. Se obtiene de esta forma un alimento frito de especiales características, entre las que destacaría su palatabilidad (Varela, 1980).

A pesar de la teórica alta temperatura alcanzada en el proceso, el daño térmico sufrido por el alimento es menor al que cabría esperar. La razón es que mientras dura la evaporación del agua, lo cual es necesario para que penetre la grasa caliente del baño de fritura, la temperatura no sube de los 100°C; y una vez que ha penetrado en el alimento la grasa caliente del baño el tiempo que transcurre hasta que la fritura finaliza es relativamente corto. Sánchez-Muniz y col. (1990) señalan al freír sardinas que la temperatura del aceite de la freidora permanece la mayor parte del proceso de fritura por debajo de 140°C.

De lo anterior podemos deducir dos de los principales cambios que ocurren en el alimento durante la fritura: evaporación del agua y enriquecimiento por la grasa del baño de fritura (Varela, 1983).

Debido a la evaporación del agua se produce una pérdida de peso del alimento frito, ya que la cantidad de grasa que penetra suele ser inferior a la cantidad de agua perdida (Medina, 1986; Hernández, 1989). Por la penetración de la grasa del baño se provoca una dilución de la grasa propia del alimento (Sánchez-Muniz y col., 1991c).

Este último punto es de especial interés en lo referente a la fritura de pescado azul. En este caso la dilución antes mencionada provoca una disminución de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 presentes en el aceite de pescado, por lo que se podría alterar, al menos cuantitativamente, el papel protector de estos ácidos grasos en las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la fritura en grasas monoénicas como el aceite de oliva enriquecería al pescado azul en ácidos grasos de la familia n-9 pudiendo resultar beneficioso en el tratamiento de dichas enfermedades, como se comentó en el apartado 1.3.2.

Sánchez-Muniz y col. (1991c) en fritura de sardinas en baño de aceite de oliva encontraron que dicho pescado se enriquece en ácido oleico (de un 20,5% a un 65,8%) y se empobrece en ácido palmítico (14,1% frente a un 27,6%) y ácido docosaheptaenoico (1,2% frente a un 16,2%), mientras que otros ácidos grasos sufren modificaciones de menor cuantía.

Hay que señalar que este enriquecimiento en grasa del alimento frito va a depender del contenido lipídico del alimento crudo. Así, Mai y col. (1978) encontraron, en un estudio realizado en frituras de pescado fresco, que a mayor contenido inicial de grasa del pescado menor era la absorción de la misma y

viceversa.

Además, este aporte en grasa supone un incremento en el contenido energético del alimento y puede contribuir al transporte de componentes liposolubles, tales como vitaminas (Moreiras-Varela y col., 1988).

Por otro lado, el proceso de fritura puede afectar a las proteínas del alimento. Así, Aitken y Cornell (1979) señalan que en fritura de sardinas el total de metionina no se afecta por el calentamiento a 112°C ó 126°C, pero la disponibilidad de este aminoácido se reduce sensiblemente. Otros trabajos de estos autores señalan una pérdida de lisina del 29% por el proceso de fritura a 180°C durante 4 minutos.

Con respecto al triptófano, Beamonte (1988) señala que los procesos térmicos culinarios de preparación de un pescado graso, entre ellos la fritura, pueden afectar al contenido de este aminoácido por reacción con los productos de oxidación de los lípidos, de esta forma, la proteína actuaría como antioxidante (Pokorny, 1980). Las pérdidas de triptófano estarían en función de la composición del alimento y del contenido y grado de oxidación de los lípidos presentes en él.

Nawar (1984) señala que los hidroperóxidos lipídicos pueden inducir cambios oxidativos en las sulfoproteínas, causando pérdidas nutritivas.

Hay que indicar que el sobrecalentamiento de las grasas utilizadas en frituras repetidas pueden dar lugar a la aparición de productos potencialmente tóxicos (Alim y Mortom, 1974; Morton, 1977 y Varela y col., 1983). Sin embargo, las condiciones tan drásticas necesarias para que aparezcan estos productos raramente se podrían dar a nivel doméstico. Así, Hernández (1989) utilizando aceite de oliva en quince frituras repetidas de patatas concluye que las variaciones de este aceite de oliva fueron de escasa magnitud y muy inferiores a las recomendadas para desechar una grasa de fritura.

Por último, durante el proceso de fritura se alteran principalmente los ácidos mono y poliinsaturados y, por tanto, su posible influencia sobre los niveles de colesterol plasmático. Este efecto depende en gran medida del tipo de aceite, cantidad y composición del alimento a freír y del tiempo y temperatura del proceso.

Simko y col. (1964) indican que grasas animales y aceite de girasol cocinados (p.e. fritos) elevan los niveles de β -lipoproteínas y colesterol.

Sanchez-Muniz y col. (1986) después de alimentar ratas Wistar en crecimiento durante 10 semanas con aceite de oliva utilizado en 30 frituras repetidas de patatas frente a basales alimentadas con el aceite en crudo encontraron incrementos significativos del colesterol total (21%) que se corresponden con un incremento significativo de los ésteres de colesterol (33%),

permaneciendo el colesterol libre sin variación. Estos autores sugieren que las ratas en estas condiciones experimentales adaptan su metabolismo lipídico esterificando el colesterol.

Sin embargo, Varela (1980) no encuentran un incremento significativo en los valores de colesterol plasmático en ratas alimentadas con dietas que contienen aceite utilizado en fritura, incluso, observa una disminución de estos niveles en ratas hembras. Tomassi (1983) encuentra que el colesterol total y los triglicéridos disminuyen con la ingesta de la parte polimerizada y oxidada de un aceite de semilla de soja procedente de fritura.

Rodríguez y col. (1984) no encontraron modificaciones ni en el tamaño de hígado ni del corazón en ratas Wistar que recibían aceites o grasas vegetales crudas o utilizadas repetidas veces en frituras.

Sin embargo, Potteau y col. (1978) observan que diferentes tipos de aceites fritos a elevadas temperaturas o durante tiempos prolongados produjeron aumento del tamaño de hígado y perturbaciones en el metabolismo de la vitamina B.

Cava (1986) y Sánchez-Muniz y col. (1991b) intentando prevenir la inducción hipercolesterolemica en ratas ingiriendo colesterol y bilis de buey sustituyeron la caseína y aceite de oliva de la dieta por sardinas fritas en aceite de oliva, utilizado 1 y/o 2 veces para freír dicho pescado, y encontraron que mientras los niveles de colesterol y otros lípidos plasmáticos se afectaron positivamente de forma marcada, tanto el tamaño de hígado y corazón como los índices cardio y hepatosomático fueron similares en ambos lotes.

2.OBJETIVOS

En la reunión del Grupo Europeo de Nutricionistas (GEN) que tuvo lugar en París en 1975 y en la conclusiones del 1^{er} International Symposium of Frying of Food, celebrada en Madrid en 1986, se puso de relieve la necesidad de estudiar la relación entre grasas transformadas culinariamente y enfermedades cardiovasculares, indicándose la posibilidad de que gran parte de los datos epidemiológicos basados en la posible relación ingesta/grasa/enfermedades cardiovasculares, podrían carecer de base científica, ya que esta relación se había calculado considerando la ingesta de las grasas crudas.

La importancia y actualidad que el consumo de pescado azul ha alcanzado en Nutrición y en la prevención y tratamiento de las enfermedades degenerativas (p.e. hipercolesterolemias, enfermedades cardiovasculares, etc.) dan especial realce a esta tesis, ya que como se ha comentado en la introducción de la revisión bibliográfica la mayoría de los estudios con PUFA n-3 se han llevado a cabo con concentrados de pescado (Shouten y Beynen, 1986; Kinsella, 1987; Kinsella y col., 1990; Flaten y col., 1990) no existiendo prácticamente trabajos donde se valore la utilidad del pescado procesado en la prevención y tratamiento de tales enfermedades.

Al freír un pescado azul como la sardina en aceite de oliva o en girasol se producen cambios en la composición de ácidos grasos que pueden resumirse en ambos casos en marcado enriquecimiento en ácido oleico o linoleico respectivamente y empobrecimiento en PUFA n-3. El cociente n-6/n-3 también se ve afectado incrementándose en 4,9 veces en las sardinas fritas en aceite de oliva y 24,1 en aceite de girasol respecto al de las sardinas crudas (Sánchez-Muniz y col., 1991c).

Los resultados de este estudio señalan que las sardinas fritas en aceite de oliva presentaron además una relación de ácidos grasos saturados/monoinsaturados/poliinsaturados más adecuada que la de las sardinas fritas en aceite de girasol (Sánchez-Muniz y col., 1991c).

También recientemente nuestro equipo (datos aún no publicados) ha encontrado una aceptabilidad significativamente menor de dietas conteniendo sardinas fritas en aceite de girasol que de aquellas conteniendo sardinas fritas en aceite de oliva, posiblemente debido al diferente grado de saturación de las dietas y a al mayor vulnerabilidad peroxidativa de las sardinas fritas en girasol que le conferían una palatabilidad disminuida.

Por tanto, dada la popularidad creciente de la técnica culinaria de la fritura, el consumo de pescado azul y por ende de pescado frito y la mayor palatabilidad de dietas conteniendo sardinas fritas en aceite de oliva que de girasol, el objetivo principal de esta tesis doctoral es valorar la efectividad de dietas conteniendo sardinas fritas en aceite de oliva en el tratamiento de la hipercolesterolemia experimental.

Por ello se procederá:

1.) A inducir una hipercolesterolemia mediante la utilización de dietas conteniendo caseína, aceite de oliva y colesterol, evaluando los cambios producidos en el perfil lipoproteico y en los lípidos hepáticos.

2.) Se comparará en los animales hipercolesterolémicos los efectos de dietas con o sin colesterol en las que se incluyan sardinias fritas en aceite de oliva o caseína más aceite de oliva sobre el perfil lipoproteico, la esterificación hepática del colesterol y los niveles de colesterol en otros territorios extrahepáticos.

3.) Se comparará en los animales hipercolesterolémicos los efectos sobre el perfil lipoproteico y sobre los lípidos hepáticos del tratamiento con sardinias fritas en aceite de oliva o con la grasa extraída de esas sardinias.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.1.1. ANIMALES E INSTALACIONES.

Se eligieron al azar ratas WISTAR, machos, de peso aproximado 65 g., del criadero del Instituto de Nutrición y Bromatología (C.S.I.C.-U.C.M.) de la Facultad de Farmacia de la U.C.M. Estas ratas se colocaron durante toda la experiencia en cámaras ecológicas con fotoperíodo controlado (12 horas de luz) y a temperatura estabilizada ($22,3 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$).

3.1.2. DIETAS.

Se elaboraron dietas prácticamente isocalóricas y cuya composición aproximada fue:

- a.) Proteína 15%
- b.) Grasa 10%
- c.) Corrector vitamínico 0,12%
- d.) Corrector mineral 3,77%
- e.) Fibra (celulosa) 5%
- f.) Sacarosa 25%
- g.) BHT y BHA 0,02% (0,01% BHT + 0,01% BHA).
- h.) Almidón c.s.p. 100%

En las dietas suplementadas con colesterol se sustituyó un 2,5% de almidón por un 2% de colesterol y un 0,5% de bilis de buey.

Tal y como indican Durand y col., (1985) y Cava, (1986) el colesterol y la bilis de buey en las proporciones indicadas se emplearon como agentes hipercolesterolemiantes. BHT y BHA se utilizaron como antioxidantes.

Las dietas difieren en su fuente proteica y grasa. Las fuentes grasas utilizadas fueron: aceite puro de oliva de acidez 0,4º y la grasa procedente de sardinas fritas en aceite de oliva; y las fuentes proteicas: caseína y la proteína de estas sardinas fritas.

El proceso de elaboración de las dietas fue el siguiente:

- a.) Dietas con caseína y aceite de oliva: se pesan los componentes en las proporciones indicadas anteriormente, utilizando caseína y aceite puro de oliva, como fuente proteica y grasa respectivamente. Se añade 0,2% de D-L Metionina.
- b.) Dieta con sardinas fritas en aceite de oliva: el primer paso para la elaboración de esta dieta fue la fritura de sardinas (SARDINA PILCHARDUS, WALBAUM) en aceite puro de oliva de acidez 0,4º, siguiendo el esquema experimental indicado por Medina San Nicolás, (1986), Cava, (1986) y Sánchez-Muniz y col., (1990).

Se partió de sardinas limpias de escamas, espina dorsal y cabeza, evisceradas, abiertas en abanico y enharinadas con harina de trigo de alta extracción. Estas sardinas se frieron en freidoras domésticas de 3 litros de capacidad a una temperatura

inicial de 180°C durante 4 minutos. A continuación, las sardinas se liofilizaron, manteniéndolas a -20°C en botes de cristal hermeticamente cerrados bajo atmósfera inerte de nitrógeno hasta su uso. Después, conocido el contenido proteico y graso de estas sardinas fritas se procedió a pesar los componentes de las dietas en las proporciones indicadas anteriormente.

Para la dieta constituida por caseína como fuente proteica y aceite de sardina frita como fuente grasa; ésta última se obtuvo a partir de sardina entera frita en aceite de oliva, extrayendo su grasa mediante el método de Bligh y Dyer (1959).

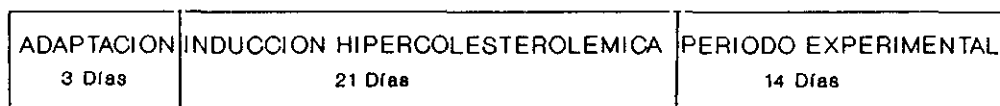
La composición en humedad, extracto etéreo, proteína y composición en ácidos grasos de estas dietas se muestran en las tablas 1, 14 y 30.

Todas las dietas se conservaron en atmósfera de nitrógeno y a -20°C hasta su utilización.

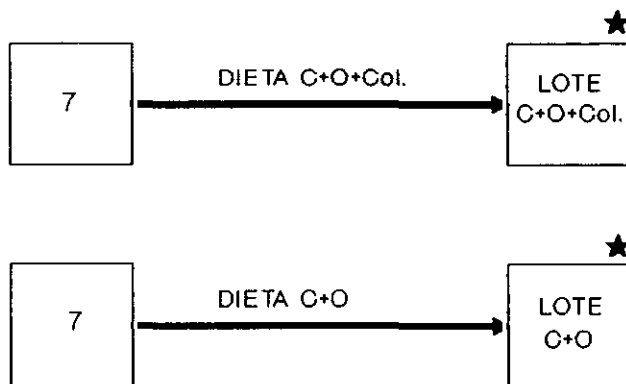
3.1.3. DESARROLLO DE LAS EXPERIENCIAS.

3.1.3.1. EXPERIENCIA A.

ESQUEMA EXPERIMENTAL



DIETA ESTANDAR
DE LABORATORIO



★ SACRIFICIO Y OBTENCION DE MUESTRAS.

DETERMINACIONES:

- COLESTEROL, TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS EN PLASMA E HIGADO
- COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS EN EL TOTAL HEPATICO Y EN SUS DISTINTAS FRACCIONES LIPIDICAS
- COLESTEROL, TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS EN LIPOPROTEINAS

Esta experiencia comprende 2 períodos: de adaptación (3 días) y de inducción hipercolesterolemia (21 días).

En el período de adaptación, las ratas consumen dieta estándar de laboratorio (Sanders, Madrid).

En el 2º periodo los lotes empleados, compuestos de 7 animales cada lote, ingieren las siguientes dietas:

-LOTE C+O: ingiere una dieta con caseína como fuente proteica y aceite de oliva como fuente grasa (Dieta C+O).

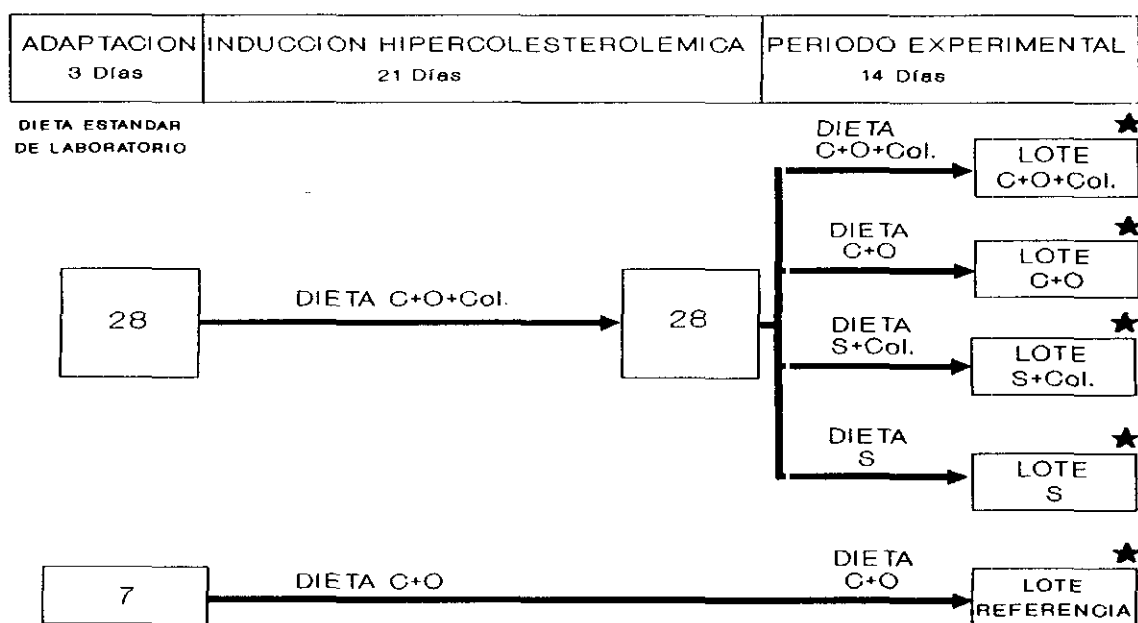
-LOTE C+O+Col: ingiere la misma dieta que el Lote C+O suplementada con colesterol (Dieta C+O+Col).

Después de este último período, tras 12-15 horas de ayuno, se procedió a extraer sangre mediante punción de la arteria carótida bajo anestesia con pentobarbital sódico.

Finalmente, las ratas fueron sacrificadas para la extracción de los hígados, que se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron individualmente a -20°C, hasta su posterior análisis.

3.1.3.2. EXPERIENCIA B.

ESQUEMA EXPERIMENTAL



★ SACRIFICIO Y OBTENCION DE MUESTRAS.

DETERMINACIONES:

- COLESTEROL, TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS EN PLASMA E HIGADO
- COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS EN HDL
- COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS EN EL TOTAL HEPATICO Y EN SUERO
- DETERMINACIONES EN HECES, BAZO Y TEJIDO ADIPOSEO

Esta Experiencia B comprende 3 períodos: de adaptación (3 días), de inducción hipercolesterolemia (21 días) y experimental (14 días).

En el período de adaptación, las ratas también consumen

dieta estándar de laboratorio (Sanders, Madrid).

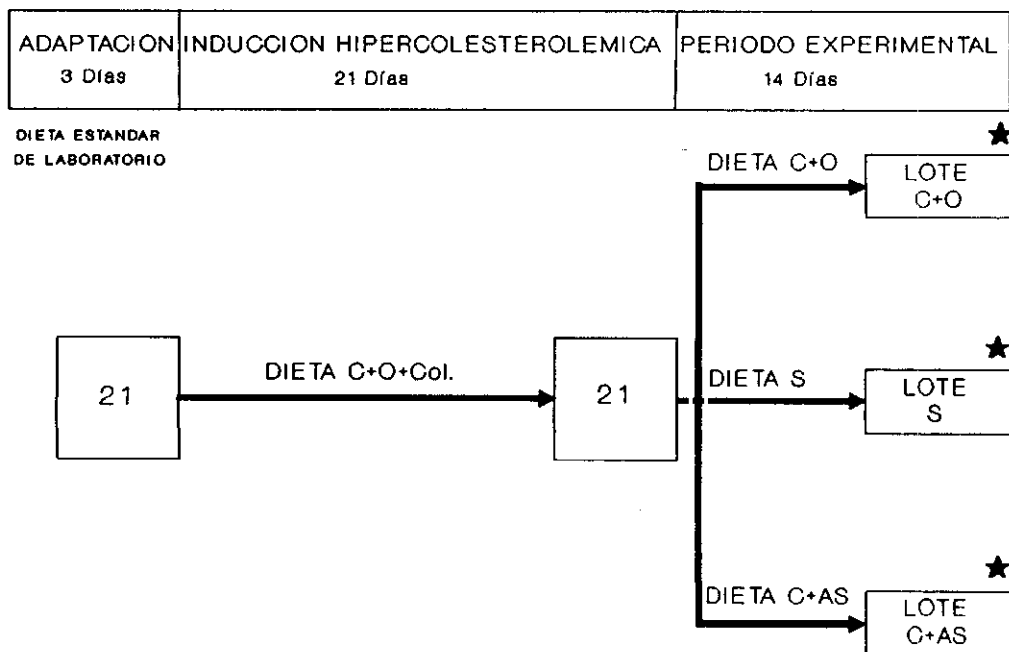
En esta experiencia todos los lotes, excepto el Lote REFERENCIA, reciben durante el periodo preexperimental una dieta conteniendo caseína, aceite de oliva y suplementada con colesterol (Dieta C+O+Col). El Lote REFERENCIA recibe durante esta fase la misma dieta pero sin colesterol (Dieta C+O).

En el período experimental las ratas que ingieren la Dieta C+O+Col se separan en lotes de 7 animales cada lote. En este período los animales reciben las distintas dietas experimentales:

- LOTE C+O: recibe la Dieta C+O.
- LOTE C+O+Col: ingiere la Dieta C+O+Col.
- LOTE S: recibe una dieta conteniendo como fuentes proteica y grasa sardinas fritas en aceite de oliva (Dieta S).
- LOTE S+Col: ingiere la Dieta S, pero suplementada con colesterol (Dieta S+Col).
- LOTE REFERENCIA: consume la Dieta C+O.

3.1.3.3. EXPERIENCIA C.

ESQUEMA EXPERIMENTAL



★ SACRIFICIO Y OBTENCION DE MUESTRAS.

DETERMINACIONES:

- COLESTEROL, TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS EN PLASMA E HIGADO
- COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS EN EL TOTAL HEPATICO Y EN SUS DISTINTAS FRACCIONES LIPIDICAS
- COLESTEROL, TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS EN LIPOPROTEINAS

Esta Experiencia C comprende los mismos períodos que los indicados en la Experiencia B: de adaptación (3 días), de inducción hipercolesterolemia (21 días) y experimental (14

días).

Como en la anteriores experiencias durante el período de adaptación los animales ingieren dieta estándar de laboratorio (Sanders, Madrid).

En el periodo de inducción hipercolesterolémica los animales ingieren una dieta con caseína y aceite de oliva suplementada con colesterol (Dieta C+O+Col).

En el periodo experimental, los animales se distribuyen en lotes de 7 ratas, que reciben las dietas siguientes:

-LOTE C+O: consume una dieta conteniendo caseína como fuente proteica y aceite de oliva como fuente grasa (Dieta C+O).

-LOTE S: recibe una dieta constituida por sardinas fritas en aceite de oliva como fuente proteica y grasa (Dieta S).

-LOTE C+AS: ingiere una dieta que como fuente proteica lleva caseína y como fuente grasa el aceite extraído de las sardinas fritas (Dieta C+AS).

En estas 2 últimas experiencias, tras el periodo experimental, se procede a la extracción de sangre y órganos de manera similar a lo descrito en la Experiencia A.

La conservación de las muestras hasta su posterior análisis también se realiza individualmente en atmosfera de nitrógeno a una temperatura de -20°C .

3.1.4. PARAMETROS CONTROLADOS.

Peso de los animales: las pesadas de los animales se realizaron una vez por semana, individualmente, empleando una balanza SAUTER KM-1000 y ajustando la primera cifra decimal.

Ingesta sólida: se realizó a diario, individualmente y por diferencia de peso entre el comedero lleno (ajustado a un peso determinado) y el comedero tras la ingesta. Se empleó una balanza SAUTER KM-1000, ajustando hasta la segunda cifra decimal.

Para el cálculo de la ingesta de ácidos grasos se utilizaron los factores de conversión indicados por McCance y Widdowson's (1978). Para el caso de sardinas fritas en aceite de oliva se utiliza un factor que resulta de la media de los correspondientes a grasa de sardina y a aceite, ya que, en nuestro laboratorio hemos comprobado, por diferencias en el peso y contenido de agua y grasa, que aproximadamente el 50% de la grasa de sardinas fritas corresponde a la grasa de fritura.

En todos los lotes determinamos:

-En plasma colesterol total, fosfolípidos y triglicéridos.

-En hígado se determinó: peso (se realiza inmediatamente después del sacrificio en balanza analítica SAUTER Gm bh D-7470, ajustando hasta la cuarta cifra decimal), humedad, lípidos totales, colesterol (total, libre y esterificado), fosfolípidos,

triglicéridos y ácidos grasos del total hepático.

Otras determinaciones que se realizaron fueron:

- En plasma se determinó la composición en ácidos grasos (Experiencia B) y composición de las lipoproteínas en: colesterol (total, libre y esterificado), fosfolípidos y triglicéridos (experiencias A y C).
- En hígado se analizó la composición en ácidos grasos de los triglicéridos, fosfolípidos y colesterol esterificado (experiencias A y C).
- En bazo se determinó grasa, colesterol total, fosfolípidos y triglicéridos (Experiencia B).
- En tejido adiposo se determinó grasa y colesterol total (Experiencia B).
- En heces se analizó el contenido de grasa, humedad y colesterol total y ácidos biliares (Experiencia B).

3.2. TECNICAS ANALITICAS.

3.2.1. HUMEDAD.

Se determinó en estufa a 105°C hasta peso constante en alicuotas de las dietas, hígados y heces.

3.2.2. PROTEINA DE LAS DIETAS.

Se utilizó el método Kjeldahl para determinación de nitrógeno. El factor de conversión a proteínas utilizado fue 6,25.

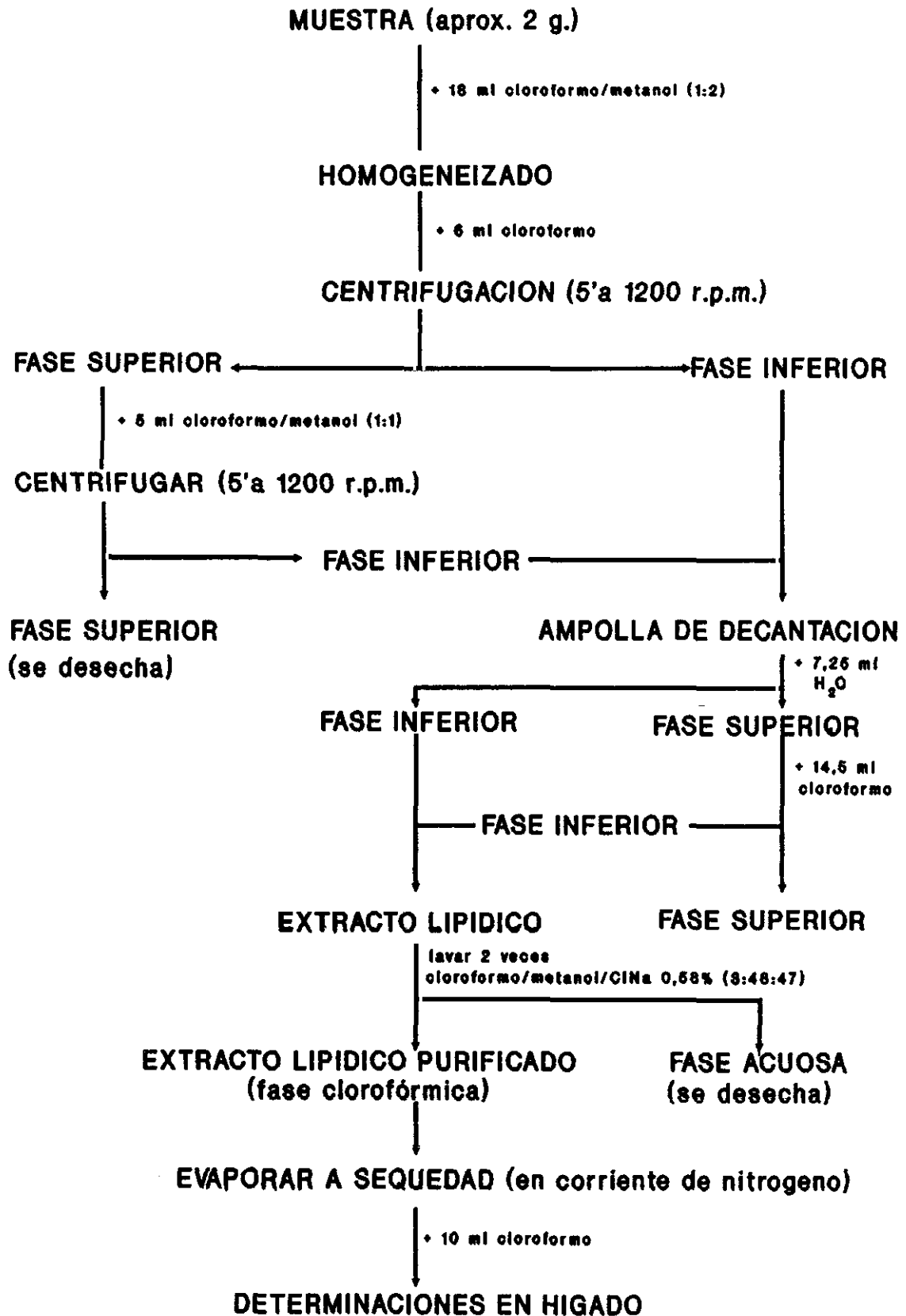
3.2.3. LIPIDOS TOTALES.

En dietas, se determinó mediante la técnica Soxhlet en una unidad de extracción 1040, modelo SOXTEC SYSTEM (TECATOR, SUECIA). Como líquido de extracción se empleó éter de petróleo.

En hígado, otros órganos y en heces el contenido lipídico total se determinó por pesada del extracto clorofórmico, evaporado a sequedad, obtenido siguiendo una ligera modificación del método de Bligh y Dyer (1959) y posterior purificación según el método de Folch y col. (1957). Dicha determinación se realizó atendiendo al esquema nº1. Este extracto lipídico purificado se recuperó con 10 ml de cloroformo. Esta disolución clorofórmica se guardó a -20°C en tubos con tapón de rosca y teflón bajo atmosfera de Nitrógeno hasta su análisis.

Una parte alicuota de este extracto clorofórmico se evaporó a sequedad redisolviéndose con una mezcla de isopropanol/H₂O (95:5), para las determinaciones enzimáticas posteriores de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos (Montes y col., 1978).

Esquema nº1. EXTRACCION Y PURIFICACION DE LIPIDOS HEPATICOS.



3.2.4. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (T.L.C.).

Se utiliza para la separación de las tres fracciones de lípidos, en las que posteriormente analizaremos su composición en ácidos grasos. Estas fracciones son: fosfolípidos, triglicéridos y colesterol esterificado.

La separación se produce por la distinta afinidad de estos lípidos por una fase estacionaria o fija que, en T.L.C., es un sólido poroso (silicagel) retenido en un soporte inerte (placa de vidrio), que es recorrido por la fase móvil (eluyente o líquido de desarrollo).

-Fase estacionaria.

Se utilizaron cromatoplasmas de silicagel 60 F₂₅₄S (MERCK, R.F.A.) de 20*20 cm y 0,5 mm de espesor.

Antes de aplicar las muestras, se introdujo la placa en la cámara de cromatografía saturada con el líquido de desarrollo para deslipidarlas y lavarlas. Posteriormente, después de la evaporación del líquido de desarrollo, se aplican las muestras sin activar las placas.

-Líquido de desarrollo.

Se probaron diversos eluyentes empleados por distintos autores:

a.) Hamilton, (1986) propone hexano/éter etílico/ácido fumárico (80:20:2) y éter de petróleo/benceno (4:7).

b.) Las mezclas de hexano, éter etílico y ácido acético glacial son utilizadas por diversos autores: Pagani, (1978); López-Espinoza y col., (1984); Hamilton, (1986) y Nossen y col. (1986). Se elaboraron diferentes mezclas utilizando estos 3 líquidos (hexano/éter etílico/ácido acético glacial), en las siguientes proporciones: (90:10:1), (85:15:1), (80:20:1), (70:30:1).

c.) Éter de petróleo/éter etílico/ácido acético glacial (85:15:1). Un eluyente similar es utilizado por Field y col. (1985) su composición era éter de petróleo/éter etílico/ácido fórmico (60:40:1,6).

Con el eluyente que obtuvimos mejor resultado, sobre todo en la separación del colesterol esterificado y triglicéridos fue el constituido por éter de petróleo/éter etílico/ácido acético glacial (85:15:1). Por esta razón, este líquido de desarrollo fue el empleado en nuestro trabajo.

-Preparación y aplicación de la muestra.

Se evaporó a sequedad en corriente de nitrógeno 1 ml del extracto clorofórmico hepático, redisolviendo con 100 µl de cloroformo. Esta concentración se realizó el mismo día en el que se desarrolló el cromatograma.

Se aplicaron 20 µl de esta última solución clorofórmica con microjeringas HAMILTON de 50 µl sobre las cromatoplasmas de silicagel a 2 cm de la base.

Finalmente, estas cromatoplasmas se introdujeron, después

de evaporarse el cloroformo de las muestras aplicadas, en la cámara de cromatografía saturada con el líquido de desarrollo anterior. El desarrollo del cromatograma fue de 16 cm.

-Identificación y técnicas de revelado.

La identificación se realizó preparando un patrón con los siguientes componentes:

- a.) Fosfolípidos: Lecitina (SIGMA.USA).
- b.) Colesterol (FARMITALIA CARLO ERBA. ITALIA).
- c.) Ácidos grasos libres: ácido pentadecanoico (SIGMA.USA).
- d.) Triglicéridos: tripalmitina (SIGMA.USA).
- e.) Colesterol esterificado: colesterol palmitato (SIGMA.USA).

A la vez, se prepararon patrones con cada uno de los anteriores componentes. Siguiendo los pasos anteriores aplicamos estos patrones llegando a la identificación de cada banda.

El orden en que aparecen las bandas es el siguiente: fosfolípidos (quedan en la zona de aplicación), colesterol, ácidos grasos libres, triglicéridos y colesterol esterificado (aparece en la zona superior).

El revelado se realizó rociando la placa, después de evaporar el líquido de desarrollo con corriente de nitrógeno, con Rodamina B, reactivo de pulverización al 0,1% (MERCK. R.F.A.). Los lípidos aparecen como manchas de color rosa intenso a la luz ultravioleta.

Se utilizó este revelador ya que no destruye los ácidos grasos y esto permitió su posterior análisis en cromatografía gaseosa.

3.2.5. CROMATOGRAFIA GASEOSA.

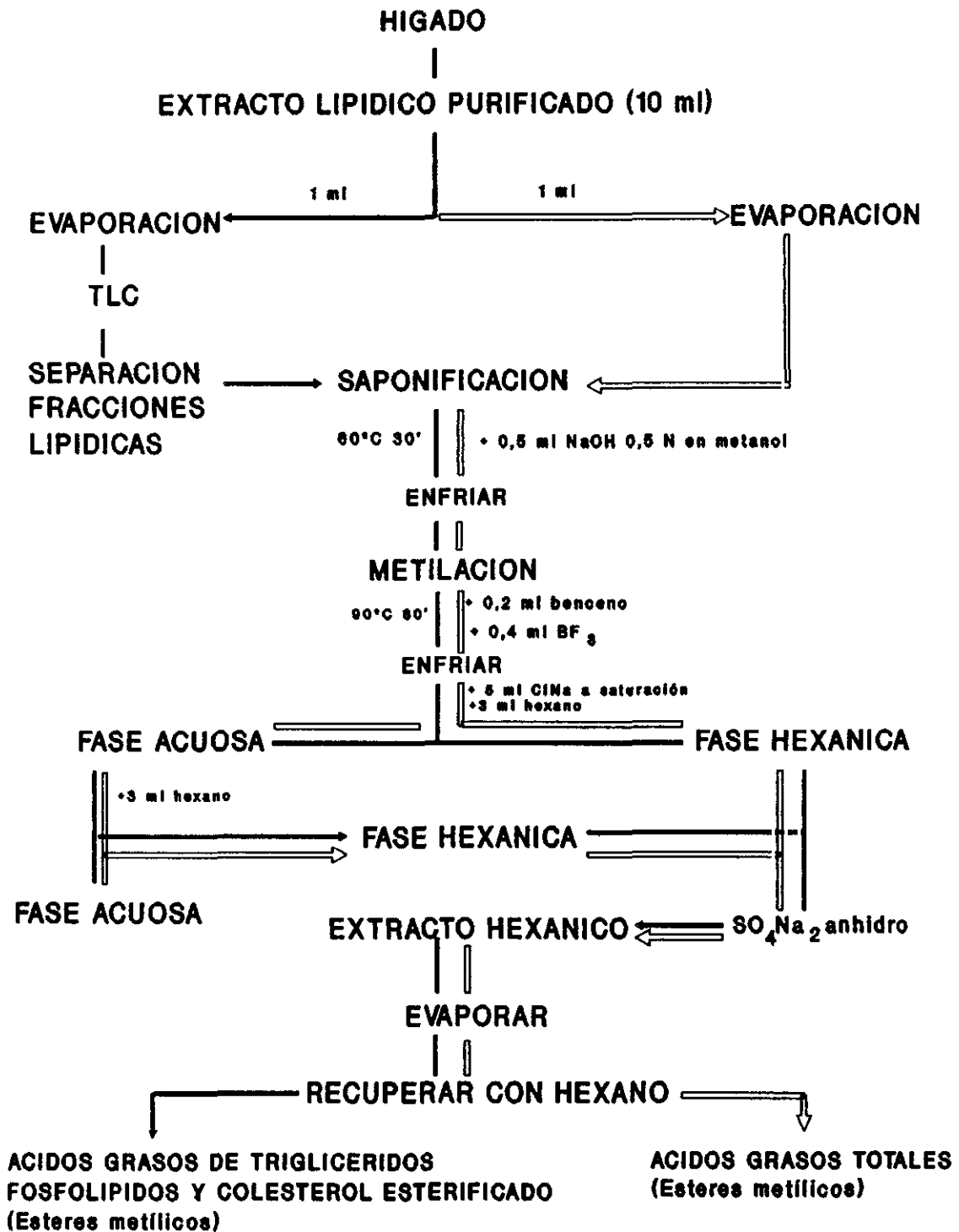
3.2.5.1. OBTENCION DE ESTERES METILICOS.

Una vez separados los diferentes componentes lipídicos por T.L.C., las bandas de colesterol esterificado y triglicéridos se recuperan con 3 ml de cloroformo, en tubos con cierre de teflón y tapón de rosca, procediéndose a la saponificación y metilación de los ácidos grasos, siguiendo la técnica de Metcalfe y col. (1966) modificada por Higón, (1985). Dicho procedimiento aparece en el esquema nº2.

Para la obtención de ésteres metílicos de los ácidos grasos totales hepáticos se procedió de forma similar, sin previa separación en T.L.C.

Por último, para la determinación de los ácidos grasos presentes en la grasa dietaria, ésta se extrajo mediante un método similar a la de extracción y purificación de lípidos hepáticos (apartado 3.2.3.), con posterior saponificación y metilación por la técnica antes citada.

Esquema nº2. OBTENCION DE ESTERES METILICOS.



→ OBTENCION DE ESTERES METILICOS DE LOS ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS, TRIGLICERIDOS Y COLESTEROL ESTERIFICADO.
 ⇨ OBTENCION DE LOS ESTERES METILICOS DE LOS ACIDOS GRASOS TOTALES HEPATICOS.

3.2.5.2.DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS.

Se inyectan 0,5 µl del extracto hexánico concentrado mediante microjeringa HAMILTON de 5 µl.

Se utilizó un cromatógrafo de gases HEWLETT-PACKARD 5710A, con detector de ionización de llama. Las columnas fueron de acero inoxidable de 2 metros de longitud y 1/8 pulgadas de diámetro interno.

La fase estacionaria utilizada fue Supelcoport 2330 al 10% sobre Chromosorb W AW 100-120 (SUPELCO, ESPAÑA).

Las areas de los picos se calcularon con un integrador HEWLETT-PACKARD HP 3394A.

El gas portador utilizado fue nitrógeno con un flujo de 30 ml/min., manteniendose los flujos de hidrógeno a 30 ml/min. y aire hasta 300 ml/min.

La temperatura de trabajo de la columna se programó manteniendose durante 8 minutos a 170°C y elevandose a razón de 2°C/min. hasta 240°C donde se mantuvo durante 4 minutos. La temperatura del detector fue de 300°C y la del inyector de 250°C.

La sensibilidad del electrómetro se fijó en posición 10 y la atenuación en 4.

Bajo estas condiciones se obtuvieron una buena separación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, identificándose por sus tiempos de retención, absolutos y relativos.

El control de calidad de la técnica y control de identificación de los ácidos grasos es descrito por Higón, (1985) y por Medina San Nicolás, (1986).

3.2.6.SEPARACION DE LAS LIPOPROTEINAS.

En la Experiencia B se separó la lipoproteína de alta densidad (HDL) después de precipitar las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL), mediante sulfato de dextrano y cloruro de magnesio, según la técnica indicada por Finley y col. (1978).

En las experiencias A y C la separación de las distintas fracciones lipoproteicas se realizó mediante ultracentrifugación. Esta técnica permite la separación en función de la diferente densidad de las distintas lipoproteínas:

-Quilomicrones: $d < 0,950$ g/ml.

-VLDL: $0,950 < d < 1,0063$ g/ml.

-LDL: $1,0063 < d < 1,057$ g/ml.

-HDL: $1,057 < d < 1,21$ g/ml.

Para ello, se crea un gradiente salino discontinuo y

mediante la fuerza gravitacional conseguimos dicha separación forzando a las lipoproteínas a migrar a su intervalo de densidad.

Se utilizan los métodos de Terpstra y col. (1981) y Terpstra (1985) ligeramente modificados.

Para llevar a cabo la técnica se emplearon tubos de ultracentrifuga (Ultra-Clear™ de BECKMAN) de 5 ml de volumen nominal.

A cada tubo se añadió, en primer lugar, 25 mg de sacarosa, 114,1 mg de BrK y 1 ml de suero. A continuación, se agregó una solución de densidad 1,06 mg/dl hasta un volumen de 3,5 ml. Finalmente, se completó el volumen total del tubo con agua destilada.

La ultracentrifugación se realizó en una ultracentrífuga modelo L8-70M de BECKMAN, empleando un rotor SW 50.1.

En primer lugar se separaron los quilomicrones centrifugando durante 16' a 40.000 r.p.m. y recogiendo la capa superior. Posteriormente, se restableció el volumen de cada tubo con agua destilada y se centrifugó durante 12 h. 47' a 37.000 r.p.m.

Al final de la ultracentrifugación las lipoproteínas se separaron cortando los tubos a la altura adecuada con un cortatubos BECKMAN, pasando cada fracción a un tubo graduado para medir su volumen.

El intervalo de densidad para separar las L.D.L. y las H.D.L.: 1,057 g/ml se escoge dada la diferente densidad de flotación de las H.D.L. de la rata que la del hombre (Terpstra y col., 1981).

Posteriormente, las concentraciones de los distintos lípidos en los quilomicrones se incluyeron en las V.L.D.L. por los bajos valores obtenidos.

3.2.7. OTROS PARAMETROS LIPIDICOS.

3.2.7.1. DETERMINACION DE COLESTEROL TOTAL

Se realizó por el método CHOD-PAP, método enzimático basado en la formación de un compuesto cromógeno, [4-(p-benzoquinona-mo-noimino)-fenazona].

La concentración de colesterol total es proporcional a la concentración de este derivado fenazónico, compuesto que permite su lectura espectrofotométrica y, con ello conocer la concentración del primero.

En nuestro caso utilizamos un kit de BOEHRINGER MANNHEIM (nº 172.626).

Las determinaciones en plasma y lipoproteínas se realizaron directamente. Para las determinaciones en órganos y heces se empleó el extracto lipídico en la mezcla de isopropanol/H₂O (95:5).

La Lectura a 500 nm se realizó en un espectrofotómetro PHILIPS PU8620, en cubeta de 1 cm de paso de luz.

3.2.7.2.DETERMINACION DE COLESTEROL LIBRE.

El fundamento es similar al anterior. El Kit comercial utilizado fue de BOEHRINGER MANNHEIN (nº310.328). La absorbancia se leyó a 500 nm en un espectrofotómetro PHILIPS PU8620, en cubeta de 1 cm de paso de luz.

3.2.7.3.DETERMINACION DE COLESTEROL ESTERIFICADO.

Se realizó por diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre.

3.2.7.4.DETERMINACION DE FOSFOLIPIDOS.

Para la determinación de los fosfolípidos en plasma y lipoproteínas se utilizó un método enzimático comercial (nº 691.844, BOEHRINGER MANNHEIM. R.F.A.), leyendo a 500 nm en un espectrofotómetro PHILIPS PU8620.

En la determinación de los fosfolípidos de hígado y bazo se partió del extracto lipídico en la mezcla de isopropanol/H₂O (95:5).

3.2.7.5.DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS.

En plasma y lipoproteínas se determinó la concentración de los triglicéridos empleó un kit enzimático comercial (nº 701.904 BOEHRINGER MANNHEIN. R.F.A.).

En hígado y bazo se determinó, tal y como indican Quazi y col. (1983), restando a los lípidos totales la suma de fosfolípidos más colesterol total.

3.2.7.6.CONTROL DE CALIDAD.

Se siguieron las normas de control de calidad del LIPID RESEARCH CLINICS PROGRAM, tal y como describe Cava (1986).

Como control externo se utilizó soluciones clorofórmicas de estándares lipídicos de concentración conocida y, como control interno, solución clorofórmica de extracto lipídico de hígado obtenida siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.2.3.

3.2.8.DETERMINACION DE LOS ACIDOS BILIARES.

La extracción de los ácidos biliares totales en heces se realizó según el método de De Wael y col. (1977), valorándose los mismos por espectrofluorimetría (Codoceo y col., 1980), empleando para ello el kit comercial Sterognost-3 α^R Pho (Nyegaard & Co. A/S, Noruega). El espectrofluorímetro empleado fue Perkin-Elmer 204.

3.3.INDICES UTILIZADOS.

COEFICIENTE DE EFICACIA ALIMENTARIA (C.E.A.): obtenido como el cociente entre el incremento de peso y los gramos de dieta ingeridos sobre sustancia seca.

COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA (P.E.R.): se obtiene como el cociente entre el incremento de peso y los gramos de proteína ingerida.

INDICE HEPATOSOMATICO: se calcula dividiendo el peso del hígado (sobre sustancia fresca) por el peso corporal, multiplicando el resultado por 100.

3.4.METODO ESTADISTICO.

Se escogió la prueba de KRUSKAL-WALLIS, equivalente no paramétrico del análisis de varianza, la comparación entre los grupos se realizó mediante la prueba U de MANN-WHITNEY (Domenech, 1982). Las pruebas no paramétricas permiten comparar grupos sin que el carácter estudiado siga una determinada ley de probabilidad en la población origen.

Estas pruebas no paramétricas se emplean en el estudio de datos ordinales y con datos cuantitativos cuando el tamaño de los grupos es pequeño (n menor de 30), como ocurre en nuestro caso.

La prueba U de MANN-WHITNEY no permite estudiar diferencias entre las dispersiones, sino que sólo sirve para estudiar diferencias entre la tendencia central de las poblaciones origen de ambas muestras.

Los resultados se consideran diferentes significativamente para una $p < 0,05$.

4. RESULTADOS.

4.1. EXPRESION DE LOS RESULTADOS.

Como se ha comentado en el esquema experimental para cubrir los 3 objetivos se han llevado a cabo 3 diseños experimentales diferentes que denominaremos A, B y C.

En ellos los lotes que ingieren caseína más aceite de oliva se abrevian como C+O. Cuando esta dieta contenga colesterol se abreviará como C+O+Col.

Cuando las dietas contengan sardinas fritas en aceite de oliva adicionadas o no de colesterol se abrevian como S ó S+Col, respectivamente. En la Experiencia B existe un lote que no ingiere dietas suplementadas con colesterol ni en el periodo preexperimental ni en el experimental, que denominaremos Lote REFERENCIA.

Por último, las dietas conteniendo caseína más aceite extraído de sardinas fritas en aceite de oliva (Experiencia C) se abrevian como C+AS.

También, se recogen datos de los animales de partida de aproximadamente 65 g de peso (Experiencia A). Estos animales que denominamos Lote BASAL, reciben durante el periodo de adaptación dieta estándar de laboratorio.

Los resultados se expresan mediante tablas y gráficas que recogen los datos obtenidos durante un periodo total de 35 días, subdividido en 2 etapas: preexperimental (0-21 días) y experimental (22-35 días). En la Experiencia A los datos expresados corresponden al periodo preexperimental.

Los valores representan el valor medio y el error estándar de 7 determinaciones por cada lote experimental. Para el caso de las dietas el número de determinaciones es de 3.

Los lotes con valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) se identifican acompañando los valores con supraíndices (letras) diferentes. Si no aparecen supraíndices indica que no existen tales diferencias.

Las tablas 1 a la 13 y las gráficas 1 a la 20 corresponden a la Experiencia A, las tablas 14 a la 29 y las gráficas 21 a la 36 a la Experiencia B y las tablas 30 a la 43 y las gráficas 37 a la 56 a la Experiencia C.

TABLA 1. COMPOSICION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA A)

	DIETA C+O	DIETA C+O+Col
PROTEINA (% s.f.)	14,53±0,20	14,60±0,23
GRASA (% s.f.)	9,25±0,18	10,23±0,14
HUMEDAD (%)	5,51±0,02	5,62±0,08
PROTEINA (% s.s.)	15,38±0,02	15,47±0,02
GRASA (% s.s.)	9,79±0,02	10,84±0,01
COLESTEROL AÑADIDO (2 g/100 g dieta)	NO	SI
ACIDOS GRASOS: (% del total de ácidos grasos)		
-C _{16:0}	10,60±0,06	11,06±0,08
-C _{16:1} n-7	0,90±0,04	0,86±0,04
-C _{18:0}	3,60±0,04	3,71±0,03
-C _{18:1} n-9	77,92±0,20	75,87±0,35
-C _{18:2} n-6	6,54±0,05	6,90±0,18
-C _{18:3} n-3	0,30±0,00	0,39±0,07
-C _{20:5} n-3	-	-
-C _{22:6} n-3	-	-
-MONOINSATURADOS	77,92±0,18	76,73±0,31
-SATURADOS	15,17±0,15	15,84±0,06
-PUFAS n-3	0,30±0,00	0,39±0,07
-PUFAS n-6	6,65±0,05	7,04±0,20
P/S	0,46±0,00	0,47±0,02
n-6/n-3	22,12±0,17	19,20±3,36

TABLA 2. INGESTA (en gramos) DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA A).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
TOTAL	223,78±6,45	221,48±12,59
PROTEINA	34,41±0,99	34,26±1,95
GRASA	21,91±0,63	19,58±1,11
COLESTEROL AÑADIDO	- *	4,43±0,25
ACIDOS GRASOS:		
-C _{16:0}	2,22±0,07	2,07±0,12
-C _{16:1} n-7	0,19±0,01	0,16±0,01
-C _{18:0}	0,75±0,02	0,71±0,04
-C _{18:1} n-9	16,13±0,46	14,20±0,81
-C _{18:2} n-6	1,37±0,04	1,29±0,07
-C _{18:3} n-3	0,06±0,00	0,07±0,00
-C _{20:5} n-3	-	-
-C _{22:6} n-3	-	-
-MONOINSATURADOS	16,32±0,47	14,36±0,82
-SATURADOS	3,18±0,09	2,96±0,17
-PUFAS n-3	0,06±0,00	0,07±0,00
-PUFAS n-6	1,39±0,04	1,32±0,07

* p<0,05

TABLA 3. GANANCIA DE PESO, COEFICIENTE DE EFICACIA ALIMENTARIA (C.E.A.) Y COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA (P.E.R.). (EXPERIENCIA A)

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
GANANCIA DE PESO	95,56±3,82	92,50±6,59
C.E.A.	0,43±0,01	0,42±0,01
P.E.R.	2,78±0,09	2,69±0,08

TABLA 4. PESO, INDICE RELATIVO HEPATOSOMATICO Y COMPOSICION PORCENTUAL EN HUMEDAD Y GRASA (s.s. y s.f.) DE LOS HIGADOS ESTUDIADOS. (EXPERIENCIA A).

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Co1
PESO (g) s.f.	2,04±0,07 ^a	5,40±0,14 ^b	7,66±0,51 ^c
PESO (g) s.s.	0,55±0,03 ^a	1,53±0,04 ^b	3,16±0,24 ^c
GRASA (% s.f.)	3,47±0,24 ^a	4,16±0,12 ^b	19,65±0,60 ^c
GRASA (% s.s.)	12,81±0,72 ^a	14,71±0,36 ^a	48,07±2,11 ^b
HUMEDAD (%)	73,02±0,67 ^a	71,72±0,32 ^a	58,92±1,04 ^b
INDICE HEPATOSOMATICO Φ	3,19±0,12 ^a	3,18±0,06 ^a	4,54±0,14 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

Φ Índice hepatosomático= (peso hígado (s.f.)/peso corporal) * 100.

TABLA 5a. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg/g sustancia fresca) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA A).

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
COLESTEROL TOTAL	3,34±0,12 ^a	3,35±0,28 ^a	62,94±5,75 ^b
COLESTEROL LIBRE	2,94±0,16 ^a	2,63±0,13 ^a	12,39±1,86 ^b
COLESTEROL ESTERIFICADO	0,6±0,05 ^a	0,84±0,29 ^a	50,55±4,05 ^b
FOSFOLIPIDOS	9,94±0,85 ^a	12,43±1,21 ^a	25,66±3,83 ^b
TRIGLICERIDOS	21,42±1,76 ^a	25,83±1,52 ^a	107,89±5,63 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 5b. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg/g sustancia seca) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA A).

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
COLESTEROL TOTAL	12,41±0,58 ^a	11,83±0,98 ^a	153,89±14,74 ^b
COLESTEROL LIBRE	10,98±0,79 ^a	9,28±0,42 ^a	30,25±4,72 ^b
COLESTEROL ESTERIFICADO	2,13±0,15 ^a	2,98±1,00 ^a	123,64±10,51 ^b
FOSFOLIPIDOS	36,62±2,70 ^a	43,84±4,06 ^{a,b}	62,23±8,97 ^b
TRIGLICERIDOS	79,05±5,77 ^a	91,43±5,51 ^a	264,59±18,46 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 5c. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg/g de grasa) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA A).

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
COLESTEROL TOTAL	98,66±7,53 ^a	80,33±6,11 ^a	318,64±23,71 ^b
COLESTEROL LIBRE	87,26±8,40 ^a	63,23±3,04 ^b	62,22±8,14 ^{a,b}
COLESTEROL ESTERIFICADO	16,51±0,73 ^a	19,96±6,52 ^a	256,42±16,87 ^b
FOSFOLIPIDOS	286,64±17,12 ^a	299,81±29,28 ^a	132,46±22,29 ^b
TRIGLICERIDOS	614,70±15,64	619,87±28,81	548,90±22,62

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 5d. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS , TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg totales) Y RELACION COLESTEROL LIBRE/COLESTEROL ESTERIFICADO EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA A).

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
COLESTEROL TOTAL	6,80±0,36 ^a	18,10±1,62 ^b	487,31±63,92 ^c
COLESTEROL LIBRE (CL)	6,00±0,46 ^a	14,16±0,72 ^b	97,68±18,64 ^c
COLESTEROL ESTERIFICADO (CE)	1,20±0,11 ^a	4,59±1,55 ^b	389,63±45,92 ^c
FOSFOLIPIDOS	20,49±2,12 ^a	66,49±5,65 ^b	202,36±38,30 ^c
TRIGLICERIDOS	44,13±4,73 ^a	140,13±10,87 ^b	812,75±38,25 ^c
CL/CE	4,71±0,46 ^a	4,59±1,02 ^a	0,24±0,02 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 6. COMPOSICION HEPATICA EN ACIDOS GRASOS (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS). RELACIONES $C_{16:1}/C_{16:0}$, $C_{18:1}/C_{18:0}$, $C_{20:4}/C_{18:2}$ Y $C_{22:6}/C_{18:3}$ (EXPERIENCIA A)

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
$C_{16:0}$	16,06±0,77 ^{a,b}	16,29±0,19 ^a	15,12±1,20 ^b
$C_{16:1}$ n-7	0,72±0,05 ^a	1,37±0,05 ^b	6,18±0,48 ^c
$C_{18:0}$	20,28±1,10 ^a	18,91±0,41 ^a	4,73±0,51 ^b
$C_{18:1}$ n-9	9,57±1,06 ^a	22,27±1,03 ^b	59,71±2,22 ^c
$C_{18:2}$ n-6	13,70±2,12 ^a	6,45±0,15 ^b	3,76±0,59 ^c
$C_{18:3}$ n-3	0,39±0,09 ^a	0,46±0,15 ^b	0,84±0,21 ^c
$C_{20:4}$ n-6	24,36±1,18 ^a	23,53±0,43 ^a	5,13±0,43 ^b
$C_{20:5}$ n-3	0,55±0,18 ^a	0,26±0,10 ^a	0,06±0,03 ^b
$C_{22:6}$ n-3	6,69±0,44 ^a	5,49±0,09 ^b	1,00±0,26 ^c
MONOINSAT.	10,50±1,05 ^a	23,71±1,05 ^b	66,20±0,49 ^c
SATURADOS	37,28±1,14 ^a	35,77±0,48 ^b	20,86±0,49 ^c
PUFAS n-3	8,87±0,56 ^a	6,63±0,18 ^b	2,18±0,36 ^c
PUFAS n-6	38,36±1,12 ^a	30,53±0,42 ^b	9,15±0,29 ^c
$C_{16:1} / C_{16:0}$	0,04±0,00 ^a	0,22±0,13 ^b	0,41±0,02 ^c
$C_{18:1} / C_{18:0}$	0,50±0,09 ^a	1,19±0,08 ^b	12,76±0,58 ^c
$C_{20:4} / C_{18:2}$	1,99±0,23 ^a	3,66±0,13 ^b	1,39±0,08 ^c
$C_{22:6} / C_{18:3}$	19,94±2,42 ^a	12,06±0,06 ^b	1,28±0,30 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 7. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LOS TRIGLICERIDOS HEPATICOS (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS). (EXPERIENCIA A)

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
C _{16:0}	17,69±2,37 ^a	26,46±0,67 ^b	27,80±1,02 ^b
C _{16:1} n-7	2,12±0,87	2,53±0,11	2,95±0,51
C _{18:0}	9,65±1,40 ^a	4,20±0,49 ^b	1,88±0,30 ^c
C _{18:1} n-9	29,31±2,76 ^a	50,20±1,19 ^b	60,58±0,94 ^c
C _{18:2} n-6	26,80±6,28 ^a	5,69±0,37 ^b	3,40±0,46 ^c
C _{18:3} n-3	0,74±0,09	1,55±0,26	1,07±0,24
C _{20:4} n-6	9,29±2,50 ^a	6,09±0,44 ^a	0,00±0,00 ^b
C _{20:5} n-3	1,98±0,83 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
C _{22:6} n-3	2,32±0,92 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
MONOINSAT.	31,56±2,91 ^a	53,94±1,20 ^b	64,60±1,02 ^c
SATURADOS	29,62±4,07	32,62±1,04	30,56±1,08
PUFAS n-3	5,41±1,91 ^a	1,55±0,26 ^b	1,07±0,24 ^b
PUFAS n-6	34,88±4,32 ^a	11,78±0,43 ^b	3,40±0,46 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 8. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLIPIDOS HEPATICOS (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS). (EXPERIENCIA A)

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
C _{16:0}	14,27±0,67	12,64±1,92	15,06±0,45
C _{16:1} n-7	0,40±0,21 ^a	0,84±0,16 ^a	1,60±0,16 ^b
C _{18:0}	23,02±0,75 ^{a,b}	24,53±0,62 ^a	19,69±0,82 ^b
C _{18:1} n-9	6,86±0,39 ^a	13,86±0,60 ^b	22,66±0,83 ^c
C _{18:2} n-6	11,26±0,52 ^a	6,65±0,19 ^b	7,60±0,50 ^b
C _{18:3} n-3	0,34±0,22	0,53±0,13	0,91±0,25
C _{20:4} n-6	24,97±0,67 ^a	28,42±0,87 ^b	21,76±1,62 ^a
C _{20:5} n-3	0,64±0,28 ^a	0,16±0,12 ^b	0,17±0,05 ^b
C _{22:6} n-3	7,07±0,36 ^a	6,39±0,44 ^a	3,94±0,33 ^b
MONOINSAT.	7,81±0,67 ^a	15,14±0,79 ^b	25,58±0,84 ^c
SATURADOS	39,54±0,48 ^a	37,83±1,26 ^{a,b}	35,66±1,07 ^b
PUFAS n-3	9,50±0,53 ^a	7,48±0,46 ^b	5,53±0,29 ^c
PUFAS n-6	36,59±0,77 ^a	35,70±0,86 ^a	30,44±1,53 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 9. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL COLESTEROL ESTERIFICADO HEPATICO (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS). (EXPERIENCIA A)

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
C _{16:0}	22,38±1,12 ^a	16,03±0,83 ^b	13,18±0,66 ^c
C _{16:1} n-7	3,78±0,76 ^a	4,61±0,74 ^a	9,18±0,68 ^b
C _{18:0}	13,00±1,78 ^a	5,52±0,65 ^b	1,06±0,10 ^c
C _{18:1} n-9	30,53±2,25 ^a	55,50±3,09 ^b	71,17±1,34 ^c
C _{18:2} n-6	9,29±2,11 ^a	4,44±0,44 ^b	2,40±0,21 ^c
C _{18:3} n-3	0,73±0,50 ^{a,b}	1,24±0,16 ^a	0,56±0,17 ^b
C _{20:4} n-6	14,23±2,75 ^a	8,92±0,86 ^a	0,63±0,15 ^b
C _{20:5} n-3	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C _{22:6} n-3	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
MONOINSAT.	34,55±2,25 ^a	60,81±2,66 ^b	80,64±0,79 ^c
SATURADOS	39,95±2,57 ^a	23,78±1,73 ^b	15,30±0,69 ^c
PUFAS n-3	0,73±0,50 ^{a,b}	1,24±0,16 ^a	0,56±0,17 ^b
PUFAS n-6	24,23±3,09 ^a	13,55±1,26 ^b	3,06±0,27 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 10a. VALORES PLASMATICOS DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS (en mg/dl) Y COCIENTE COLESTEROL TOTAL/FOSFOLIPIDOS. (EXPERIENCIA A).

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
COLESTEROL TOTAL (CT)	87,20±7,60 ^a	74,68±3,42 ^a	184,76±15,15 ^b
COLESTEROL LIBRE	14,01±1,73 ^a	13,12±1,01 ^a	30,85±2,69 ^b
COLESTEROL ESTERIFICADO	72,33±6,68 ^a	61,56±2,96 ^a	153,93±12,70 ^b
FOSFOLIPIDOS (FOSFO)	108,47±12,28	134,63±4,67	119,98±4,61
TRIGLICERIDOS	17,90±1,75 ^a	75,35±7,31 ^b	39,01±7,95 ^c
CT/FOSFO	0,74±0,02 ^a	0,56±0,02 ^b	1,53±0,09 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 10b. VALORES PLASMATICOS DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS (en mmol/l). (EXPERIENCIA A).

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
COLESTEROL TOTAL	2,26±0,20 ^a	1,93±0,09 ^a	4,79±0,39 ^b
COLESTEROL LIBRE	0,36±0,04 ^a	0,34±0,03 ^a	0,80±0,07 ^b
COLESTEROL ESTERIFICADO	1,87±0,17 ^a	1,59±0,08 ^a	3,99±0,33 ^b
FOSFOLIPIDOS	1,40±0,16	1,74±0,06	1,55±0,06
TRIGLICERIDOS	0,20±0,02 ^a	0,85±0,08 ^b	0,44±0,09 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 11a. CONCENTRACION LIPIDICA PLASMATICA (mg/dl) EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS. (EXPERIENCIA A)

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
VLDL			
COLESTEROL TOTAL	2,68±0,41 ^a	8,09±1,32 ^b	127,09±16,40 ^c
COLESTEROL LIBRE	0,06±0,05 ^a	3,44±0,51 ^b	18,64±2,01 ^c
COLESTEROL ESTERIFICADO	2,62±0,38 ^a	4,65±1,22 ^b	108,45±14,49 ^c
FOSFOLIPIDOS	1,41±0,09 ^a	10,44±1,38 ^b	43,51±4,20 ^c
TRIGLICERIDOS	4,56±0,48 ^a	43,18±5,71 ^b	21,77±5,79 ^c
LDL			
COLESTEROL TOTAL	13,82±1,85 ^a	6,39±0,90 ^b	29,31±3,18 ^c
COLESTEROL LIBRE	4,04±0,49 ^a	2,35±0,40 ^b	6,43±0,52 ^c
COLESTEROL ESTERIFICADO	9,78±1,50 ^a	4,04±0,69 ^b	22,88±2,74 ^c
FOSFOLIPIDOS	8,79±0,92 ^a	7,69±0,87 ^a	15,50±1,16 ^b
TRIGLICERIDOS	5,35±0,61	7,46±0,78	4,32±1,40
HDL			
COLESTEROL TOTAL	67,58±5,18 ^a	58,35±3,07 ^a	22,70±2,69 ^b
COLESTEROL LIBRE	11,73±1,17 ^a	7,11±0,83 ^b	3,91±0,35 ^c
COLESTEROL ESTERIFICADO	55,85±4,45 ^a	51,24±2,42 ^a	18,81±2,37 ^b
FOSFOLIPIDOS	91,87±7,14 ^a	108,15±4,83 ^a	52,68±4,43 ^b
TRIGLICERIDOS	7,49±0,50 ^a	17,51±1,52 ^b	14,48±2,21 ^{a,b}

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 11b. CONCENTRACION LIPIDICA PLASMATICA (mmol/l) EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS. (EXPERIENCIA A)

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
VLDL			
COLESTEROL TOTAL	0,07±0,01 ^a	0,21±0,03 ^b	3,27±0,42 ^c
COLESTEROL LIBRE	0,00±0,00 ^a	0,09±0,01 ^b	0,48±0,05 ^c
COLESTEROL ESTERIFICADO	0,07±0,01 ^a	0,12±0,03 ^b	2,81±0,38 ^c
FOSFOLIPIDOS	0,02±0,00 ^a	0,13±0,02 ^b	0,56±0,05 ^c
TRIGLICERIDOS	0,05±0,01 ^a	0,49±0,06 ^b	0,25±0,07 ^c
LDL			
COLESTEROL TOTAL	0,36±0,05 ^a	0,17±0,02 ^b	0,76±0,08 ^c
COLESTEROL LIBRE	0,10±0,01 ^a	0,06±0,01 ^b	0,17±0,01 ^c
COLESTEROL ESTERIFICADO	0,25±0,04 ^a	0,10±0,02 ^b	0,59±0,07 ^c
FOSFOLIPIDOS	0,11±0,01 ^a	0,10±0,01 ^a	0,20±0,02 ^b
TRIGLICERIDOS	0,06±0,01	0,08±0,01	0,05±0,02
HDL			
COLESTEROL TOTAL	1,75±0,13 ^a	1,51±0,087 ^a	0,59±0,07 ^b
COLESTEROL LIBRE	0,30±0,03 ^a	0,18±0,02 ^b	0,10±0,01 ^c
COLESTEROL ESTERIFICADO	1,45±0,12 ^a	1,33±0,06 ^a	0,49±0,06 ^b
FOSFOLIPIDOS	1,19±0,09 ^a	1,40±0,06 ^a	0,68±0,06 ^b
TRIGLICERIDOS	0,08±0,01 ^a	0,20±0,02 ^b	0,15±0,03 ^{a,b}

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 12. COMPOSICION LIPIDICA (%) DE LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS PLAMATICAS. (EXPERIENCIA A)

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
VLDL			
COLESTEROL TOTAL	30,48±3,25 ^a	13,07±1,17 ^b	65,67±1,98 ^c
COLESTEROL LIBRE	0,62±0,42 ^a	5,60±0,53 ^b	9,86±0,41 ^c
COLESTEROL ESTERIFICADO	29,87±3,01 ^a	7,46±1,66 ^b	55,81±1,98 ^c
FOSFOLIPIDOS	16,73±1,22 ^a	16,91±0,43 ^a	23,14±0,92 ^b
TRIGLICERIDOS	52,79±3,62 ^a	70,03±1,47 ^b	11,20±1,87 ^c
LDL			
COLESTEROL TOTAL	48,87±1,83 ^a	30,55±3,34 ^b	58,98±3,26 ^a
COLESTEROL LIBRE	14,83±1,74	10,69±1,70	13,10±0,51
COLESTEROL ESTERIFICADO	34,04±1,90 ^a	19,87±3,05 ^b	45,87±3,21 ^c
FOSFOLIPIDOS	31,80±1,12	35,21±3,15	31,62±1,01
TRIGLICERIDOS	19,33±1,24 ^{a,b}	34,25±4,76 ^a	9,41±3,49 ^b
HDL			
COLESTEROL TOTAL	40,46±0,56 ^a	31,68±0,93 ^b	25,38±1,72 ^c
COLESTEROL LIBRE	7,04±0,51 ^a	3,81±0,32 ^b	4,43±0,29 ^b
COLESTEROL ESTERIFICADO	33,42±0,75 ^a	27,87±0,88 ^b	20,95±1,50 ^c
FOSFOLIPIDOS	55,03±0,55 ^a	58,75±0,92 ^b	59,43±1,92 ^b
TRIGLICERIDOS	4,51±0,16 ^a	9,57±0,84 ^b	15,19±2,24 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 13. DISTRIBUCION (%) DE LOS LIPIDOS SERICOS EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS. (EXPERIENCIA A)

	BASAL	LOTE C+O	LOTE C+O+Col
COLESTEROL TOTAL			
VLDL	3,09±0,29 ^a	11,20±1,74 ^b	69,61±3,85 ^c
LDL	15,99±0,97 ^a	8,76±1,15 ^b	16,62±1,52 ^a
HDL	80,29±1,02 ^a	79,90±1,39 ^a	13,53±2,66 ^b
COLESTEROL LIBRE			
VLDL	0,31±0,22 ^a	26,83±3,67 ^b	63,53±3,27 ^c
LDL	25,31±0,82 ^a	18,75±3,54 ^a	22,63±2,05 ^a
HDL	74,39±0,96 ^a	54,42±3,35 ^b	13,81±1,64 ^c
COLESTEROL ESTERIFICADO			
VLDL	3,75±0,35 ^a	7,73±1,91 ^a	70,98±4,02 ^b
LDL	13,80±1,14 ^a	6,66±1,07 ^b	15,47±1,46 ^a
HDL	81,67±1,11 ^a	85,61±2,02 ^a	13,55±2,89 ^b
FOSFOLIPIDOS			
VLDL	1,41±0,09 ^a	8,27±1,08 ^b	38,63±3,34 ^c
LDL	8,58±0,50 ^a	6,20±0,88 ^a	13,83±1,08 ^b
HDL	90,02±0,47 ^a	85,16±1,02 ^b	46,83±3,70 ^c
TRIGLICERIDOS			
VLDL	25,99±3,35 ^a	62,66±2,46 ^b	51,47±4,94 ^b
LDL	29,60±2,46 ^a	11,37±0,88 ^b	12,54±3,98 ^b
HDL	41,77±1,27 ^a	26,65±2,54 ^b	33,15±2,58 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 14. COMPOSICION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA B)

	DIETA C+O	DIETA C+O+Col	DIETA S	DIETA S+Col
PROTEINA (% s.f.)	13,69±0,43	13,02±0,67	13,90±0,13	13,60±0,61
GRASA (% s.f.)	8,36±0,07	11,21±0,13	9,16±0,17	11,49±0,01
HUMEDAD (%)	6,21±0,15	6,14±0,06	6,13±0,01	5,59±0,01
PROTEINA (% s.s.)	14,60±0,43	13,87±0,67	14,81±0,13	14,41±0,61
GRASA (% s.s.)	8,91±0,07	11,87±0,13	9,76±0,17	12,17±0,01
COLESTEROL AÑADIDO (2 g/100 g dieta)	NO	SI	NO	SI
ACIDOS GRASOS: (% del total de ácidos grasos)				
-C _{16:0}	12,26±0,28	11,87±0,15	13,12±0,22	13,90±0,50
-C _{16:1} n-7	0,72±0,02	0,67±0,04	1,10±0,07	1,07±0,12
-C _{18:0}	3,68±0,05	3,60±0,00	3,84±0,05	4,37±0,67
-C _{18:1} n-9	76,46±0,27	77,13±0,32	70,13±0,66	68,93±0,12
-C _{18:2} n-6	4,73±0,06	4,70±0,00	4,36±0,14	4,10±0,06
-C _{18:3} n-3	0,92±0,06	0,73±0,06	1,61±0,21	1,20±0,17
-C _{20:5} n-3	-	-	0,98±0,16	1,43±0,45
-C _{22:6} n-3	-	-	2,19±0,38	2,43±0,84
-MONOINSATURADOS	77,33±0,25	77,95±0,35	71,52±0,66	70,10±0,03
-SATURADOS	16,87±0,26	16,36±0,18	18,14±0,37	19,67±1,07
-PUFAS n-3	0,92±0,06	0,73±0,06	5,26±0,30	4,80±0,05
-PUFAS n-6	4,87±0,05	5,02±0,08	5,08±0,16	5,47±1,08
P/S	0,34±0,00	0,35±0,01	0,57±0,02	0,53±0,08
n-6/n-3	5,33±0,40	6,94±0,06	0,97±0,06	0,98±0,25

TABLA 15a. INGESTA (en gramos) DE LOS LOTES EXPERIMENTALES (0-21 Días). (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
TOTAL	235,71±11,56	237,76±10,11	233,69±7,20	231,96±9,54	245,44±11,34
PROTEINA	32,69±1,60	32,98±1,40	32,41±1,00	32,17±1,32	35,83±1,66
GRASA	23,27±1,14	23,47±1,00	23,07±0,71	22,90±0,94	21,87±1,01
COLESTEROL AÑADIDO	4,71±0,23	4,76±0,20	4,67±0,14	4,64±0,19	- *
ACIDOS GRASOS:					
-C _{16:0}	2,64±0,13	2,66±0,11	2,62±0,08	2,60±0,11	2,56±0,12
-C _{16:1} n-7	0,15±0,01	0,15±0,01	0,15±0,00	0,15±0,01	0,15±0,01
-C _{18:0}	0,80±0,04	0,81±0,03	0,79±0,02	0,79±0,03	0,77±0,04
-C _{18:1} n-9	17,16±0,84	17,31±0,74	17,01±0,52	16,88±0,69	15,99±0,74
-C _{18:2} n-6	1,05±0,05	1,06±0,05	1,04±0,03	1,03±0,04	0,99±0,05
-C _{18:3} n-3	0,16±0,01	0,16±0,05	0,16±0,01	0,16±0,01	0,19±0,01
-C _{20:5} n-3	-	-	-	-	-
-C _{22:6} n-3	-	-	-	-	-
-MONOINSATURADOS	17,34±0,85	17,49±0,74	17,19±0,53	17,06±0,70	16,17±0,75
-SATURADOS	3,64±0,18	3,67±0,16	3,61±0,11	3,58±0,15	3,53±0,16
-PUFAS n-3	0,16±0,01	0,16±0,01	0,16±0,01	0,16±0,01	0,19±0,01
-PUFAS n-6	1,12±0,06	1,13±0,05	1,11±0,03	1,10±0,05	1,02±0,05

* Diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05) con el resto de los lotes.

TABLA 15b. INGESTA (en gramos) DE LOS LOTES EXPERIMENTALES (22-35 Días). (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
TOTAL	221,29±8,65	218,20±10,86	243,57±5,29	233,93±10,20	221,09±8,18
PROTEINA	32,31±1,26 ^{a,b}	30,26±1,51 ^a	36,07±0,78 ^b	33,71±1,47 ^{a,b}	32,28±1,19 ^{a,b}
GRASA	19,72±0,77 ^a	21,54±1,07 ^{a,b}	23,77±0,52 ^b	23,79±1,04 ^b	19,70±0,72 ^a
COLESTEROL AÑADIDO	0,00±0,00 ^a	4,36±0,22 ^b	0,00±0,00 ^a	4,68±0,20 ^b	0,00±0,00 ^a
ACIDOS GRASOS:					
-C _{16:0}	2,31±0,09 ^a	2,44±0,12 ^a	2,89±0,06 ^b	3,07±0,13 ^b	2,31±0,09 ^a
-C _{16:1} n-7	0,13±0,01 ^a	0,14±0,01 ^a	0,24±0,01 ^b	0,24±0,01 ^b	0,14±0,01 ^a
-C _{18:0}	0,69±0,03 ^a	0,74±0,04 ^{a,b}	0,85±0,02 ^{b,c}	0,96±0,04 ^c	0,69±0,03 ^a
-C _{18:1} n-9	14,41±0,56	15,88±0,79	15,47±0,34	15,22±0,66	14,40±0,53
-C _{18:2} n-6	0,89±0,04	0,97±0,05	0,96±0,02	0,91±0,04	0,89±0,03
-C _{18:3} n-3	0,17±0,01 ^a	0,15±0,01 ^a	0,35±0,01 ^b	0,26±0,01 ^c	0,17±0,01 ^a
-C _{20:5} n-3	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,21±0,00 ^b	0,32±0,01 ^c	0,00±0,00 ^a
-C _{22:6} n-3	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,48±0,01 ^b	0,54±0,02 ^b	0,00±0,00 ^a
-MONOINSATURADOS	14,58±0,57	16,05±0,80	15,78±0,34	15,48±0,67	14,56±0,54
-SATURADOS	3,18±0,13 ^a	3,37±0,17 ^a	4,00±0,09 ^b	4,34±0,19 ^b	3,18±0,12 ^a
-PUFAS n-3	0,17±0,01 ^a	0,15±0,01 ^a	1,16±0,02 ^b	1,21±0,05 ^b	0,17±0,01 ^a
-PUFAS n-6	0,92±0,04 ^a	1,03±0,05 ^{a,b}	1,12±0,02 ^b	1,06±0,05 ^{a,b}	0,92±0,03 ^a

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 15c. INGESTA (en gramos) DE LOS LOTES EXPERIMENTALES (0-35 Días). (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
TOTAL	457,00±19,83	445,96±20,30	447,26±11,58	465,89±18,74	466,53±17,70
PROTEINA	65,00±2,81	63,24±2,82	68,48±1,65	65,88±2,66	68,11±2,58
GRASA	42,98±1,88	45,00±2,00	46,85±1,13	46,68±1,88	41,57±1,58
COLESTEROL AÑADIDO	4,71±0,23 ^a	9,12±0,40 ^b	4,67±0,14 ^a	9,32±0,37 ^b	0,00±0,00 ^c
ACIDOS GRASOS:					
-C _{16:0}	4,95±0,22 ^{a,c}	5,11±0,23 ^{a,b}	5,51±0,01 ^{b,c}	5,67±0,23 ^{b,d}	4,87±0,18 ^{a,d}
-C _{16:1} n-7	0,29±0,01 ^a	0,29±0,01 ^a	0,39±0,04 ^b	0,38±0,02 ^b	0,29±0,01 ^a
-C _{18:0}	1,49±0,06 ^{a,c}	1,55±0,07 ^{a,b}	1,64±0,80 ^{b,c}	1,75±0,07 ^b	1,46±0,06 ^a
-C _{18:1} n-9	31,57±1,38	33,19±1,48	32,48±0,05	32,10±1,29	30,39±1,15
-C _{18:2} n-6	1,94±0,08	2,02±0,09	2,00±0,05	1,93±0,08	1,88±0,07
-C _{18:3} n-3	0,34±0,01 ^{a,d}	0,31±0,01 ^a	0,52±0,01 ^c	0,42±0,02 ^b	0,37±0,01 ^{b,d}
-C _{20:5} n-3	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,21±0,00 ^b	0,32±0,01 ^c	0,00±0,00 ^a
-C _{22:6} n-3	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,48±0,01 ^b	0,54±0,02 ^b	0,00±0,00 ^a
-MONOINSAT.	31,91±1,39	33,54±1,49	32,97±0,81	32,54±1,31	30,73±1,17
-SATURADOS	6,82±0,30 ^{a,d}	7,04±0,31 ^{a,b}	7,61±0,18 ^{b,d}	7,92±0,32 ^{b,c}	6,70±0,26 ^{a,c}
-PUFAS n-3	0,33±0,02 ^{a,c}	0,31±0,01 ^a	1,32±0,03 ^b	1,36±0,06 ^b	0,37±0,01 ^c
-PUFAS n-6	2,03±0,09	2,16±0,10	2,23±0,05	2,16±0,09	1,93±0,07

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 16. GANANCIA DE PESO DURANTE LOS DISTINTOS PERIODOS. (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Co1	LOTE S	LOTE S+Co1	LOTE REFERENCIA
0-21 DIAS	102,29±8,37	94,37±9,37	97,23±4,33	90,66±9,374	105,89±7,07
22-35 DIAS	76,19±8,26 ^{a,b}	70,34±4,44 ^{a,b}	77,84±7,96 ^{a,b}	80,54±3,49 ^a	61,99±3,95 ^b
0-35 DIAS	178,47±10,84	164,71±9,37	175,07±6,17	171,20±11,05	167,87±8,66

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 17. COEFICIENTE DE EFICACIA ALIMENTARIA (C.E.A.) Y COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA (P.E.R.) DURANTE LOS DISTINTOS PERIODOS. (EXPERIENCIA B)

	LOTE C+O	LOTE C+O+Co1	LOTE S	LOTE S+Co1	LOTE REFERENCIA
C.E.A.					
0-21 DIAS	0,43±0,02	0,40±0,02	0,42±0,01	0,39±0,03	0,43±0,01
22-35 DIAS	0,35±0,04 ^{a,b}	0,32±0,01 ^{a,b}	0,32±0,03 ^{a,b}	0,35±0,01 ^a	0,28±0,02 ^b
P.E.R.					
0-21 DIAS	3,10±0,11	2,84±0,12	3,00±0,08	2,77±0,21	2,94±0,08
22-35 DIAS	2,39±0,31 ^{a,b}	2,33±0,09 ^{a,b}	2,17±0,22 ^{a,b}	2,40±0,08 ^a	2,03±0,08 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 18. PESO, INDICE RELATIVO HEPATOSOMATICO Y COMPOSICION PORCENTUAL EN HUMEDAD Y GRASA (s.s. y s.f.) DE LOS HIGADOS ESTUDIADOS. (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
PESO (g) s.f.	8,74±0,36 ^a	12,01±0,57 ^b	9,62±0,33 ^a	12,69±0,83 ^b	6,23±0,28 ^c
PESO (g) s.s.	3,36±0,19 ^a	5,44±0,31 ^b	3,72±0,11 ^a	5,47±0,48 ^b	1,65±0,11 ^c
GRASA (% s.f.)	18,22±1,85 ^a	22,50±2,98 ^{a,b}	17,54±0,77 ^a	26,07±2,01 ^b	6,35±0,41 ^c
GRASA (% s.s.)	47,73±5,16 ^{a,b}	49,19±6,26 ^{a,b}	45,31±2,25 ^a	60,33±3,08 ^b	24,20±1,72 ^c
HUMEDAD %	61,63±0,79 ^a	54,74±1,11 ^b	61,20±0,83 ^{a,c}	57,03±1,99 ^{b,c}	73,49±1,18 ^d
INDICE HEPATOSOMATICO $\bar{\Phi}$	3,72±0,14 ^a	5,30±0,07 ^b	4,14±0,20 ^a	5,44±0,31 ^b	2,76±0,06 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, $p < 0,05$). $\bar{\Phi}$ Índice hepatosomático = (peso hígado (s.f.)/peso corporal) * 100.

TABLA 19a. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg/g sustancia fresca) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
COLESTEROL TOTAL	32,77±4,81 ^{a,b}	43,44±3,07 ^a	29,77±3,15 ^b	48,36±6,45 ^{a,b}	4,18±0,27 ^c
COLESTEROL LIBRE	6,49±0,61 ^{a,c}	9,72±0,71 ^b	6,15±0,30 ^a	8,62±0,54 ^{b,c}	3,09±0,13 ^d
COLESTEROL ESTERIFICADO	26,27±4,73 ^a	33,72±2,86 ^a	23,62±3,23 ^a	39,85±62,45 ^a	1,07±0171 ^b
FOSFOLIPIDOS	26,21±1,83 ^a	23,70±1,46 ^a	25,98±2,13 ^a	23,03±1,34 ^a	37,93±2,16 ^b
TRIGLICERIDOS	124,21±16,46 ^a	158,50±26,29 ^{a,b}	119,60±11,35 ^a	189,33±16,07 ^b	21,45±5,14 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 19b. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg/g sustancia seca) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
COLESTEROL TOTAL	85,98±13,20 ^a	95,63±5,14 ^a	77,14±8,61 ^a	111,28±12,64 ^a	16,13±1,69 ^b
COLESTEROL LIBRE	17,01±1,72 ^{a,b}	21,59±1,90 ^{a,c}	15,93±0,93 ^b	20,12±1,06 ^{a,c}	11,87±0,89 ^d
COLESTEROL ESTERIFICADO	68,97±12,74 ^a	74,04±4,60 ^a	61,20±8,65 ^a	91,16±12,94 ^a	4,26±0,85 ^b
FOSFOLIPIDOS	68,11±4,21 ^a	52,48±3,42 ^{b,c}	67,23±5,73 ^{a,c}	53,92±3,55 ^{b,c}	149,71±9,27 ^d
TRIGLICERIDOS	323,23±43,90 ^{a,b}	348,38±57,52 ^{a,b}	308,76±30,44 ^a	438,11±27,60 ^b	84,76±21,49 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 19c. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg/g de grasa) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
COLESTEROL TOTAL	181,32±27,66 ^a	204,27±28,01 ^a	175,13±25,29 ^a	183,31±18,86 ^a	64,29±4,22 ^b
COLESTEROL LIBRE	36,89±3,48 ^{a,b}	44,08±5,71 ^{a,b}	35,24±1,57 ^a	34,01±2,77 ^a	47,90±2,83 ^b
COLESTEROL ESTERIFICADO	144,43±27,95 ^a	160,19±23,64 ^a	139,90±24,34 ^a	149,31±20,03 ^a	16,38±2,34 ^b
FOSFOLIPIDOS	150,90±15,18 ^a	112,29±16,74 ^{a,b}	151,30±15,03 ^a	91,34±8,52 ^b	620,09±61,57 ^c
TRIGLICERIDOS	667,79±32,73 ^a	683,45±43,77 ^a	673,24±35,74 ^a	725,37±20,94 ^{a,b}	315,63±62,00 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 19d. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS , TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg totales) Y RELACION COLESTEROL LIBRE/COLESTEROL ESTERIFICADO EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
COLESTEROL TOTAL	283,80±38,35 ^a	516,94±35,30 ^b	286,80±33,23 ^a	609,34±91,20 ^b	26,00±1,88 ^c
COLESTEROL LIBRE (CL)	57,02±6,36 ^a	114,34±4,45 ^b	59,66±4,66 ^a	109,04±9,57 ^b	19,23±1,00 ^c
COLESTEROL ESTERIFICADO (CE)	226,78±37,61 ^a	402,60±36,29 ^b	227,13±32,91 ^a	500,30±87,46 ^b	6,77±1,05 ^c
FOSFOLIPIDOS	229,02±18,63	281,65±14,80	249,08±20,73	290,14±18,88	235,88±16,13
TRIGLICERIDOS	1094,35 ±161,79 ^a	1933,10 ±294,00 ^{a,b}	1158,59 ±134,90 ^a	2412,55 ±266,25 ^b	132,60 ±32,27 ^c
CL/CE	0,32±0,07 ^a	0,30±0,03 ^a	0,30±0,05 ^a	0,29±0,09 ^a	3,24±0,44 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 20. COMPOSICION HEPATICA EN ACIDOS GRASOS (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS). RELACIONES $C_{16:1} / C_{16:0}$, $C_{18:1} / C_{18:0}$, $C_{20:4} / C_{18:2}$ Y $C_{22:6} / C_{18:3}$. (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
$C_{16:0}$	20,01±0,76	20,44±0,59	19,89±0,53	20,21±0,76	19,28±0,66
$C_{16:1}$ n-7	4,47±0,27 ^a	6,00±0,52 ^{a,b}	3,48±0,50 ^a	4,59±0,32 ^{a,b}	1,67±0,15 ^c
$C_{18:0}$	6,92±0,64 ^a	4,99±0,39 ^b	7,39±0,82 ^a	5,99±0,25 ^{a,b}	14,39±0,84 ^c
$C_{18:1}$ n-9	49,75±1,45 ^a	51,69±1,39 ^a	47,32±1,54 ^a	47,57±1,95 ^a	31,43±1,44 ^b
$C_{18:2}$ n-6	3,64±0,26 ^{a,b}	3,44±0,35 ^{a,b}	4,09±0,21 ^{a,b}	3,34±0,35 ^a	4,55±0,24 ^b
$C_{18:3}$ n-3	0,61±0,14	0,61±0,18	0,70±0,06	0,83±0,19	0,53±0,04
$C_{20:4}$ n-6	8,64±0,70 ^a	6,99±0,74 ^{a,b}	4,48±0,51 ^{b,c}	4,17±0,52 ^c	18,84±0,59 ^d
$C_{20:5}$ n-3	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	3,22±0,32 ^b	3,54±0,80 ^b	0,00±0,00 ^a
$C_{22:6}$ n-3	1,68±0,19 ^a	2,21±0,45 ^a	6,91±0,52 ^b	6,21±0,53 ^{b,c}	4,77±0,57 ^c
MONOINSATURADOS	54,41±1,67 ^a	57,69±1,76 ^a	50,81±1,93 ^a	52,16±2,25 ^a	33,12±1,49 ^b
SATURADOS	28,14±1,06 ^a	26,50±0,43 ^a	28,05±0,51 ^a	27,08±0,77 ^a	34,77±1,25 ^b
PUFAS n-3	2,56±0,30 ^a	3,34±0,64 ^a	11,77±0,76 ^b	11,36±1,41 ^b	5,54±0,45 ^c
PUFAS n-6	14,90±1,10 ^a	11,07±0,96 ^b	9,36±0,82 ^{b,c}	8,34±0,47 ^c	26,57±0,89 ^d
$C_{16:1} / C_{16:0}$	0,22±0,02 ^{a,b}	0,30±0,02 ^a	0,17±0,02 ^b	0,23±0,02 ^{a,b}	0,09±0,01 ^c
$C_{18:1} / C_{18:0}$	7,62±0,93 ^a	10,88±1,18 ^a	6,94±0,97 ^a	8,05±0,54 ^a	2,26±0,22 ^b
$C_{20:4} / C_{18:2}$	2,41±0,19 ^a	2,16±0,33 ^a	1,08±0,08 ^b	1,60±0,56 ^{a,b}	3,96±0,22 ^c
$C_{22:6} / C_{18:3}$	3,47±0,67 ^a	5,77±1,98 ^{a,b}	10,53±1,50 ^b	10,04±2,30 ^b	7,98±0,38 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, $p < 0,05$).

TABLA 21. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL COLESTEROL ESTERIFICADO HEPATICO (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS).
(EXPERIENCIA B)

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col
C _{16:0}	14,83±0,68	15,59±0,74	15,05±0,56	16,05±0,45
C _{16:1} n-7	8,42±0,64	8,91±1,30	8,47±0,93	10,49±0,77
C _{18:0}	1,28±0,24	1,21±0,29	1,37±0,62	0,74±0,07
C _{18:1} n-9	69,47±0,74 ^{a,b}	69,48±1,21 ^a	68,28±0,81 ^{a,b}	67,09±0,63 ^b
C _{18:2} n-6	1,73±0,17	2,56±0,66	2,28±0,42	1,94±0,19
C _{18:3} n-3	1,58±0,21 ^a	0,80±0,35 ^b	1,66±0,53 ^{a,b}	1,13±0,22 ^{a,b}
C _{20:4} n-6	0,94±0,10 ^a	0,32±0,08 ^{b,c}	0,50±0,05 ^c	0,36±0,02 ^b
C _{20:5} n-3	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,78±0,11 ^b	0,67±0,14 ^b
C _{22:6} n-3	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,88±0,12 ^b	0,81±0,11 ^b
MONOINSATURADOS	77,96±0,76	78,39±0,62	76,80±0,96	77,58±0,43
SATURADOS	17,03±0,76	17,53±0,48	17,00±0,94	17,40±0,32
PUFAS n-3	1,58±0,21 ^a	0,80±0,35 ^b	3,34±0,58 ^c	2,67±0,32 ^c
PUFAS n-6	2,33±0,21	2,88±0,61	2,83±0,43	2,32±0,18

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 22a. VALORES PLASMATICOS DE COLESTEROL TOTAL, FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS (mg/dl) Y COCIENTE COLESTEROL TOTAL/FOSFOLIPIDOS. (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
COLESTEROL TOTAL (CT)	93,57±5,00 ^a	231,43±31,49 ^b	71,14±3,20 ^c	116,67±20,57 ^a	70,71±3,50 ^c
FOSFOLIPIDOS (FOSFO)	101,00±6,65 ^a	133,67±12,51 ^b	90,00±3,25 ^a	92,17±5,64 ^a	103,43±9,03 ^{a,b}
TRIGLICERIDOS	68,43±8,02 ^{a,b}	51,00±4,11 ^a	52,43±3,48 ^a	48,83±4,98 ^a	92,33±10,72 ^b
CT/FOSFO	0,96±0,10 ^{a,c}	1,81±0,13 ^b	0,79±0,04 ^c	1,24±0,16 ^{a,b}	0,70±0,04 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 22b. VALORES PLASMATICOS DE COLESTEROL TOTAL, FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS (mmol/l). (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
COLESTEROL TOTAL (CT)	2,43±0,13 ^a	6,01±0,82 ^b	1,85±0,08 ^c	3,03±0,53 ^a	1,84±0,09 ^c
FOSFOLIPIDOS (FOSFO)	1,31±0,09 ^a	1,74±0,16 ^b	1,17±0,04 ^a	1,20±0,07 ^a	1,34±0,12 ^{a,b}
TRIGLICERIDOS	0,75±0,09 ^{a,b}	0,56±0,05 ^a	0,58±0,04 ^a	0,54±0,05 ^a	1,02±0,12 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 23a. CONCENTRACIONES EN LA HDL DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS (mg/dl), HDL-Colesterol/COLESTEROL, HDL-Fosfolípidos/FOSFOLIPIDOS Y HDL-Colesterol/HDL-Fosfolípidos. (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
HDL-Colesterol	24,85±1,65 ^a	23,47±4,59 ^{a,b}	18,90±1,04 ^b	17,19±1,79 ^b	40,00±4,10 ^c
HDL-Fosfolípidos	62,64±3,94 ^{a,c}	48,98±4,10 ^b	53,86±1,90 ^{b,c}	46,82±3,43 ^b	71,59±7,16 ^a
HDL-Colesterol/ COLESTEROL (%)	26,66±1,37 ^a	11,91±2,12 ^b	26,85±1,83 ^a	17,37±3,32 ^b	58,18±5,48 ^c
HDL-Fosfolípidos /FOSFOLIPIDOS (%)	62,19±1,53 ^a	39,92±5,43 ^b	60,00±1,51 ^a	51,67±4,46 ^{a,b}	71,50±3,36 ^c
HDL-Colesterol/ HDL-Fosfolípidos	0,42±0,06 ^{a,b}	0,50±0,13 ^{a,b}	0,35±0,01 ^b	0,36±0,20 ^b	0,57±0,07 ^a

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 23b. CONCENTRACIONES EN LA HDL DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS (mmol/l). (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
HDL-Colesterol	0,65±0,04 ^a	0,61±0,12 ^{a,b}	0,49±0,03 ^b	0,45±0,05 ^b	1,04±0,11 ^c
HDL-Fosfolípidos	0,81±0,01 ^{a,c}	0,64±0,05 ^b	0,70±0,02 ^{b,c}	0,61±0,04 ^b	0,93±0,09 ^a

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 24. COMPOSICION PLASMATICA EN ACIDOS GRASOS (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS). (EXPERIENCIA B).

	LOTE C+O	LOTE C+O+Co1	LOTE S	LOTE S+Co1	LOTE REFERENCIA
C _{16:0}	20,79±0,64	20,13±1,09	21,64±0,34	20,82±0,48	21,86±0,84
C _{16:1} n-7	2,59±0,14	2,42±0,20	2,55±0,29	2,45±0,12	3,12±0,43
C _{18:0}	13,46±0,71	13,97±0,77	14,14±0,29	13,52±0,30	15,47±1,00
C _{18:1} n-9	40,16±1,56	36,06±2,37	34,22±0,51	35,92±0,57	36,41±0,64
C _{18:2} n-6	5,98±0,42	5,20±0,46	6,45±0,32	6,14±0,17	6,00±0,73
C _{18:3} n-3	1,27±0,24	1,69±0,65	1,16±0,24	1,27±0,21	0,77±0,22
C _{20:4} n-6	8,43±0,76 ^a	11,48±1,37 ^a	5,33±0,32 ^b	5,96±0,24 ^b	10,47±0,86 ^a
C _{20:5} n-3	0,04±0,04 ^a	0,00±0,00 ^a	2,69±0,17 ^b	2,98±0,32 ^b	0,17±0,12 ^a
C _{22:6} n-3	2,49±0,26 ^a	2,34±0,34 ^a	7,46±0,53 ^b	7,39±0,28 ^b	2,91±0,20 ^a
MONOINSATURADOS	43,09±1,60	38,98±2,51	37,12±0,77	38,62±0,54	39,68±0,58
SATURADOS	35,04±0,73	36,01±1,55	36,45±0,40	35,07±0,54	37,99±0,88
PUFAS n-3	4,49±0,39 ^a	4,85±0,92 ^a	12,86±0,80 ^b	13,06±0,60 ^b	4,54±0,45 ^a
PUFAS n-6	17,29±1,11 ^{a,c}	20,15±1,66 ^a	13,43±0,81 ^b	13,22±0,43 ^{b,c}	17,79±0,50 ^a

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 25. CONCENTRACION DE COLESTEROL EN TEJIDO ADIPOSO. (EXPERIENCIA B)

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
mg/g tejido	0,55±0,05 ^{a,b}	0,84±0,12 ^a	0,51±0,05 ^{a,b}	0,63±0,07 ^{a,b}	0,45±0,04 ^b
mg/g grasa	0,83±0,16 ^{a,b}	1,17±0,25 ^a	0,65±0,04 ^{a,b}	0,83±0,13 ^{a,b}	0,58±0,05 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 26. PESO Y CONTENIDO DE GRASA DE BAZO. CONCENTRACION EN COLESTEROL, FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS DE BAZO. (EXPERIENCIA B)

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
PESO (g)	0,57±0,04 ^{a,c}	0,72±0,04 ^b	0,59±0,03 ^{a,d}	0,71±0,05 ^{b,d}	0,49±0,03 ^c
GRASA (%)	2,43±0,23	3,06±0,22	2,24±0,23	2,42±0,24	2,70±0,29
mg/100 mg tejido					
COLESTEROL	0,44±0,02	0,47±0,03	0,44±0,02	0,43±0,01	0,45±0,03
FOSFOLIPIDOS	0,65±0,02	0,67±0,03	0,66±0,02	0,61±0,02	0,67±0,02
TRIGLICERIDOS	1,34±0,22	1,91±0,21	1,14±0,22	1,38±0,25	1,58±0,26
mg/g de grasa					
COLESTEROL	188,90±18,83	159,90±17,93	209,23±22,95	190,98±21,16	176,53±24,84
FOSFOLIPIDOS	283,40±31,80	225,65±12,90	314,18±34,12	268,07±28,90	260,45±25,93
TRIGLICERIDOS	527,70±50,32	614,45±28,18	476,59±56,75	540,95±49,91	563,12±50,43
mg totales					
COLESTEROL	2,46±0,13 ^{a,c}	3,37±0,30 ^b	2,60±0,12 ^{b,c}	3,05±0,21 ^b	2,14±0,09 ^a
FOSFOLIPIDOS	3,65±0,15 ^{a,c}	4,84±0,28 ^b	3,89±0,15 ^a	4,32±0,35 ^{a,b}	3,25±0,18 ^c
TRIGLICERIDOS	7,78±1,40 ^a	13,7±1,57 ^b	7,01±1,56 ^a	9,68±1,73 ^{a,b}	7,85±1,38 ^a

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 27. PESO Y COMPOSICION EN HUMEDAD Y GRASA DE LAS HECES. (EXPERIENCIA B)

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
g/7 días (s.f.)	10,75±0,64 ^a	13,17±0,78 ^{a,b}	14,75±0,76 ^b	17,88±0,78 ^c	10,43±0,57 ^a
g/7 días (s.s.)	9,82±0,58 ^{a,d}	12,19±0,71 ^{a,b}	13,26±0,67 ^b	16,45±0,71 ^c	9,48±0,51 ^{a,d}
HUMEDAD (%)	8,64±0,18 ^a	7,37±0,16 ^b	10,03±0,30 ^c	8,02±0,31 ^{a,b}	9,02±0,14 ^a
GRASA (%)	3,94±0,31 ^a	15,22±0,47 ^b	3,48±0,32 ^a	13,34±0,53 ^c	3,91±0,26 ^a

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 28. EXCRECION DE ACIDOS BILIARES EN HECES. (EXPERIENCIA B)

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
mg/g heces (s.f.)	12,55±0,51 ^{a,c}	19,14±1,56 ^b	11,03±1,09 ^a	18,09±2,12 ^{b,c}	2,98±0,45 ^a
mg/g heces (s.s.)	13,63±0,46 ^a	20,64±1,68 ^b	12,27±1,22 ^a	19,66±2,30 ^{a,b}	3,27±0,50 ^c
mg/día	19,15±0,82 ^a	36,13±4,07 ^b	23,23±2,40 ^a	46,81±6,37 ^b	4,32±0,53 ^c
mg/7 días	134,03±5,73 ^a	252,90±28,46 ^b	162,62±16,80 ^a	327,67±44,58 ^b	30,20±3,75 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 29. EXCRECION DE GRASA Y COLESTEROL EN HECES. (EXPERIENCIA B)

	LOTE C+O	LOTE C+O+Col	LOTE S	LOTE S+Col	LOTE REFERENCIA
GRASA					
mg/g heces (s.f.)	39,42±3,14 ^a	153,23±4,08 ^b	34,81±3,13 ^a	133,46±5,28 ^c	39,12±2,62 ^a
mg/g heces (s.s.)	43,16±3,45 ^a	165,36±4,19 ^b	38,71±3,51 ^a	145,12±5,90 ^c	43,00±2,87 ^a
mg/día	62,04±8,62 ^a	287,14±15,47 ^b	74,08±9,19 ^a	340,21±17,88 ^b	58,77±6,47 ^a
g/7 días	0,43±0,06 ^a	2,01±0,11 ^b	0,52±0,06 ^a	2,39±0,13 ^b	0,41±0,05 ^a
COLESTEROL					
mg/g heces (s.f.)	3,67±0,42 ^a	117,72±2,67 ^b	3,21±0,25 ^a	87,26±9,85 ^c	2,79±0,17 ^a
mg/g heces (s.s.)	4,02±0,45 ^a	127,06±2,80 ^b	3,57±0,28 ^a	94,96±10,75 ^c	3,07±0,19 ^a
mg/g de grasa	93,51±8,10 ^{a,c}	770,69±22,60 ^b	94,42±7,63 ^a	661,74±81,59 ^b	73,31±7,07 ^c
mg/día	5,75±0,88 ^{a,c}	221,71±14,93 ^b	6,79±0,72 ^a	221,71±24,47 ^b	4,15±0,32 ^c
mg/7 días	40,24±6,17 ^{a,c}	1551,99±104,54 ^b	47,55±5,01 ^a	1551,99±171,30 ^b	29,04±2,26 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 30. COMPOSICION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA C)

	DIETA C+O+Col	DIETA C+AS	DIETA S	DIETA C+O
PROTEINA (% s.f.)	14,60±0,23	14,30±0,33	14,65±0,43	14,53±0,20
GRASA (% s.f.)	10,23±0,14	9,05±0,09	9,69±0,09	9,25±0,18
HUMEDAD (%)	5,62±0,08	7,00±0,25	5,73±0,12	5,51±0,13
PROTEINA (% s.s.)	15,47±0,02	15,38±0,04	15,54±0,02	15,38±0,02
GRASA (% s.s.)	10,84±0,01	9,73±0,03	10,28±0,01	9,79±0,02
COLESTEROL AÑADIDO (2 g/100 g dieta)	SI	NO	NO	NO
ACIDOS GRASOS: (% del total de ácidos grasos)				
-C _{16:0}	11,06±0,08	18,30±0,05	17,54±0,39	10,60±0,06
-C _{16:1} n-7	0,86±0,08	5,12±0,04	5,64±0,32	0,90±0,04
-C _{18:0}	3,71±0,03	4,19±0,01	3,75±0,11	3,60±0,04
-C _{18:1} n-9	75,87±0,35	33,55±0,30	35,89±0,68	77,02±0,20
-C _{18:2} n-6	6,90±0,18	3,19±0,01	3,72±0,49	6,54±0,05
-C _{18:3} n-3	0,39±0,07	3,62±0,03	3,25±0,11	0,30±0,00
-C _{20:5} n-3	-	7,93±0,06	7,03±0,12	-
-C _{22:6} n-3	-	8,82±0,07	8,13±0,17	-
-MONOINSATURADOS	76,73±0,31	40,55±0,24	43,55±0,29	77,92±0,18
-SATURADOS	15,84±0,06	29,96±0,16	29,29±0,33	15,17±0,15
-PUFAS n-3	0,39±0,07	21,41±0,10	19,07±0,38	0,30±0,00
-PUFAS n-6	7,04±0,20	8,08±0,04	8,09±0,42	6,65±0,05
P/S	0,47±0,02	0,98±0,01	0,93±0,01	0,46±0,00
n-6/n-3	19,20±3,36	0,38±0,00	0,43±0,03	22,12±0,17

TABLA 31a. INGESTA (en gramos) DE LOS LOTES EXPERIMENTALES (0-21 días). (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
TOTAL	234,41±10,30	213,00±11,07	228,24±1,54
PROTEINA	36,26±1,59	32,95±1,71	35,31±0,24
GRASA	20,72±0,91	18,83±0,98	20,18±0,14
COLESTEROL AÑADIDO	4,69±0,22	4,26±0,22	4,56±0,03
ACIDOS GRASOS:			
-C _{16:0}	2,19±0,10	1,99±0,10	2,13±0,01
-C _{16:1} n-7	0,17±0,01	0,16±0,01	0,17±0,00
-C _{18:0}	0,74±0,03	0,67±0,03	0,71±0,00
-C _{18:1} n-9	15,03±0,66	13,66±0,71	14,63±0,10
-C _{18:2} n-6	1,37±0,06	1,24±0,06	1,33±0,01
-C _{18:3} n-3	0,08±0,00	0,07±0,00	0,08±0,00
-C _{20:5} n-3	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
-C _{22:6} n-3	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
-MONOINSATURADOS	15,20±0,67	13,81±0,72	14,80±0,10
-SATURADOS	3,14±0,14	2,85±0,15	3,06±0,02
-PUFAS n-3	0,08±0,00	0,07±0,00	0,08±0,00
-PUFAS n-6	1,39±0,06	1,27±0,07	1,36±0,01

No existen diferencias significativas entre los lotes.

TABLA 31b. INGESTA (en gramos) DE LOS LOTES EXPERIMENTALES (22-35 días). (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
TOTAL	163,44±1,92	155,44±7,34	166,18±1,32
PROTEINA	25,14±0,30	24,15±1,14	25,56±0,20
GRASA	15,90±0,19	15,98±0,75	16,27±0,13
COLESTEROL AÑADIDO	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
ACIDOS GRASOS:			
-C _{16:0}	2,70±0,03 ^a	2,60±0,12 ^a	1,65±0,01 ^b
-C _{16:1} n-7	0,75±0,01 ^a	0,84±0,04 ^a	0,14±0,00 ^b
-C _{18:0}	0,62±0,01 ^a	0,55±0,03 ^{a,b}	0,56±0,00 ^b
-C _{18:1} n-9	4,95±0,06 ^a	5,32±0,25 ^a	11,97±0,09 ^b
-C _{18:2} n-6	0,47±0,00 ^a	0,55±0,03 ^b	1,01±0,01 ^c
-C _{18:3} n-3	0,53±0,01 ^a	0,48±0,02 ^a	0,04±0,00 ^b
-C _{20:5} n-3	1,17±0,01 ^a	1,04±0,05 ^b	0,00±0,00 ^c
-C _{22:6} n-3	1,30±0,02 ^a	1,21±0,06 ^a	0,00±0,00 ^b
-MONOINSAT.	5,99±0,07 ^a	6,46±0,30 ^a	12,11±0,09 ^b
-SATURADOS	4,42±0,05 ^a	4,34±0,20 ^a	2,36±0,02 ^b
-PUFAS n-3	3,12±0,04 ^a	2,82±0,13 ^a	0,04±0,00 ^b
-PUFAS n-6	1,23±0,01 ^a	1,21±0,06 ^a	1,03±0,01 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 31c. INGESTA (en gramos) DE LOS LOTES EXPERIMENTALES (0-35 días). (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
TOTAL	397,86±12,07	368,44±18,11	394,42±2,61
PROTEINA	61,40±1,86	57,11±2,08	60,87±0,40
GRASA	36,63±1,08	34,81±1,71	36,44±0,24
COLESTEROL AÑADIDO	4,69±0,20	4,26±0,22	4,56±0,03
ACIDOS GRASOS:			
-C _{16:0}	4,89±0,13 ^a	4,59±0,22 ^a	3,78±0,03 ^b
-C _{16:1} n-7	0,92±0,02 ^a	0,99±0,05 ^a	0,30±0,00 ^b
-C _{18:0}	1,49±0,06 ^a	1,22±0,06 ^a	1,27±0,01 ^b
-C _{18:1} n-9	19,98±0,71 ^a	18,98±0,94 ^a	26,61±0,18 ^b
-C _{18:2} n-6	1,84±0,07 ^a	1,80±0,09 ^a	2,35±0,02 ^b
-C _{18:3} n-3	0,61±0,01 ^a	0,55±0,03 ^a	0,11±0,00 ^b
-C _{20:5} n-3	1,17±0,01 ^a	1,04±0,05 ^b	0,00±0,00 ^c
-C _{22:6} n-3	1,30±0,02 ^a	1,21±0,06 ^a	0,00±0,00 ^b
-MONOINSATURADOS	21,18±0,73 ^a	20,27±1,01 ^a	26,92±0,18 ^b
-SATURADOS	7,56±0,19 ^a	7,20±0,35 ^a	5,42±0,04 ^b
-PUFAS n-3	3,20±0,04 ^a	2,89±0,14 ^a	0,11±0,00 ^b
-PUFAS n-6	2,63±0,07	2,48±0,12	2,39±0,02

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 32. GANANCIA DE PESO DURANTE LOS DISTINTOS PERIODOS. (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
0-21 DIAS	98,71±7,42	95,38±8,70	96,25±5,83
22-35 DIAS	60,09±7,26	59,34±3,44	61,84±7,56
0-35 DIAS	158,80±11,54	154,70±8,34	158,07±7,27

TABLA 33. COEFICIENTE DE EFICACIA ALIMENTARIA (C.E.A.) Y COEFICIENTE DE EFICACIA PROTEICA (P.E.R.) DURANTE LOS DISTINTOS PERIODOS. (EXPERIENCIA C)

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
C.E.A.			
0-21 DIAS	0,42±0,01	0,44±0,02	0,42±0,01
22-35 DIAS	0,36±0,03	0,37±0,02	0,37±0,03
P.E.R.			
0-21 DIAS	2,72±0,31	2,85±0,22	2,74±0,18
22-35 DIAS	2,40±0,41	2,45±0,19	2,42±0,27

TABLA 34. PESO, INDICE RELATIVO HEPATOSOMATICO Y COMPOSICION PORCENTUAL EN HUMEDAD Y GRASA (s.s. y s.f.) DE LOS HIGADOS ESTUDIADOS. (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
PESO (g) s.f.	8,72±0,20 ^a	8,42±0,37 ^a	6,87±0,20 ^b
PESO (g) s.s.	3,58±0,16 ^a	2,99±0,21 ^{a,b}	2,79±0,11 ^b
GRASA (% s.f.)	16,46±0,44 ^a	12,93±1,02 ^b	17,84±0,67 ^a
GRASA (% s.s.)	40,27±1,04 ^{a,b}	36,43±1,99 ^a	43,99±1,20 ^b
HUMEDAD (%)	59,03±1,24 ^a	64,75±1,15 ^b	59,51±0,55 ^c
INDICE HEPATOSOMATICO Φ	4,03±0,10 ^{a,b}	4,44±0,14 ^a	3,84±0,10 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05). Φ Índice hepatosomático = (peso hígado (s.f.)/peso corporal) * 100.

TABLA 35a. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg/g sustancia fresca) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
COLESTEROL TOTAL	51,52±2,72 ^a	30,87±4,44 ^b	68,74±2,60 ^c
COLESTEROL LIBRE	10,43±0,89 ^a	5,54±0,46 ^b	12,35±1,31 ^a
COLESTEROL ESTERIFICADO	41,09±2,50 ^a	25,33±3,18 ^b	56,38±2,67 ^c
FOSFOLIPIDOS	24,19±3,00	22,46±1,70	20,92±1,14
TRIGLICERIDOS	88,89±2,56	75,92±6,64	88,72±4,68

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 35b. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg/g sustancia seca) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
COLESTEROL TOTAL	126,01±6,46 ^a	86,51±7,00 ^b	169,74±5,86 ^c
COLESTEROL LIBRE	25,40±1,96 ^a	15,72±1,12 ^b	30,41±3,06 ^a
COLESTEROL ESTERIFICADO	100,60±6,38 ^a	70,79±6,78 ^b	139,33±6,49 ^c
FOSFOLIPIDOS	58,65±6,76 ^{a,b}	63,61±3,68 ^a	51,56±2,37 ^b
TRIGLICERIDOS	218,06±8,81	214,23±15,37	218,57±9,29

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 35c. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg/g de grasa) EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
COLESTEROL TOTAL	312,31±11,69 ^a	238,66±16,71 ^b	386,56±11,96 ^c
COLESTEROL LIBRE	63,13±4,62 ^a	44,29±4,65 ^b	68,55±5,48 ^a
COLESTEROL ESTERIFICADO	249,17±12,33 ^a	194,37±14,83 ^b	318,01±16,27 ^c
FOSFOLIPIDOS	145,68±15,95 ^{a,b}	175,15±7,92 ^a	117,09±3,63 ^b
TRIGLICERIDOS	542,02±19,59 ^a	586,19±16,61 ^b	496,35±13,27 ^a

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 35d. CONCENTRACION DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS, TRIGLICERIDOS HEPATICOS (en mg totales) Y RELACION COLESTEROL LIBRE/COLESTEROL ESTERIFICADO EN LOS LOTES EXPERIMENTALES. (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
COLESTEROL TOTAL	448,31±23,40 ^a	265,22±39,39 ^b	474,42±28,81 ^a
COLESTEROL LIBRE (CL)	91,46±8,93 ^a	7,26±5,80 ^b	85,27±9,51 ^a
COLESTEROL ESTERIFICADO (CE)	356,86±19,85 ^a	217,95±34,77 ^b	389,15±26,41 ^a
FOSFOLIPIDOS	211,71±27,99	190,01±17,16	145,00±11,90
TRIGLICERIDOS	776,50±33,59 ^a	644,83±68,29 ^{a,b}	612,48±42,32 ^b
CL/CE	0,26±0,03	0,23±0,03	0,23±0,03

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 36. COMPOSICION HEPATICA EN ACIDOS GRASOS (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS). RELACIONES $C_{16:1} / C_{16:0}$, $C_{18:1} / C_{18:0}$, $C_{20:4} / C_{18:2}$ Y $C_{22:6} / C_{18:3}$. (EXPERIENCIA C)

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
$C_{16:0}$	17,77±0,22	18,02±0,20	15,99±0,64
$C_{16:1}$ n-7	6,87±0,29 ^a	3,86±0,28 ^b	6,27±0,41 ^a
$C_{18:0}$	6,39±0,19 ^a	8,65±0,53 ^b	6,19±0,32 ^a
$C_{18:1}$ n-9	42,57±0,69 ^a	38,35±1,35 ^a	56,40±0,70 ^b
$C_{18:2}$ n-6	3,26±0,09 ^a	3,62±0,19 ^{a,b}	3,83±0,10 ^b
$C_{18:3}$ n-3	0,88±0,06	0,85±0,05	0,63±0,08
$C_{20:4}$ n-6	4,62±0,22 ^a	5,13±0,39 ^{a,b}	6,40±0,42 ^b
$C_{20:5}$ n-3	5,25±0,21 ^a	3,61±0,15 ^b	0,00±0,00 ^c
$C_{22:6}$ n-3	8,48±0,58 ^a	13,32±0,79 ^b	1,06±0,11 ^c
MONOINSAT.	49,58±0,71 ^a	42,38±1,59 ^b	62,86±0,61 ^c
SATURADOS	25,65±0,26 ^a	27,80±0,55 ^b	23,12±0,40 ^c
PUFAS n-3	15,72±0,82 ^a	19,86±0,78 ^b	1,76±0,09 ^c
PUFAS n-6	8,08±0,25 ^a	9,03±0,56 ^{a,b}	10,52±0,48 ^c
$C_{16:1} / C_{16:0}$	0,39±0,02 ^a	0,22±0,02 ^b	0,39±0,01 ^a
$C_{18:1} / C_{18:0}$	6,68±0,13 ^a	4,56±0,43 ^b	9,26±0,46 ^c
$C_{20:4} / C_{18:2}$	1,42±0,07	1,42±0,07	1,67±0,09
$C_{22:6} / C_{18:3}$	9,60±0,41 ^a	16,03±1,45 ^b	1,90±0,30 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 37. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LOS TRIGLICERIDOS HEPATICOS (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS). (EXPERIENCIA C)

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
C _{16:0}	25,86±0,86 ^a	23,52±0,91 ^a	31,12±0,69 ^b
C _{16:1} n-7	5,34±0,89 ^a	2,63±0,42 ^b	3,14±0,27 ^{a,b}
C _{18:0}	2,06±0,20 ^a	3,48±0,62 ^b	1,93±0,22 ^a
C _{18:1} n-9	43,45±0,99 ^a	44,01±1,86 ^a	56,38±1,42 ^b
C _{18:2} n-6	3,98±0,25 ^a	1,21±0,36 ^a	0,67±0,11 ^b
C _{18:3} n-3	0,91±0,18	1,21±0,36	0,67±0,11
C _{20:4} n-6	2,26±0,92	1,50±0,44	0,84±0,24
C _{20:5} n-3	2,39±0,43 ^a	2,21±0,45 ^a	0,00±0,00 ^b
C _{22:6} n-3	8,69±1,07 ^a	11,43±1,39 ^a	0,00±0,00 ^b
MONOINSAT.	49,09±1,28 ^a	46,86±2,30 ^a	60,29±1,02 ^b
SATURADOS	29,92±0,86 ^a	28,64±0,70 ^a	34,72±0,77 ^b
PUFAS n-3	13,66±1,51 ^a	17,90±2,07 ^a	0,67±0,11 ^b
PUFAS n-6	6,52±0,80 ^a	5,69±0,21 ^{a,b}	4,20±0,45 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 38. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLIPIDOS HEPATICOS (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS). (EXPERIENCIA C)

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
C _{16:0}	18,40±0,47 ^a	19,76±0,77 ^a	14,37±0,28 ^b
C _{16:1} n-7	2,57±0,32	1,51±0,23	1,76±0,14
C _{18:0}	20,23±0,89 ^a	20,13±0,76 ^a	23,11±0,31 ^b
C _{18:1} n-9	18,71±1,33	16,49±0,88	16,74±0,53
C _{18:2} n-6	5,25±0,31 ^a	4,75±0,19 ^a	8,08±0,33 ^b
C _{18:3} n-3	0,80±0,18	0,58±0,06	0,56±0,07
C _{20:4} n-6	13,76±0,82 ^a	10,02±0,55 ^b	23,54±0,80 ^c
C _{20:5} n-3	5,77±0,40 ^a	3,15±0,29 ^b	0,42±0,12 ^c
C _{22:6} n-3	10,44±0,40 ^a	18,66±1,02 ^b	4,47±0,36 ^c
MONOINSAT.	21,89±1,73	18,43±1,22	18,95±0,58
SATURADOS	39,33±0,60	40,37±1,29	38,45±0,40
PUFAS n-3	17,86±0,69 ^a	24,25±1,45 ^b	6,12±0,70 ^c
PUFAS n-6	19,60±0,76 ^a	15,18±0,65 ^b	32,93±0,65 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 39. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL COLESTEROL ESTERIFICADO HEPATICO (% DEL TOTAL DE ACIDOS GRASOS). (EXPERIENCIA C)

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
C _{16:0}	13,97±0,26	13,57±0,32	12,09±0,62
C _{16:1} n-7	11,88±0,58 ^a	8,03±0,40 ^b	10,06±0,80 ^{a,b}
C _{18:0}	1,55±0,10 ^a	2,37±0,16 ^b	1,53±0,13 ^a
C _{18:1} n-9	57,66±1,08 ^a	63,45±0,99 ^b	69,60±1,26 ^c
C _{18:2} n-6	2,42±0,09	2,64±0,11	2,58±0,14
C _{18:3} n-3	0,67±0,15	0,84±0,19	0,67±0,11
C _{20:4} n-6	1,09±0,26	1,38±0,13	1,41±0,20
C _{20:5} n-3	4,93±0,52 ^a	3,11±0,22 ^b	0,00±0,00 ^c
C _{22:6} n-3	2,81±0,26 ^a	1,82±0,24 ^b	0,00±0,00 ^c
MONOINSAT.	69,75±0,50 ^a	71,96±0,59 ^b	79,98±0,53 ^c
SATURADOS	17,67±0,19 ^a	17,60±0,29 ^a	14,85±0,64 ^b
PUFAS n-3	8,80±0,65 ^a	6,19±0,44 ^b	0,67±0,11 ^c
PUFAS n-6	3,61±0,26	4,12±0,15	4,04±0,27

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 40a. VALORES PLASMATICOS DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS (en mg/dl) Y COCIENTE COLESTEROL TOTAL/FOSFOLIPIDOS. (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
COLESTEROL TOTAL (CT)	97,07±6,87	90,91±5,59	121,11±16,84
COLESTEROL LIBRE	22,17±1,38	18,90±1,09	21,42±2,95
COLESTEROL ESTERIFICADO	77,16±5,46	73,04±4,97	99,70±14,92
FOSFOLIPIDOS (FOSFO)	108,86±5,00 ^a	135,89±4,95 ^b	103,10±9,59 ^a
TRIGLICERIDOS	41,65±3,95 ^a	36,84±2,52 ^a	24,77±2,31 ^b
CT/FOSFO	0,89±0,02 ^a	0,67±0,02 ^b	1,15±0,06 ^c

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 40b. VALORES PLASMATICOS DE COLESTEROL (TOTAL, LIBRE Y ESTERIFICADO), FOSFOLIPIDOS Y TRIGLICERIDOS (mmol/l). (EXPERIENCIA C).

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
COLESTEROL TOTAL (CT)	2,51±0,18	2,36±0,14	3,14±0,44
COLESTEROL LIBRE	0,57±0,04	0,49±0,03	0,55±0,08
COLESTEROL ESTERIFICADO	2,06±0,12	1,95±0,14	2,58±0,39
FOSFOLIPIDOS (FOSFO)	1,41±0,06 ^a	1,76±0,06 ^b	1,33±0,12 ^a
TRIGLICERIDOS	0,47±0,045 ^a	0,42±0,03 ^a	0,28±0,03 ^b

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 41a. CONCENTRACION LIPIDICA PLASMATICA (mg/dl) EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS. (EXPERIENCIA C)

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
VLDL			
COLESTEROL TOTAL	24,66±2,31 ^a	7,88±1,62 ^b	68,06±11,41 ^c
COLESTEROL LIBRE	8,87±1,38 ^a	3,33±0,61 ^b	11,47±1,28 ^a
COLESTEROL ESTERIFICADO	15,79±1,35 ^a	4,56±1,05 ^b	56,60±10,27 ^c
FOSFOLIPIDOS	11,88±1,19 ^a	3,52±0,63 ^b	22,85±3,21 ^c
TRIGLICERIDOS	20,32±3,05 ^a	7,54±0,96 ^b	9,20±1,44 ^b
LDL			
COLESTEROL TOTAL	18,60±2,56 ^a	6,33±1,06 ^b	10,57±0,87 ^a
COLESTEROL LIBRE	7,12±1,21 ^a	2,30±0,25 ^b	3,02±0,88 ^b
COLESTEROL ESTERIFICADO	11,49±1,86 ^a	4,03±0,84 ^b	7,55±0,89 ^{a,b}
FOSFOLIPIDOS	10,65±1,23 ^a	4,89±0,48 ^b	6,09±0,66 ^b
TRIGLICERIDOS	3,96±0,32 ^a	3,79±0,51 ^a	2,12±0,32 ^b
HDL			
COLESTEROL TOTAL	52,02±5,18 ^a	74,47±3,36 ^b	36,34±5,51 ^a
COLESTEROL LIBRE	12,40±1,06 ^a	16,65±0,82 ^b	8,57±2,17 ^a
COLESTEROL ESTERIFICADO	39,63±4,65 ^a	57,82±3,06 ^b	27,76±3,63 ^a
FOSFOLIPIDOS	80,13±5,08 ^a	115,12±2,64 ^b	67,82±8,30 ^a
TRIGLICERIDOS	14,46±0,92 ^{a,b}	18,85±1,46 ^b	12,30±0,79 ^a

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 41b. CONCENTRACION LIPIDICA PLASMATICA (mmol/l) EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS. (EXPERIENCIA C)

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
VLDL			
COLESTEROL TOTAL	0,64±0,06 ^a	0,20±0,04 ^b	1,73±0,30 ^c
COLESTEROL LIBRE	0,23±0,04 ^a	0,09±0,02 ^b	0,30±0,03 ^a
COLESTEROL ESTERIFICADO	0,41±0,03 ^a	0,12±0,03 ^b	1,47±0,27 ^c
FOSFOLIPIDOS	0,15±0,02 ^a	0,05±0,01 ^b	0,30±0,04 ^c
TRIGLICERIDOS	0,23±0,03 ^a	0,09±0,01 ^b	0,10±0,02 ^b
LDL			
COLESTEROL TOTAL	0,48±0,07 ^a	0,16±0,03 ^b	0,27±0,02 ^a
COLESTEROL LIBRE	0,18±0,03 ^a	0,06±0,01 ^b	0,08±0,02 ^b
COLESTEROL ESTERIFICADO	0,30±0,05 ^a	0,10±0,02 ^b	0,20±0,02 ^{a,b}
FOSFOLIPIDOS	0,14±0,02 ^a	0,06±0,01 ^b	0,08±0,01 ^b
TRIGLICERIDOS	0,04±0,00 ^a	0,04±0,01 ^a	0,02±0,00 ^b
HDL			
COLESTEROL TOTAL	1,35±0,13 ^a	1,93±0,09 ^b	0,94±0,14 ^a
COLESTEROL LIBRE	0,32±0,03 ^a	0,43±0,02 ^b	0,22±0,06 ^a
COLESTEROL ESTERIFICADO	1,03±0,12 ^a	1,50±0,08 ^b	0,72±0,09 ^a
FOSFOLIPIDOS	1,04±0,07 ^a	1,49±0,03 ^b	0,88±0,11 ^a
TRIGLICERIDOS	0,16±0,01 ^{a,b}	0,21±0,02 ^b	0,14±0,01 ^a

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

TABLA 42. COMPOSICION LIPIDICA (%) DE LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS PLAMATICAS. (EXPERIENCIA C)

	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
VLDL			
COLESTEROL TOTAL	43,68±2,27 ^a	40,06±2,38 ^a	66,84±2,51 ^b
COLESTEROL LIBRE	15,59±1,81 ^{a,b}	17,50±1,36 ^b	12,11±1,24 ^a
COLESTEROL ESTERIFICADO	28,08±1,40 ^a	22,56±2,36 ^a	54,73±3,72 ^b
FOSFOLIPIDOS	20,86±0,78 ^{a,b}	18,40±1,32 ^a	23,19±0,70 ^b
TRIGLICERIDOS	35,44±3,02 ^a	41,55±3,36 ^a	9,97±2,03 ^b
LDL			
COLESTEROL TOTAL	55,17±1,49 ^a	41,22±3,63 ^b	56,27±3,22 ^a
COLESTEROL LIBRE	21,19±2,15 ^a	15,38±0,70 ^b	15,37±3,34 ^{a,b}
COLESTEROL ESTERIFICADO	33,98±2,51	25,85±3,32	40,91±5,07
FOSFOLIPIDOS	32,23±0,75	32,64±0,54	32,40±2,56
TRIGLICERIDOS	12,61±1,30 ^a	26,13±3,67 ^b	11,33±1,50 ^a
HDL			
COLESTEROL TOTAL	35,09±1,18 ^a	35,69±0,92 ^a	30,55±1,18 ^b
COLESTEROL LIBRE	8,52±0,70	8,00±0,35	6,75±1,19
COLESTEROL ESTERIFICADO	26,59±1,45 ^a	27,69±0,94 ^a	23,80±0,94 ^b
FOSFOLIPIDOS	54,80±0,80 ^a	55,31±0,70 ^a	58,11±0,54 ^b
TRIGLICERIDOS	10,10±0,96	9,01±0,52	11,34±1,43

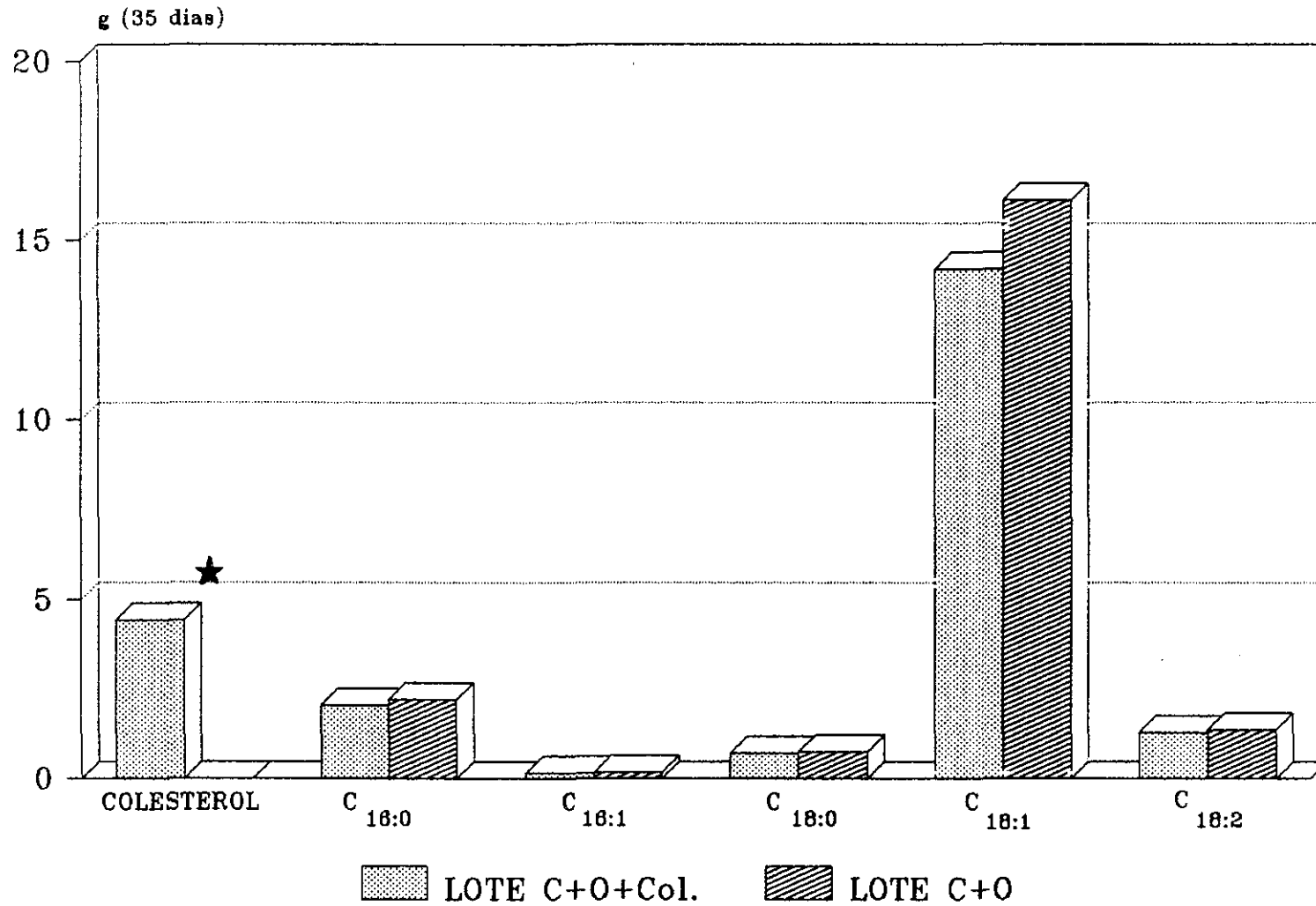
Supraindices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

**TABLA 43. DISTRIBUCION DE LOS LIPIDOS SERICOS EN LAS DIFERENTES LIPO-
PROTEINAS. (EXPERIENCIA C)**

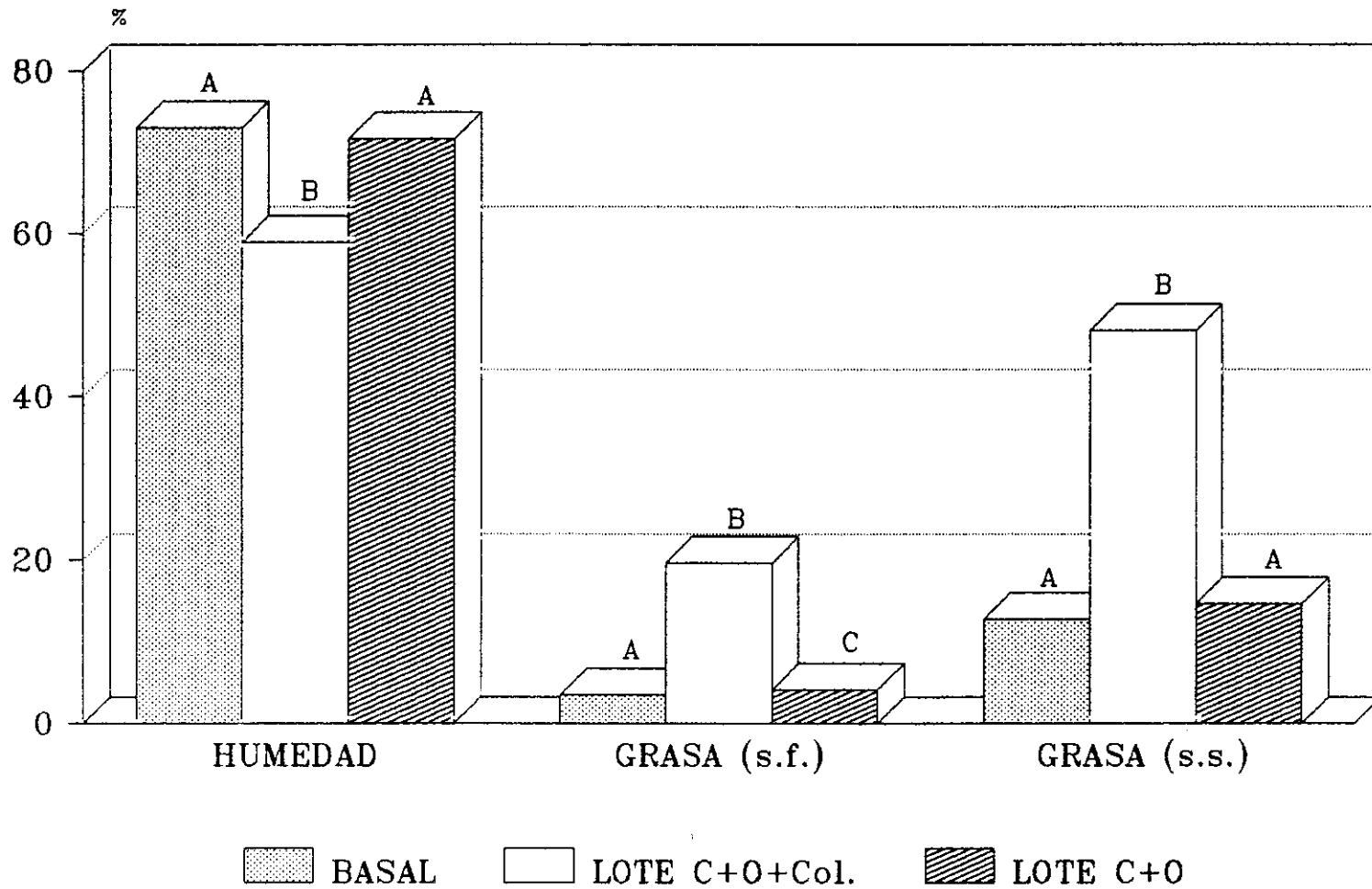
	LOTE C+AS	LOTE S	LOTE C+O
COLESTEROL TOTAL			
VLDL	26,05±2,50 ^a	8,73±1,69 ^b	57,61±4,14 ^c
LDL	19,31±2,40 ^a	6,92±0,83 ^b	9,79±1,21 ^b
HDL	53,86±2,70 ^a	83,94±1,89 ^b	32,23±4,25 ^c
COLESTEROL LIBRE			
VLDL	30,46±3,29 ^a	14,99±2,79 ^b	51,84±4,73 ^c
LDL	24,74±3,90 ^a	10,25±0,92 ^b	13,14±2,62 ^{a,b}
HDL	42,92±2,01 ^a	74,76±2,94 ^b	33,93±5,72 ^a
COLESTEROL ESTERIFICADO			
VLDL	22,25±1,675 ^a	7,37±1,55 ^b	59,08±4,49 ^c
LDL	17,99±2,87 ^{a,c}	6,22±0,97 ^b	8,98±1,50 ^{a,b}
HDL	59,18±3,85 ^a	86,41±1,68 ^b	31,74±4,33 ^c
FOSFOLIPIDOS			
VLDL	11,57±1,07 ^a	2,80±0,46 ^b	23,67±2,49 ^c
LDL	10,32±1,09 ^a	3,91±0,30 ^b	6,36±0,48 ^c
HDL	77,58±1,59 ^a	92,96±0,63 ^b	68,87±2,55 ^c
TRIGLICERIDOS			
VLDL	50,55±3,73 ^a	24,66±2,91 ^b	36,89±3,07 ^b
LDL	10,18±0,81	12,22±1,12	8,52±0,62
HDL	37,37±2,83 ^a	61,36±2,12 ^b	51,61±3,73 ^{a,b}

Supraíndices con distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas (U Mann-Whitney, p<0,05).

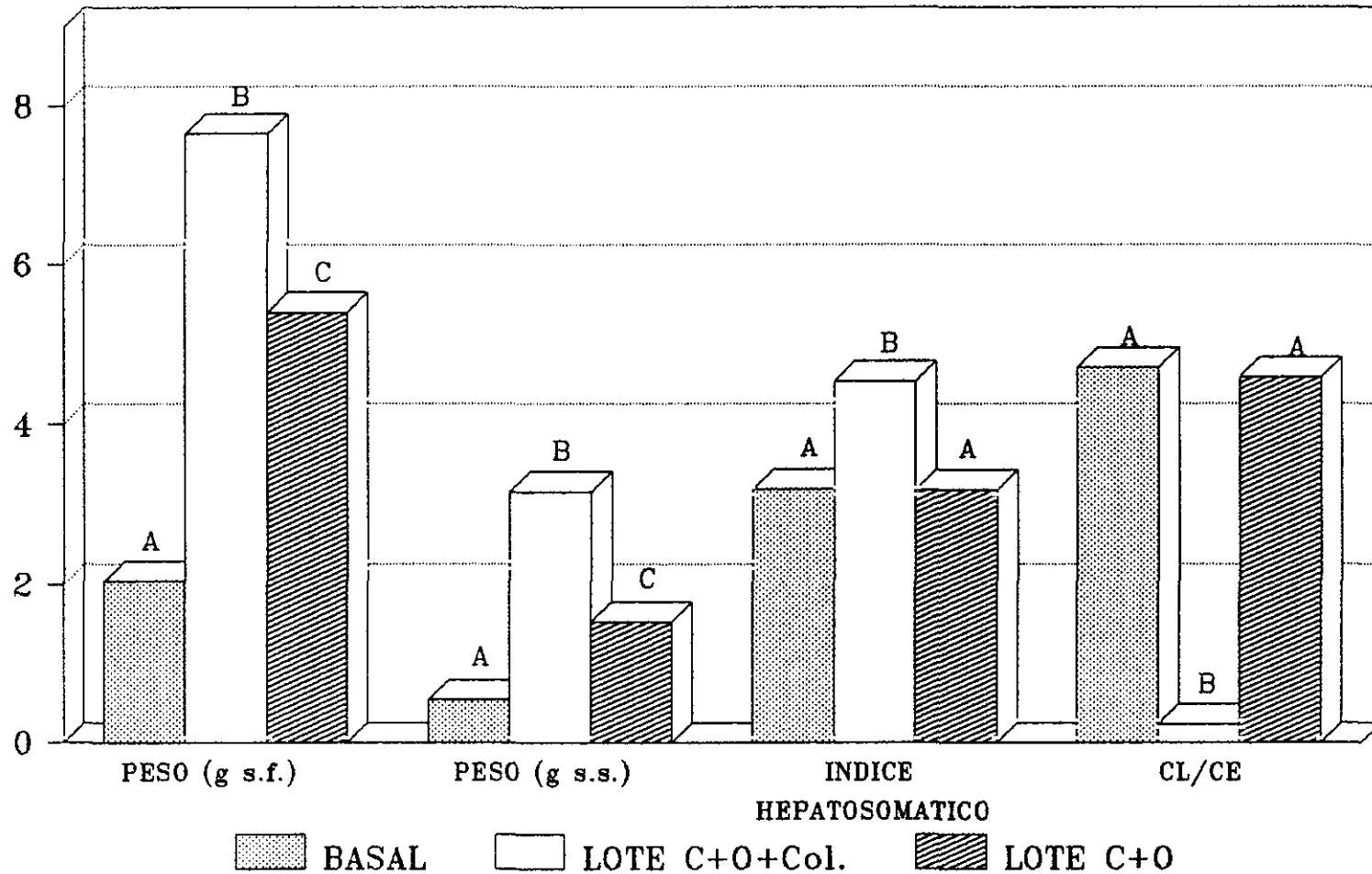
GRAFICA 1. INGESTA DE COLESTEROL Y DE LOS PRINCIPALES ACIDOS GRASOS POR LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A)



GRAFICA 2. COMPOSICION PORCENTUAL EN HUMEDAD Y GRASA EN LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A).

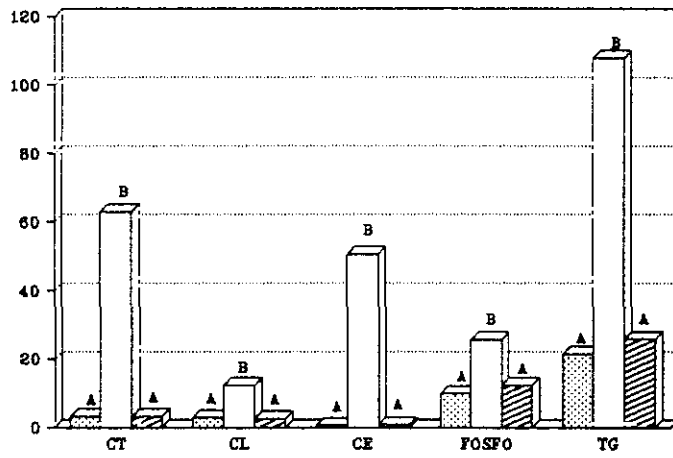


GRAFICA 3. PESO DE HIGADOS, INDICE RELATIVO HEPATOSOMATICO Y RELACION COLESTEROL LIBRE/COLESTEROL ESTERIFICADO (CL/CE) EN LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A).

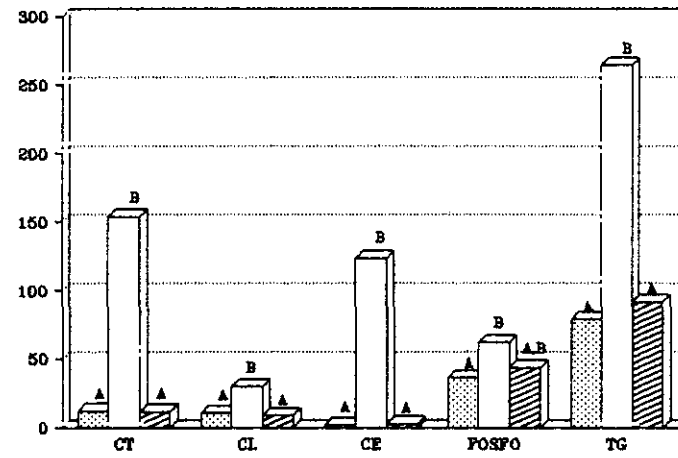


GRAFICA 4. CONCENTRACION DE COLESTEROL TOTAL (CT), LIBRE (CL) Y ESTERIFICADO (CE), FOSFOLIPIDOS (FOSFO) Y TRIGLICERIDOS (TG) EN LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A)

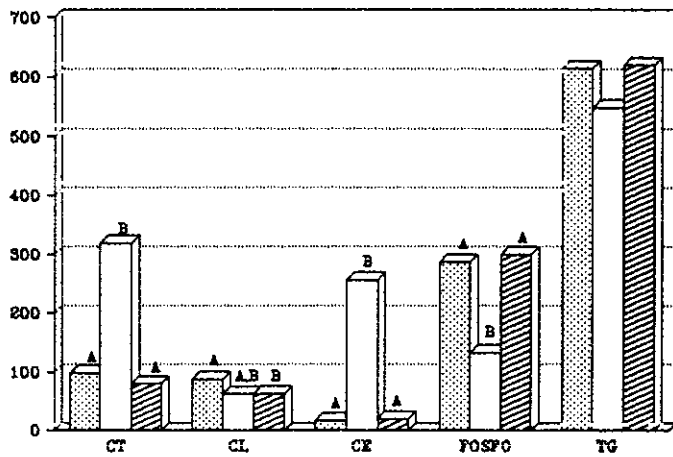
mg/g tejido s.f.



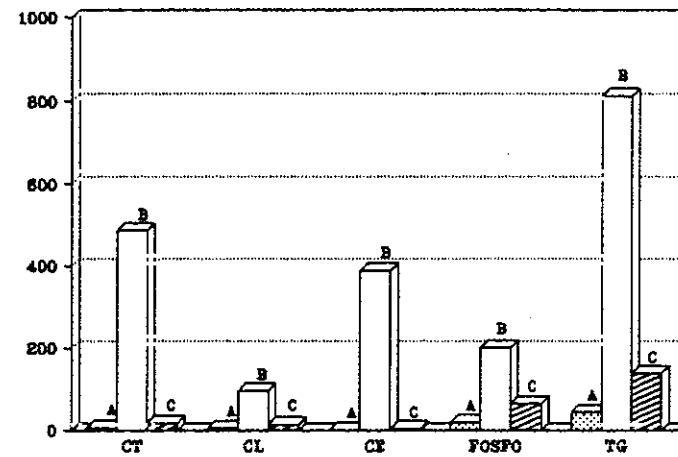
mg/g tejido s.s.



mg/g grasa



mg totales

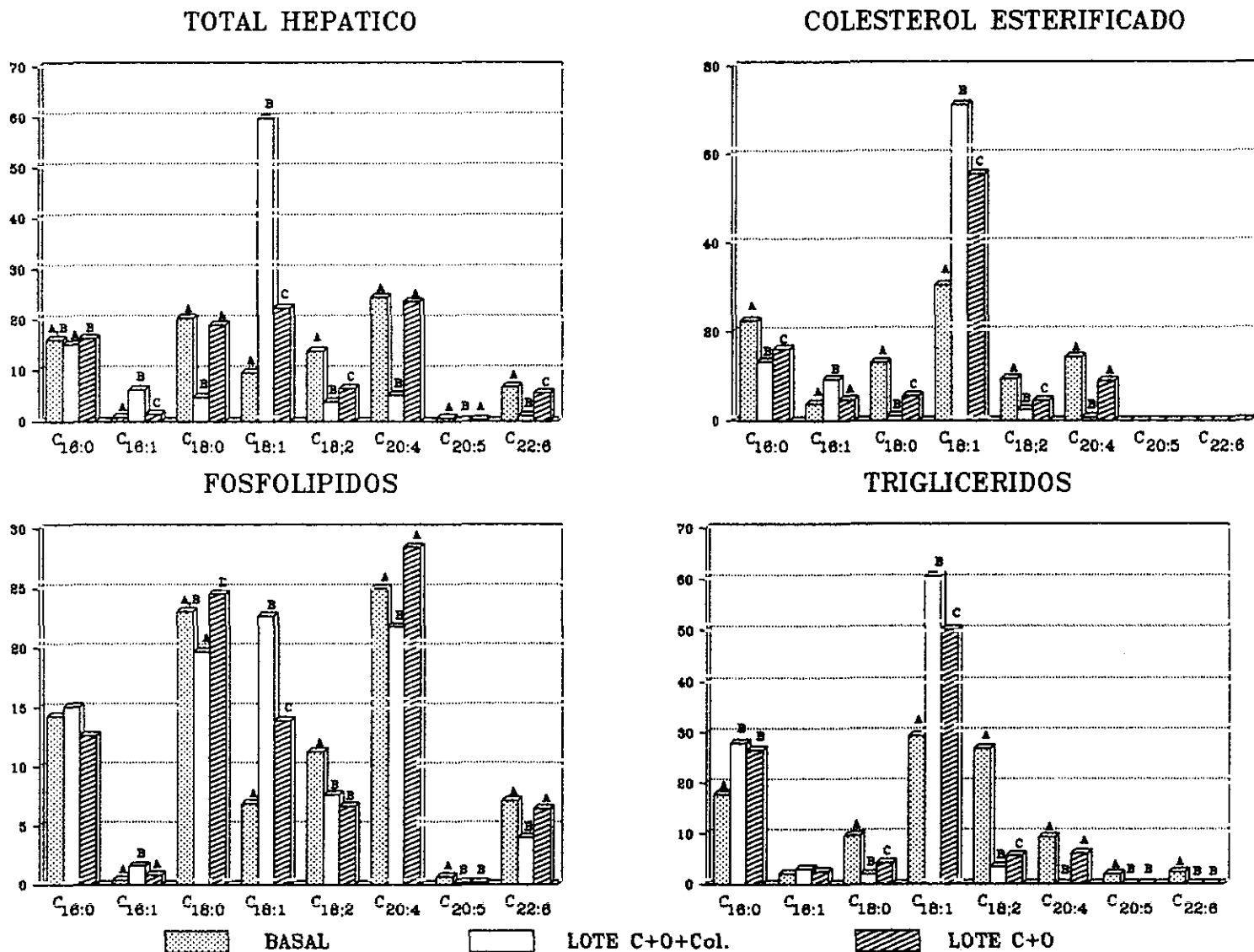


■ BASAL

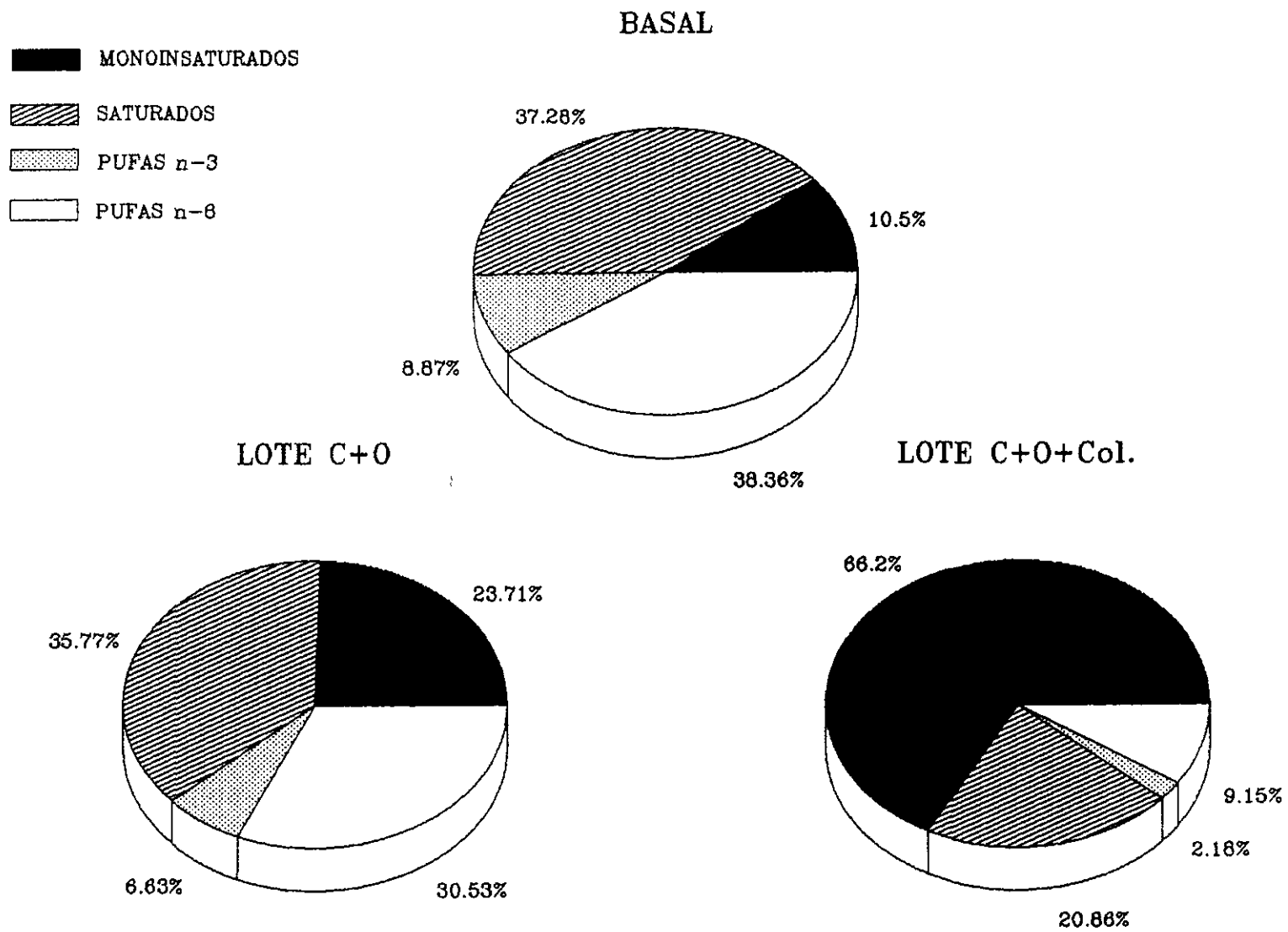
□ LOTE C+O+Col.

▨ LOTE C+O

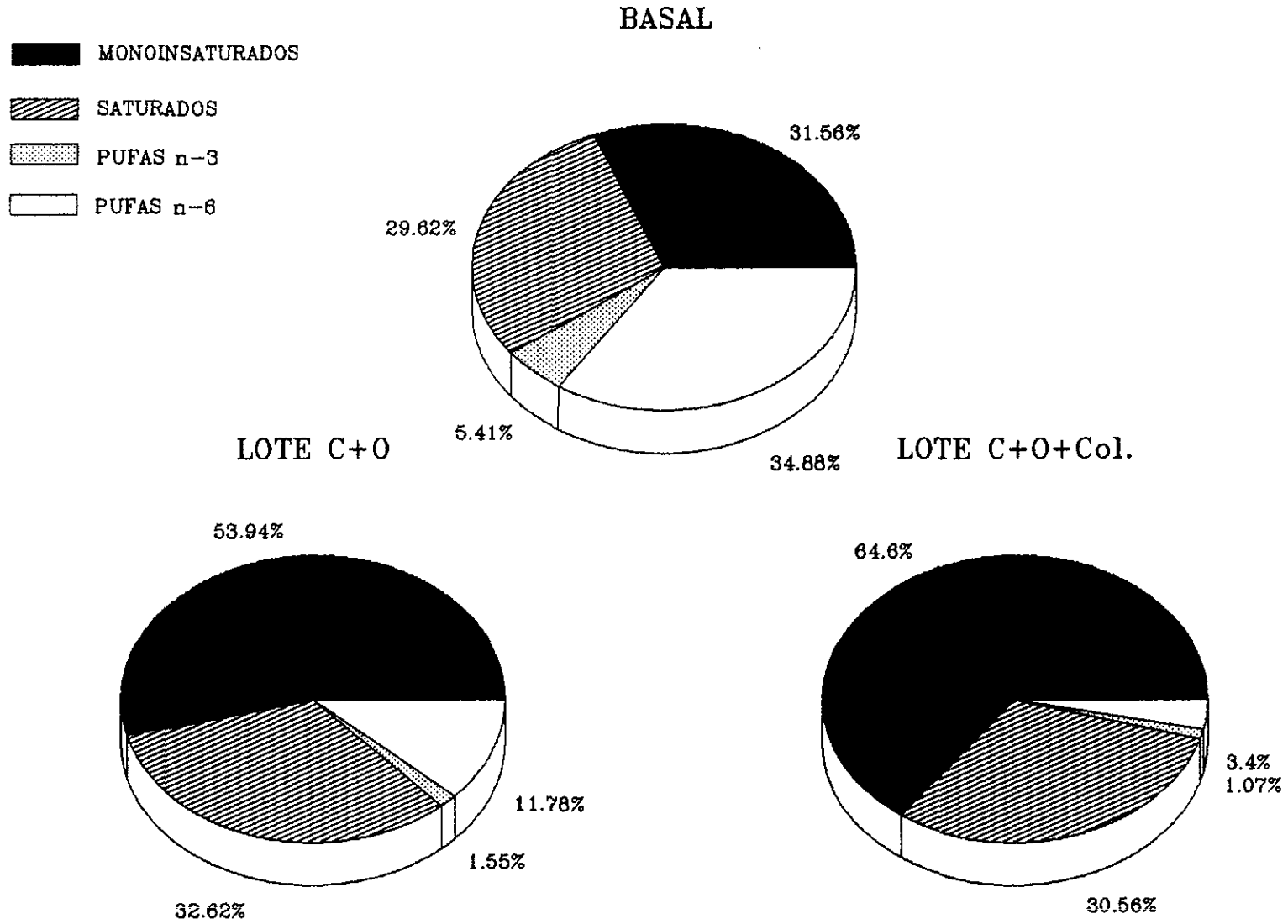
GRAFICA 5. COMPOSICION PORCENTUAL EN LOS PRINCIPALES ACIDOS GRASOS DEL TOTAL HEPATICO Y DE LAS FRACCIONES DE COLESTEROL ESTERIFICADO, TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS HEPATICOS. (Experiencia A)



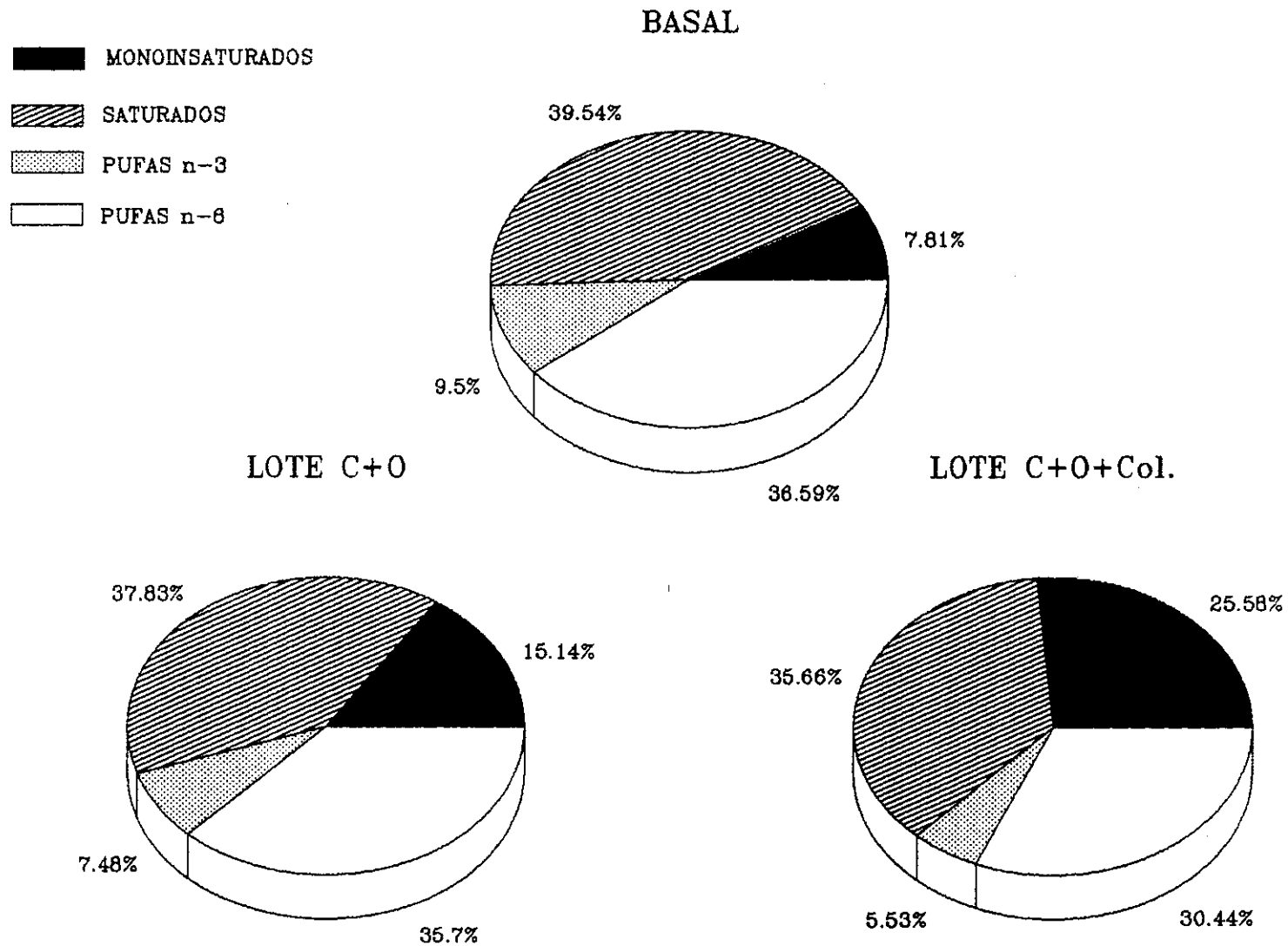
GRAFICA 7. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN EL TOTAL HEPATICO. (Experiencia A)



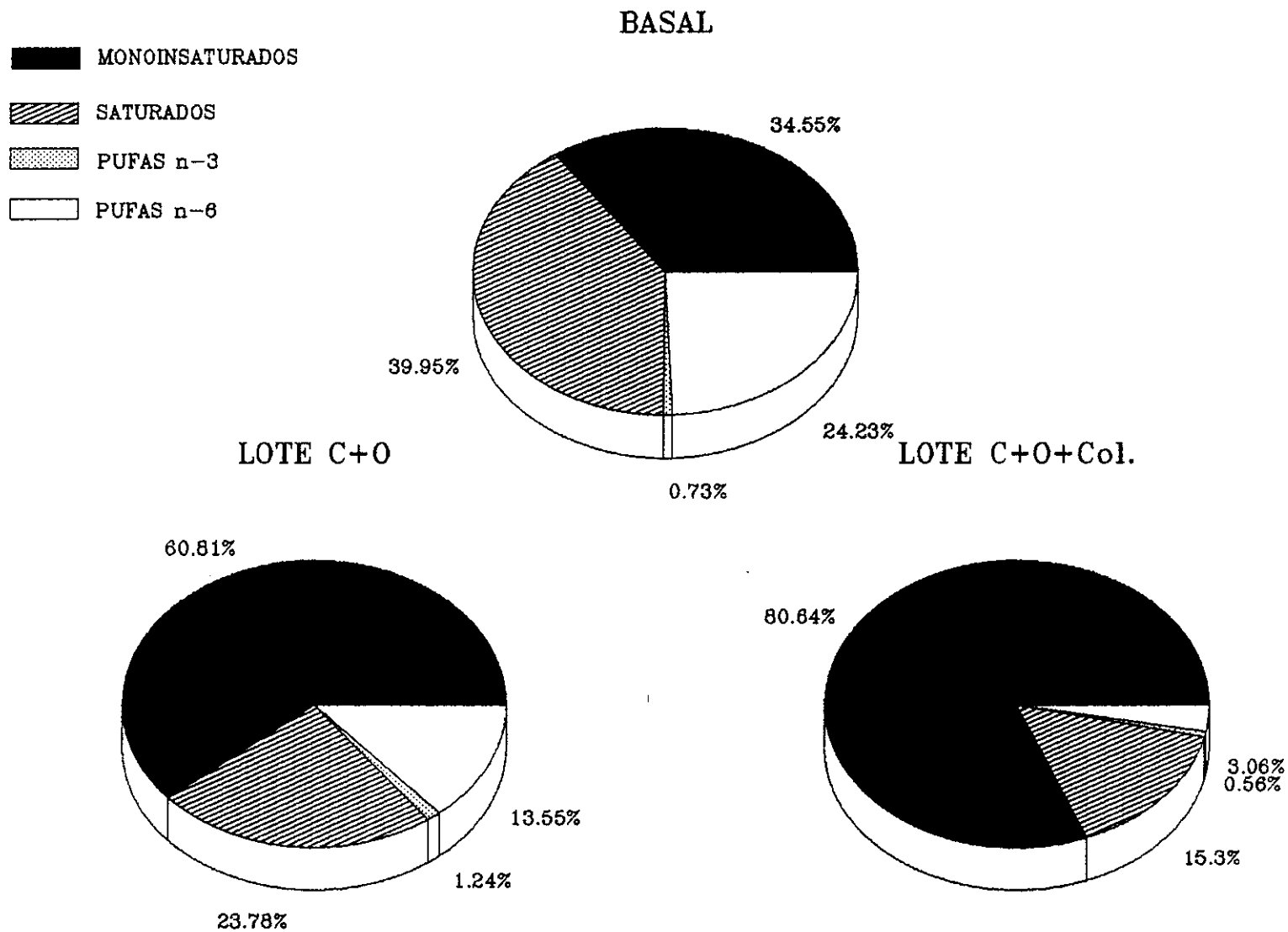
GRAFICA 8. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN LA FRACCION DE TRIGLICERIDOS HEPATICOS. (Experiencia A)



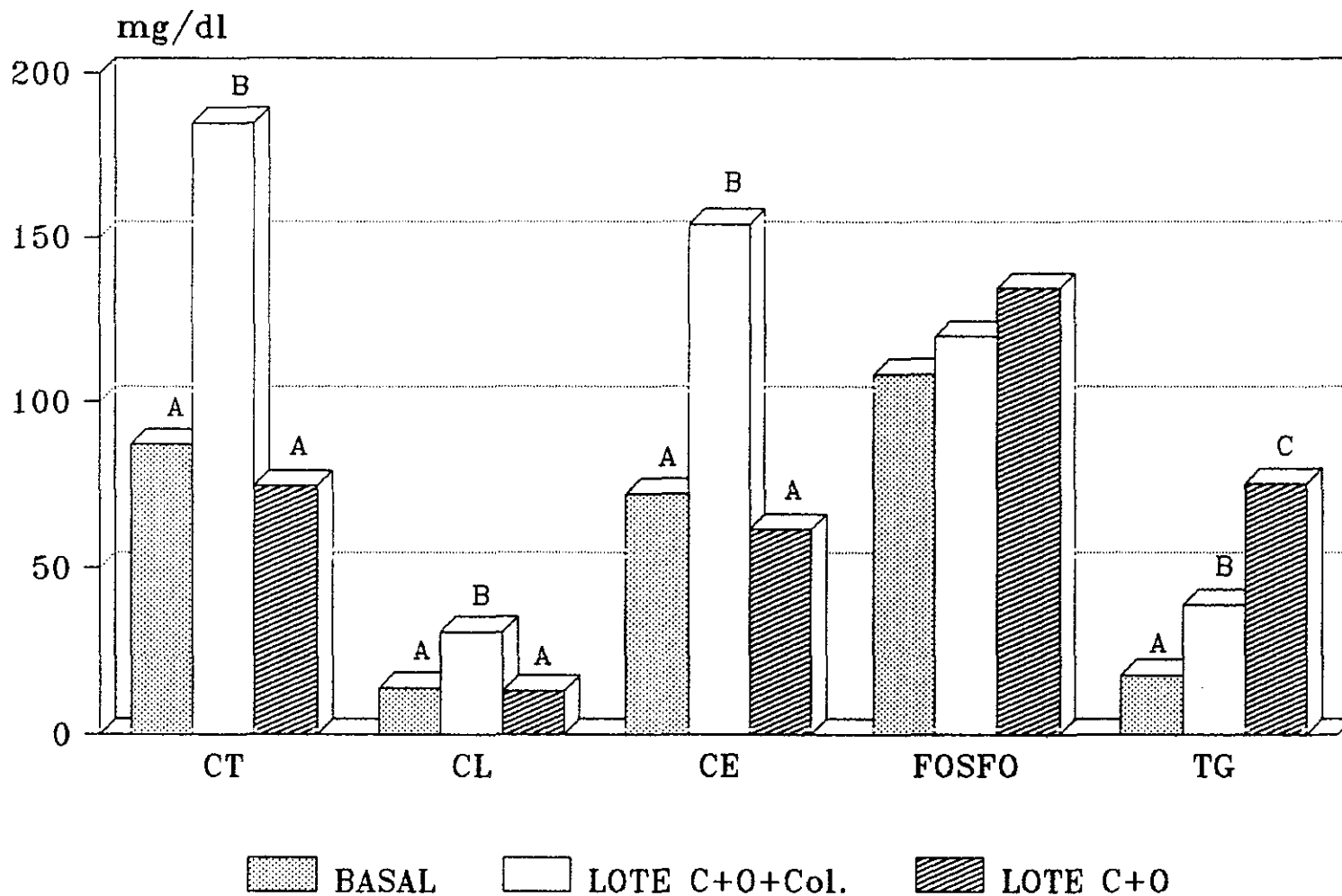
GRAFICA 9. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN LA FRACCION DE FOSFOLIPIDOS HEPATICOS. (Experiencia A)



GRAFICA 10. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN LA FRACCION DE COLESTEROL ESTERIFICADO HEPATICO. (Experiencia A)

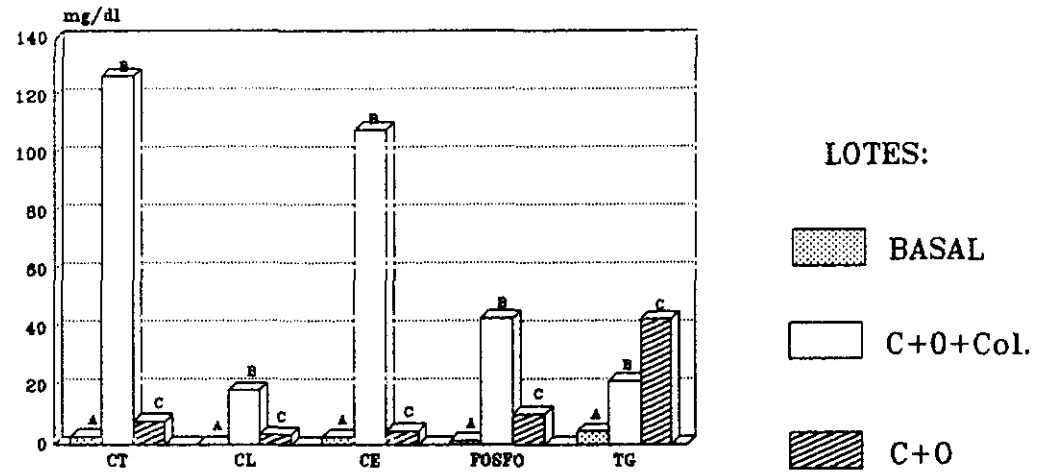


GRAFICA 11. CONCENTRACION PLASMATICA DE COLESTEROL TOTAL (CT), LIBRE (CL) Y ESTERIFICADO (CE), FOSFOLIPIDOS (FOSFO) Y TRIGLICERIDOS (TG). (Experiencia A).

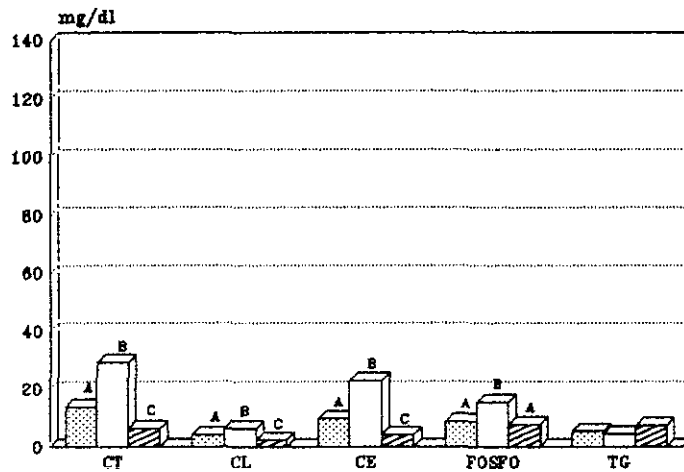


GRAFICA 12. CONCENTRACION LIPIDICA PLASMATICA (mg/dl) EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A).

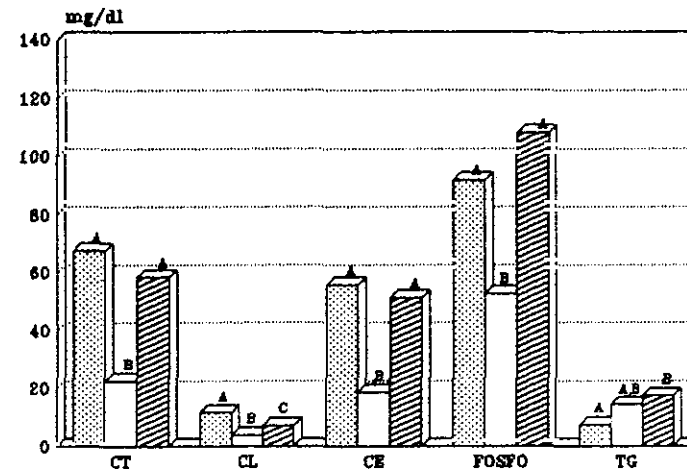
VLDL



LDL



HDL

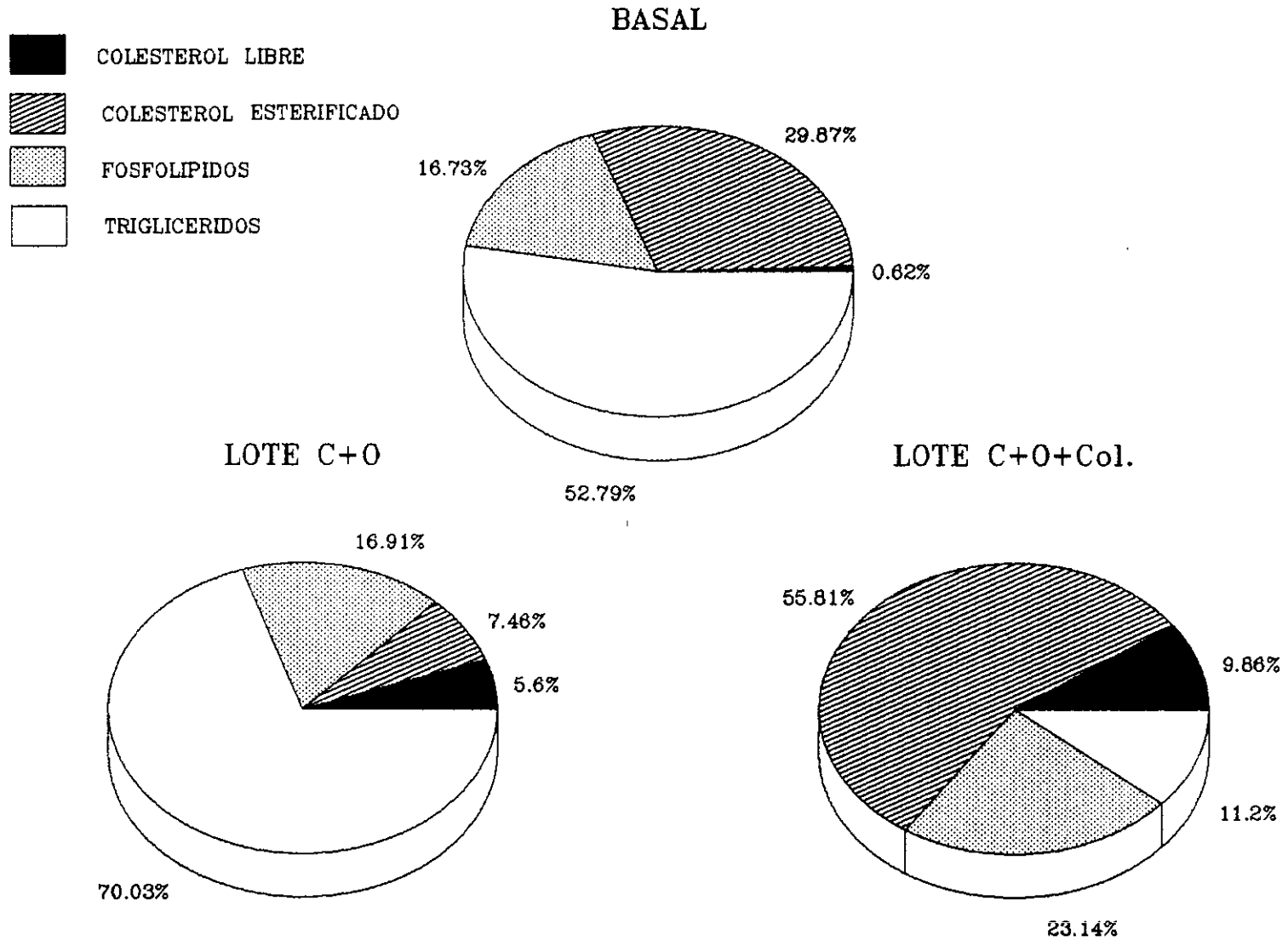


CT=Colesterol Total; CL= Colesterol Libre

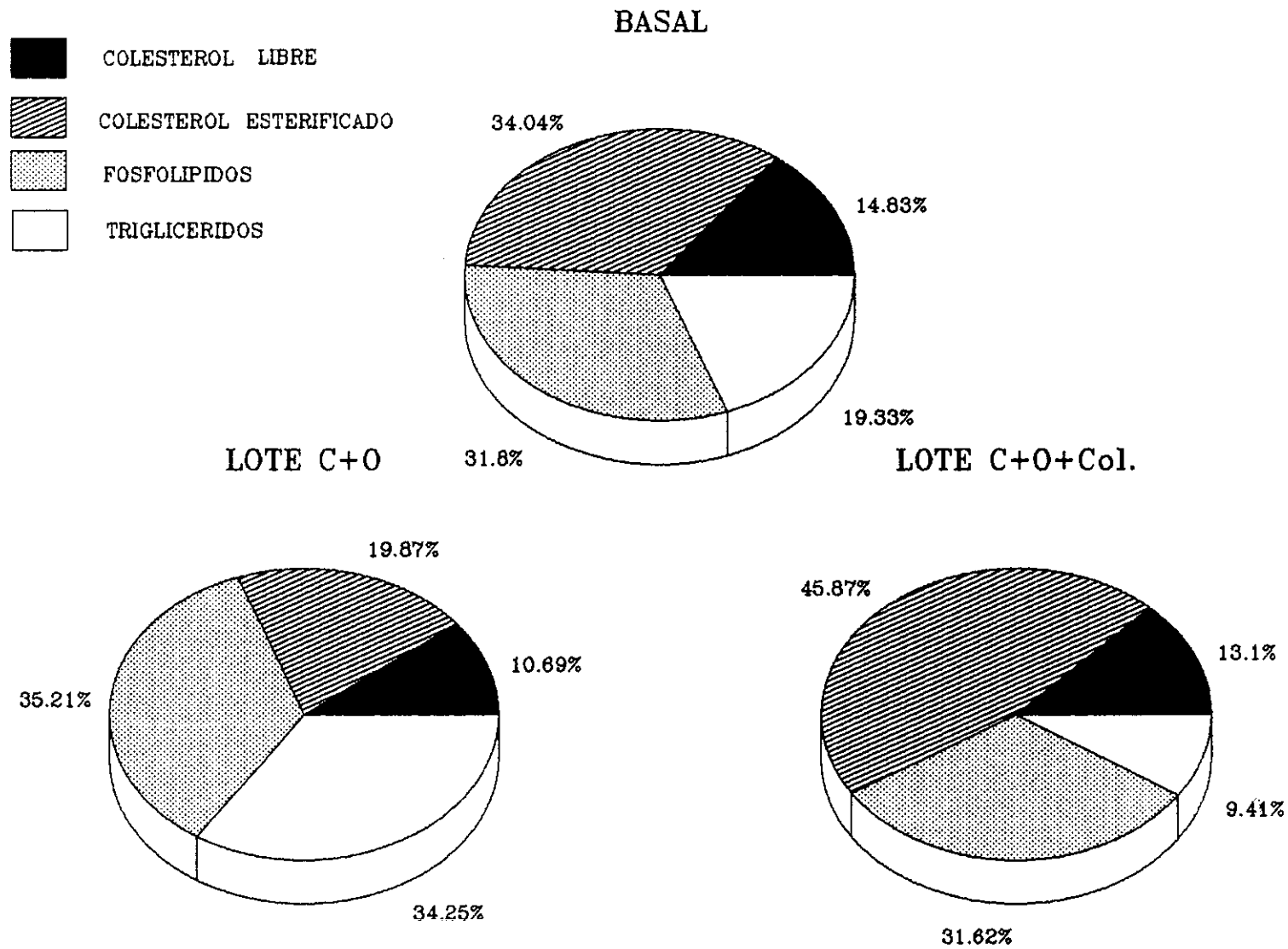
; CE=Colesterol Esterificado; FOSFO= Fosfolipidos;

TG=Trigliceridos.

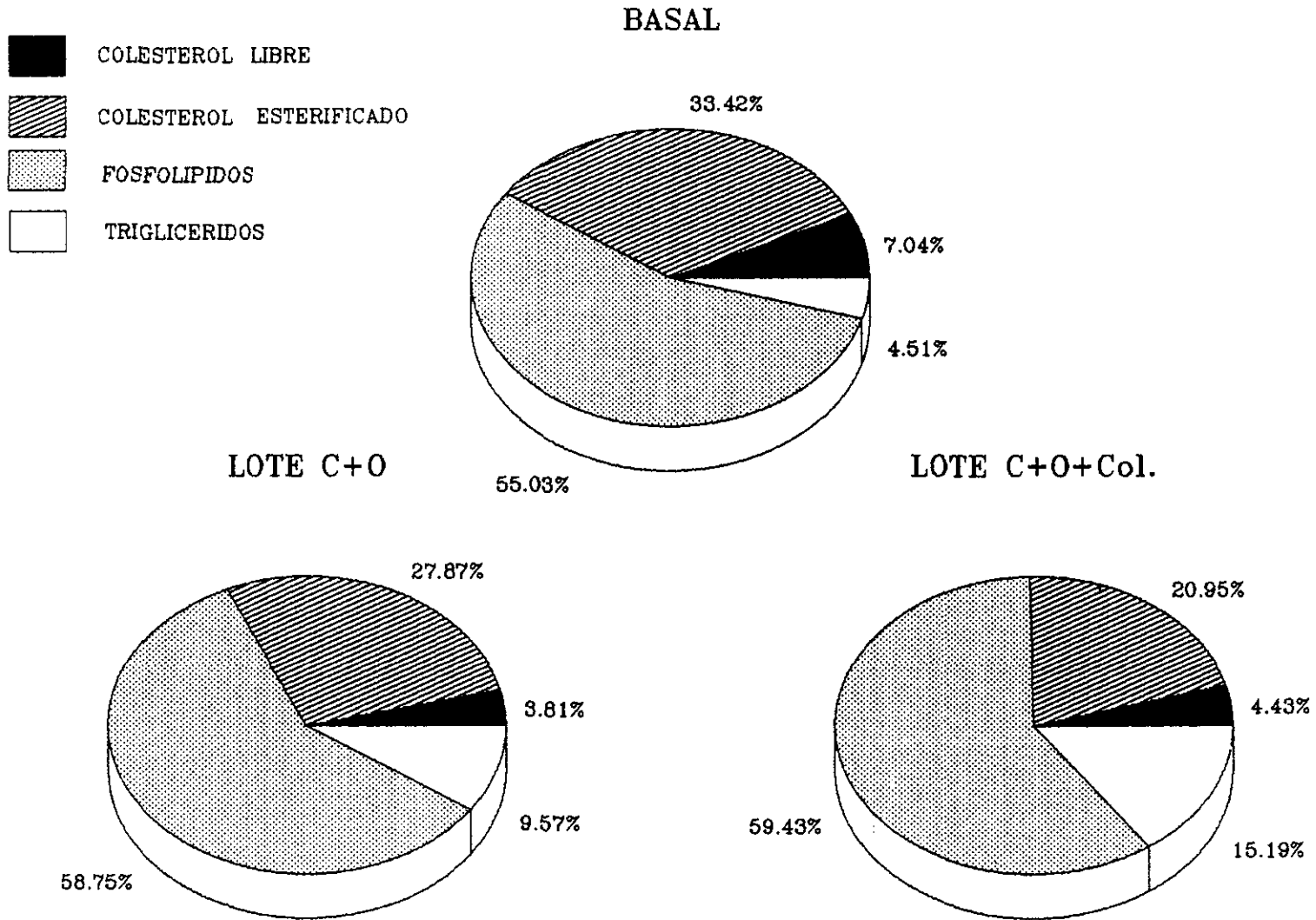
GRAFICA 13. COMPOSICION PORCENTUAL LIPIDICA DE LAS VLDL SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A)



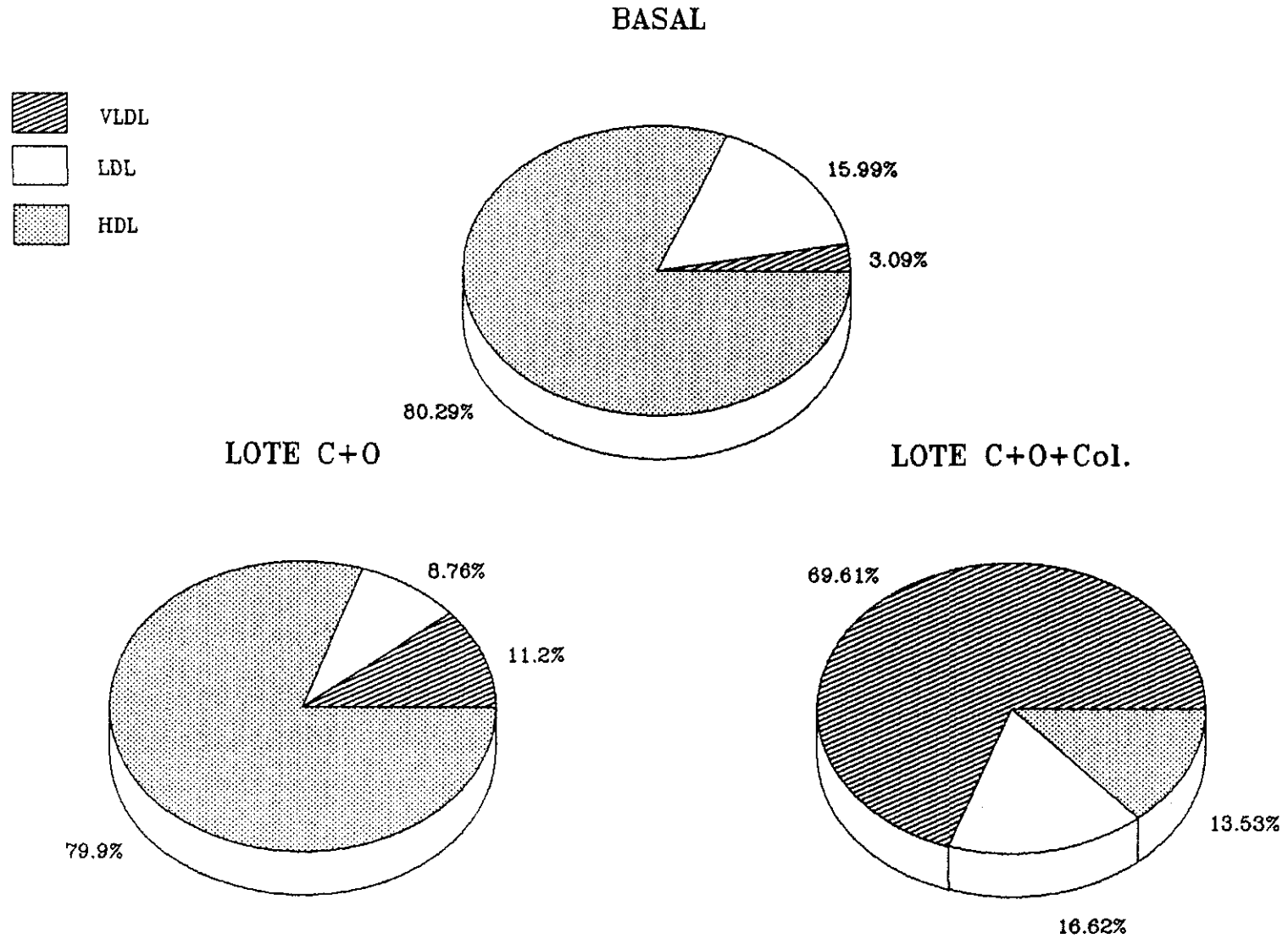
GRAFICA 14. COMPOSICION PORCENTUAL LIPIDICA DE LAS LDL SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A)



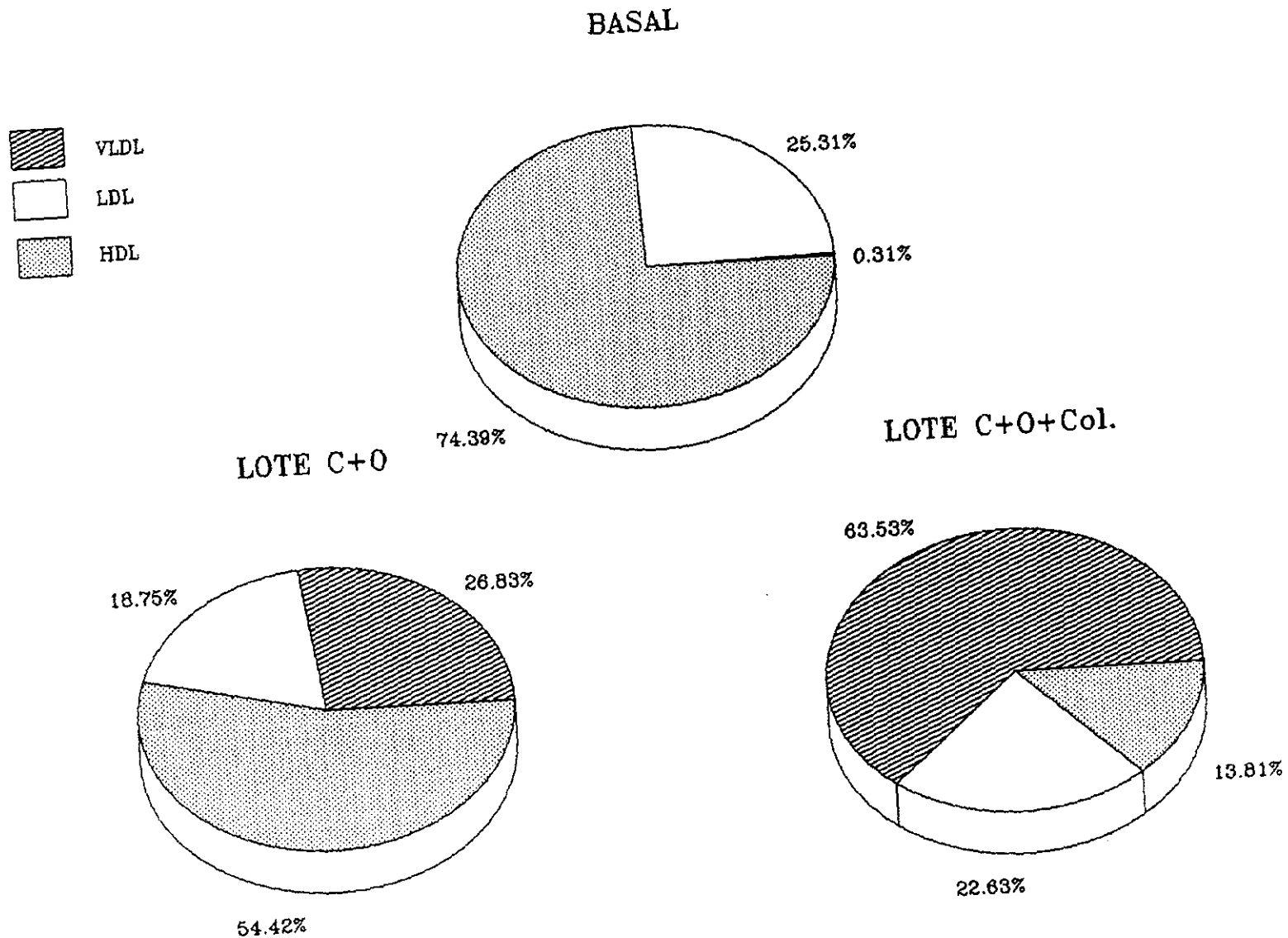
GRAFICA 15. COMPOSICION PORCENTUAL LIPIDICA DE LAS HDL SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A)



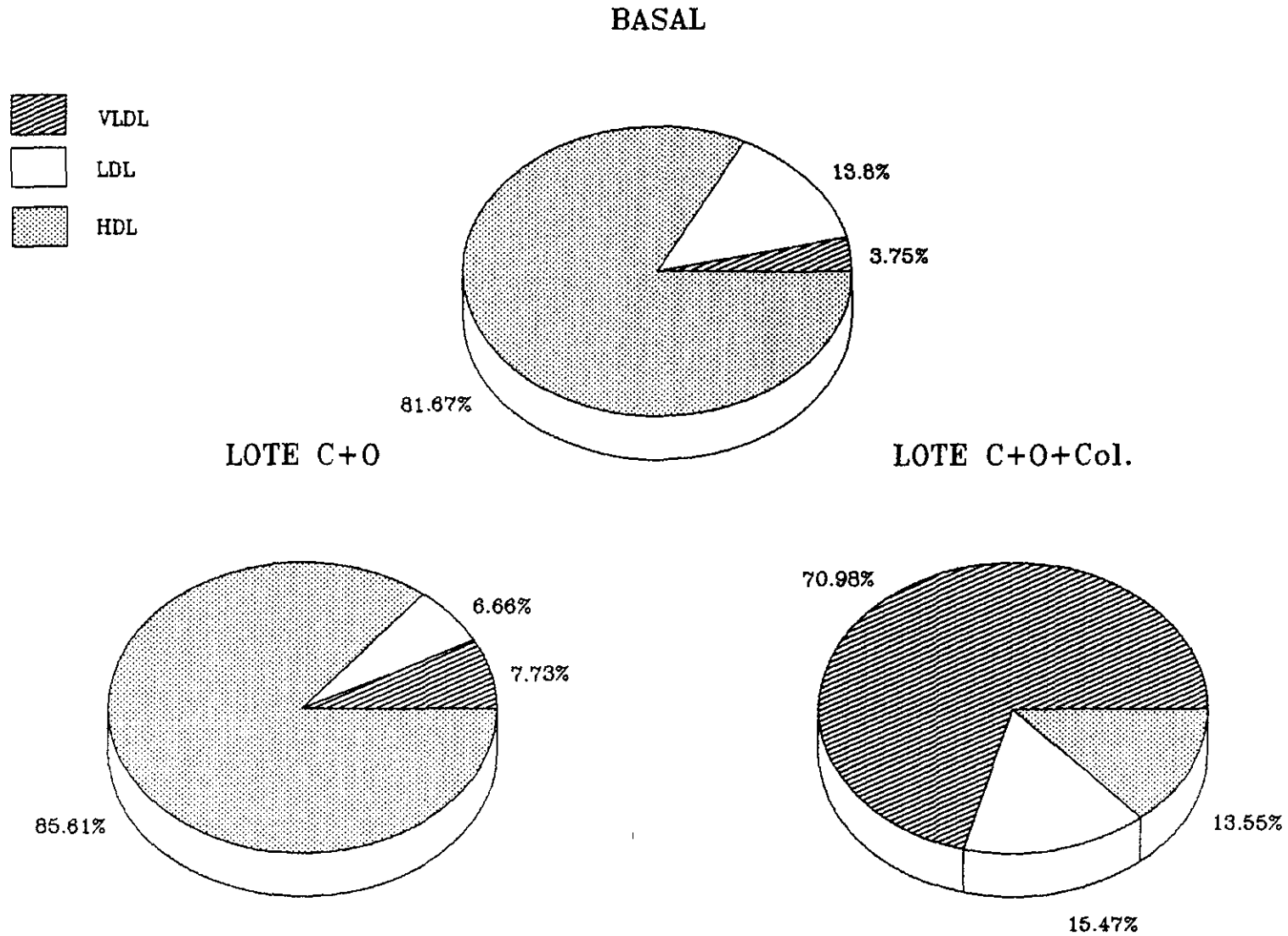
GRAFICA 16. DISTRIBUCION DEL COLESTEROL TOTAL EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A)



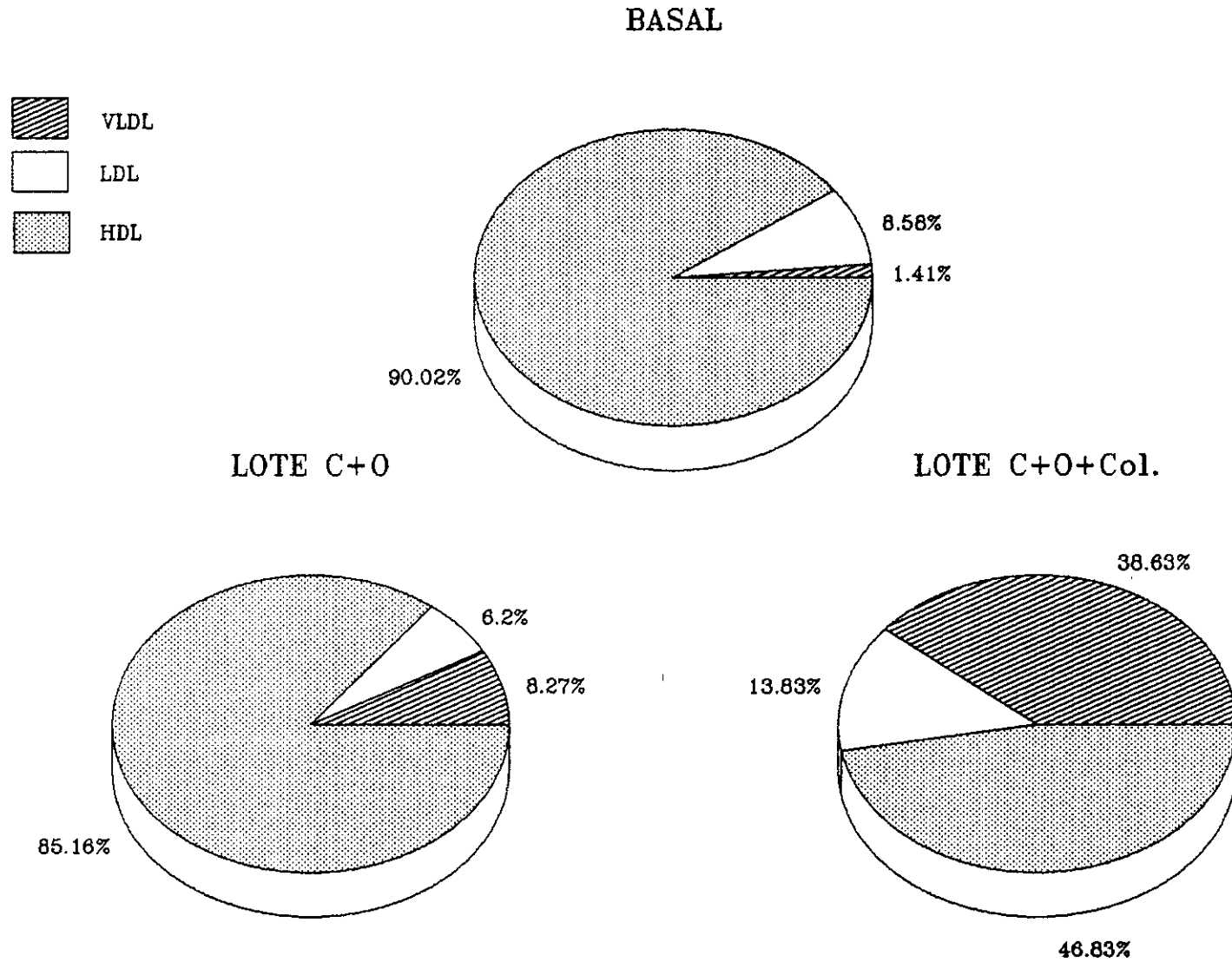
GRAFICA 17. DISTRIBUCION DEL COLESTEROL LIBRE EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A)



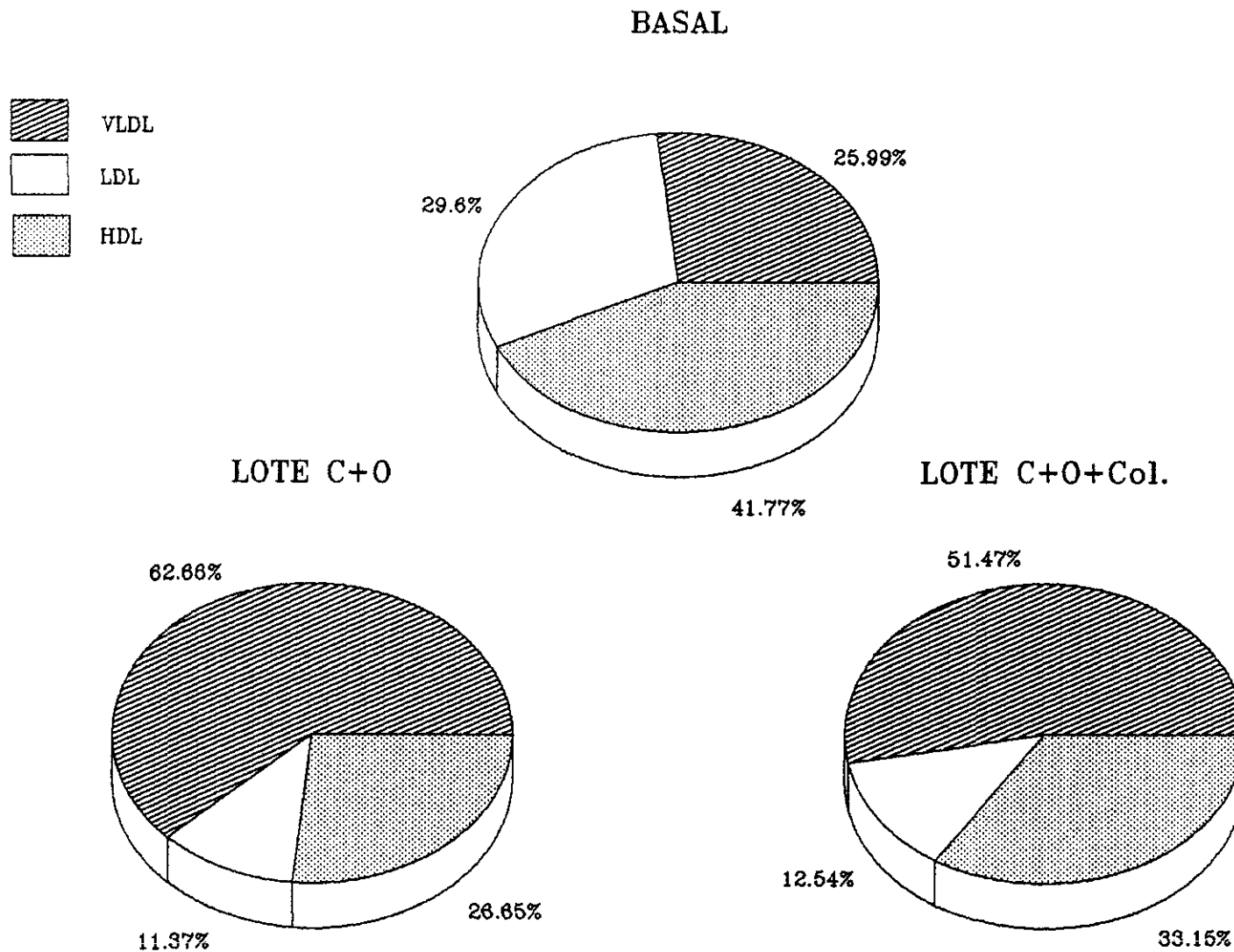
GRAFICA 18. DISTRIBUCION DEL COLESTEROL ESTERIFICADO EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A)



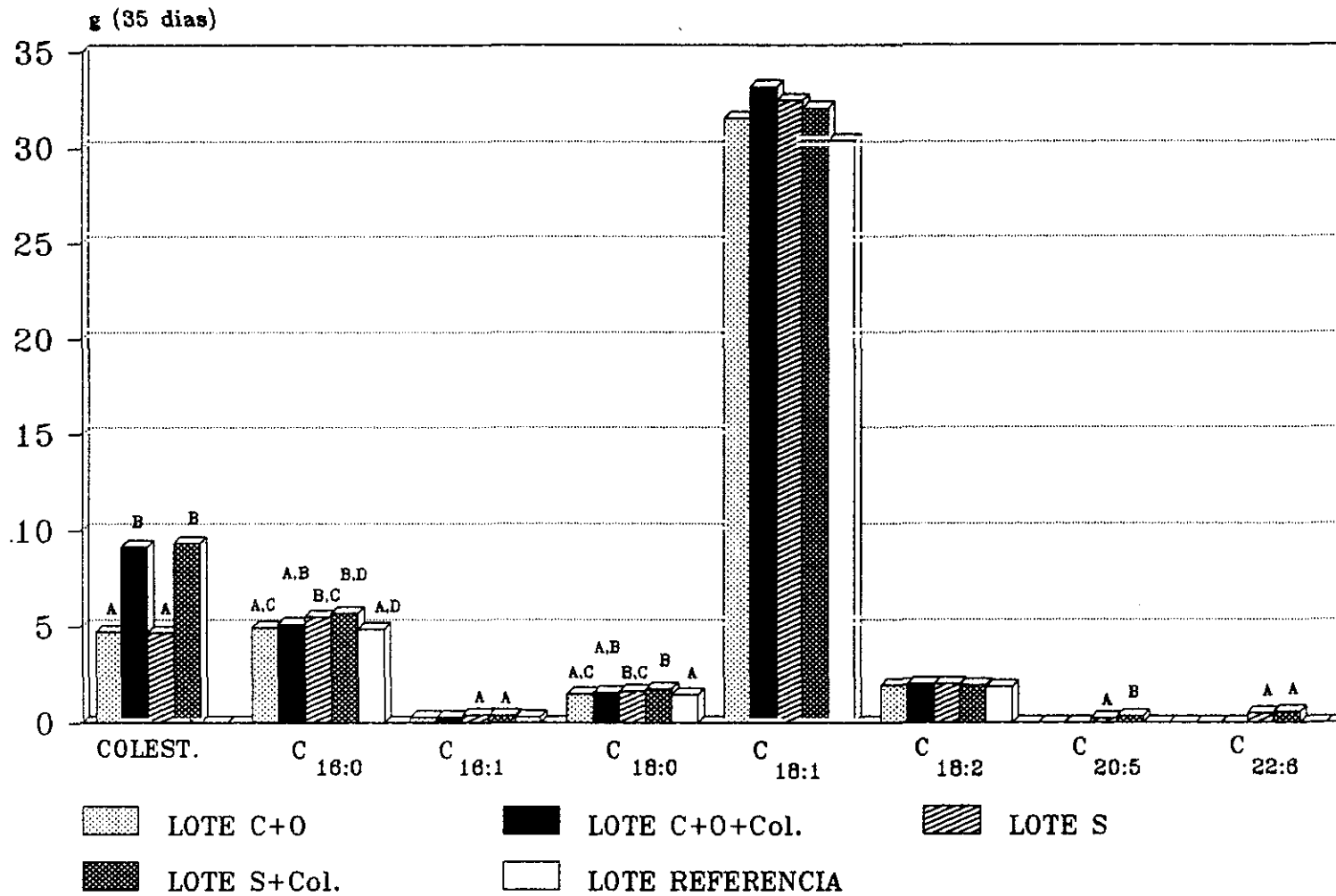
GRAFICA 19. DISTRIBUCION DE LOS FOSFOLIPIDOS EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A)



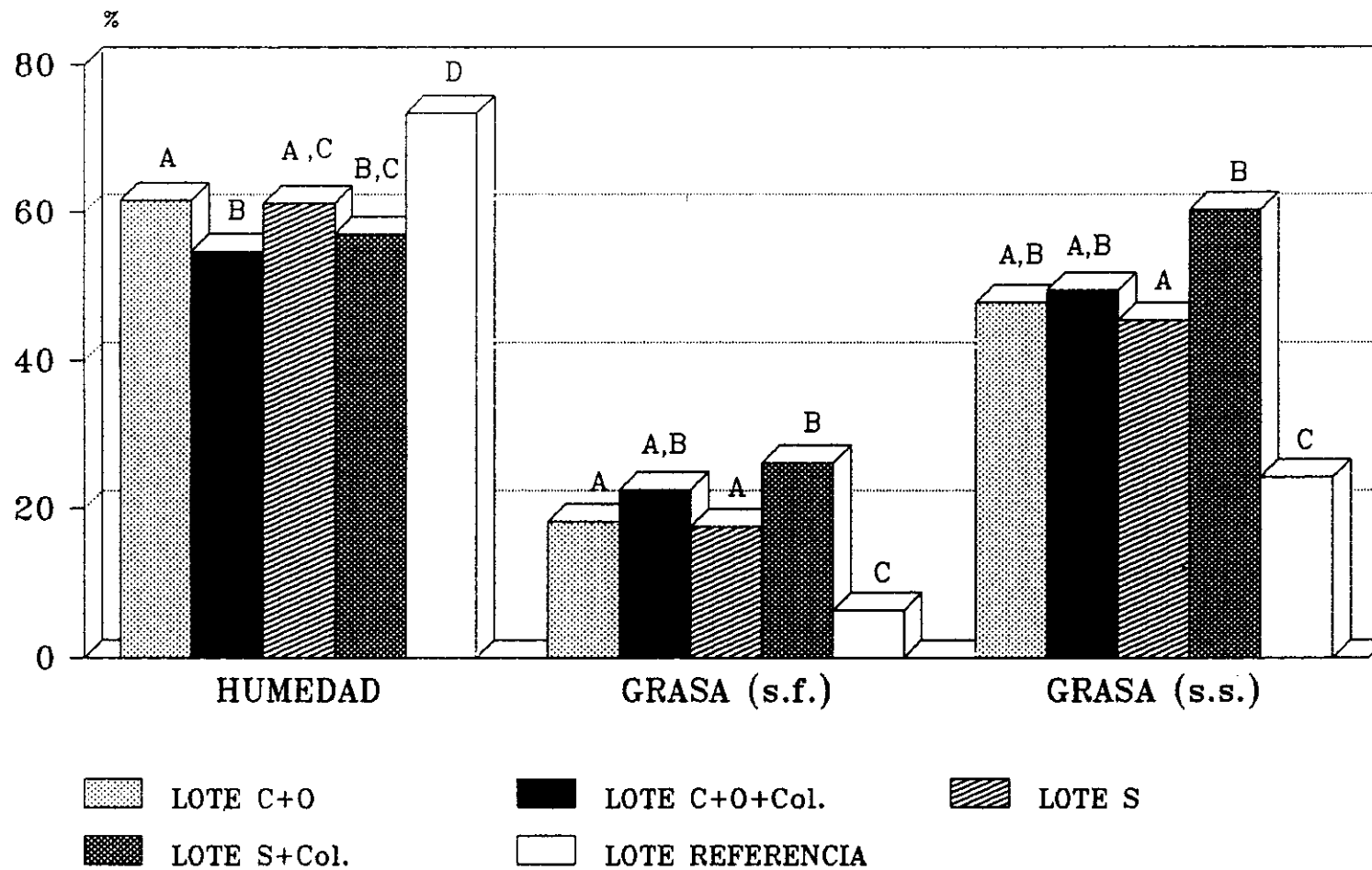
GRAFICA 20. DISTRIBUCION DE LOS TRIGLICERIDOS EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia A)



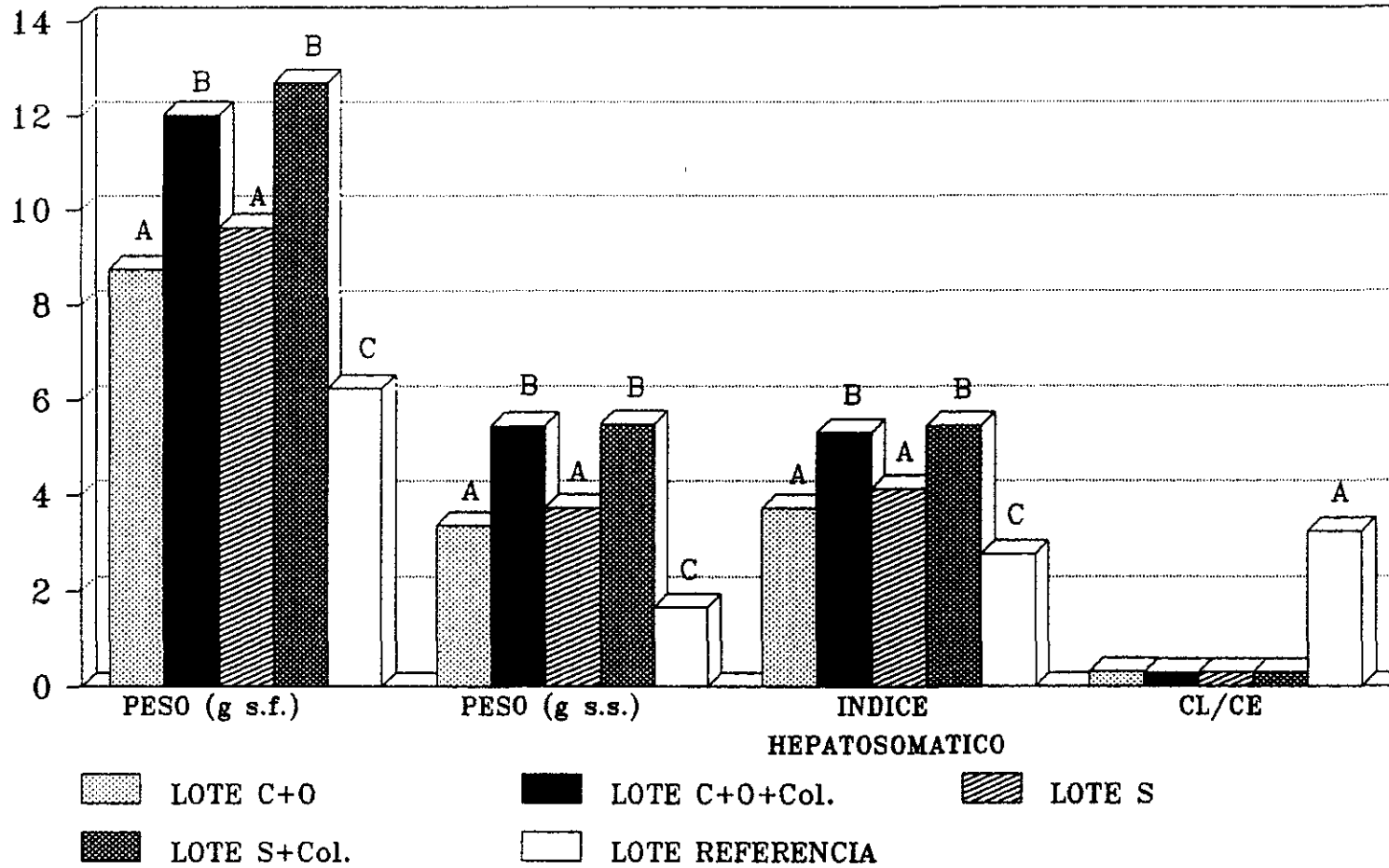
GRAFICA 21. INGESTA DE COLESTEROL Y DE LOS PRINCIPALES ACIDOS GRASOS POR LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia B)



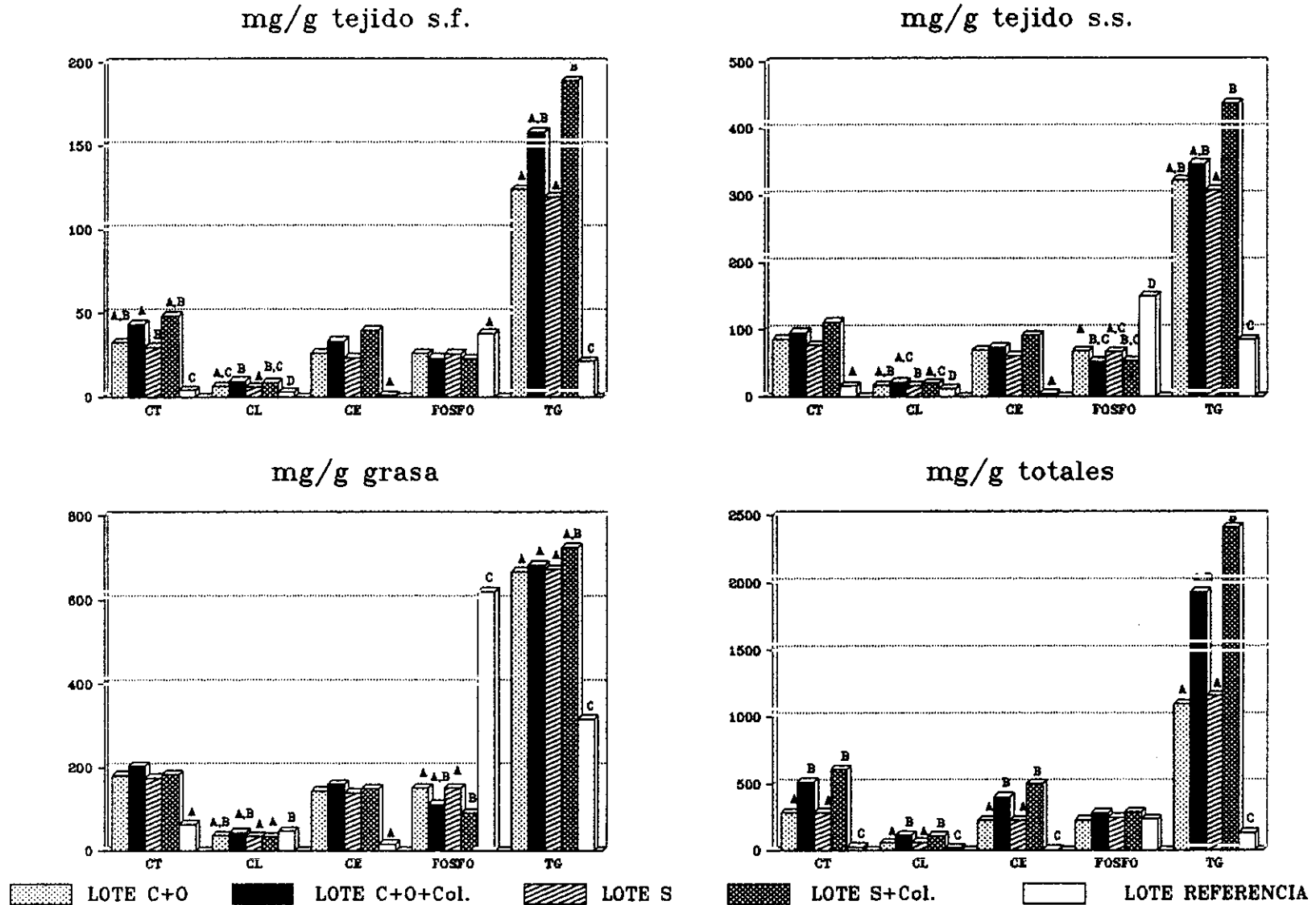
GRAFICA 22. COMPOSICION PORCENTUAL EN HUMEDAD Y GRASA EN LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia B).



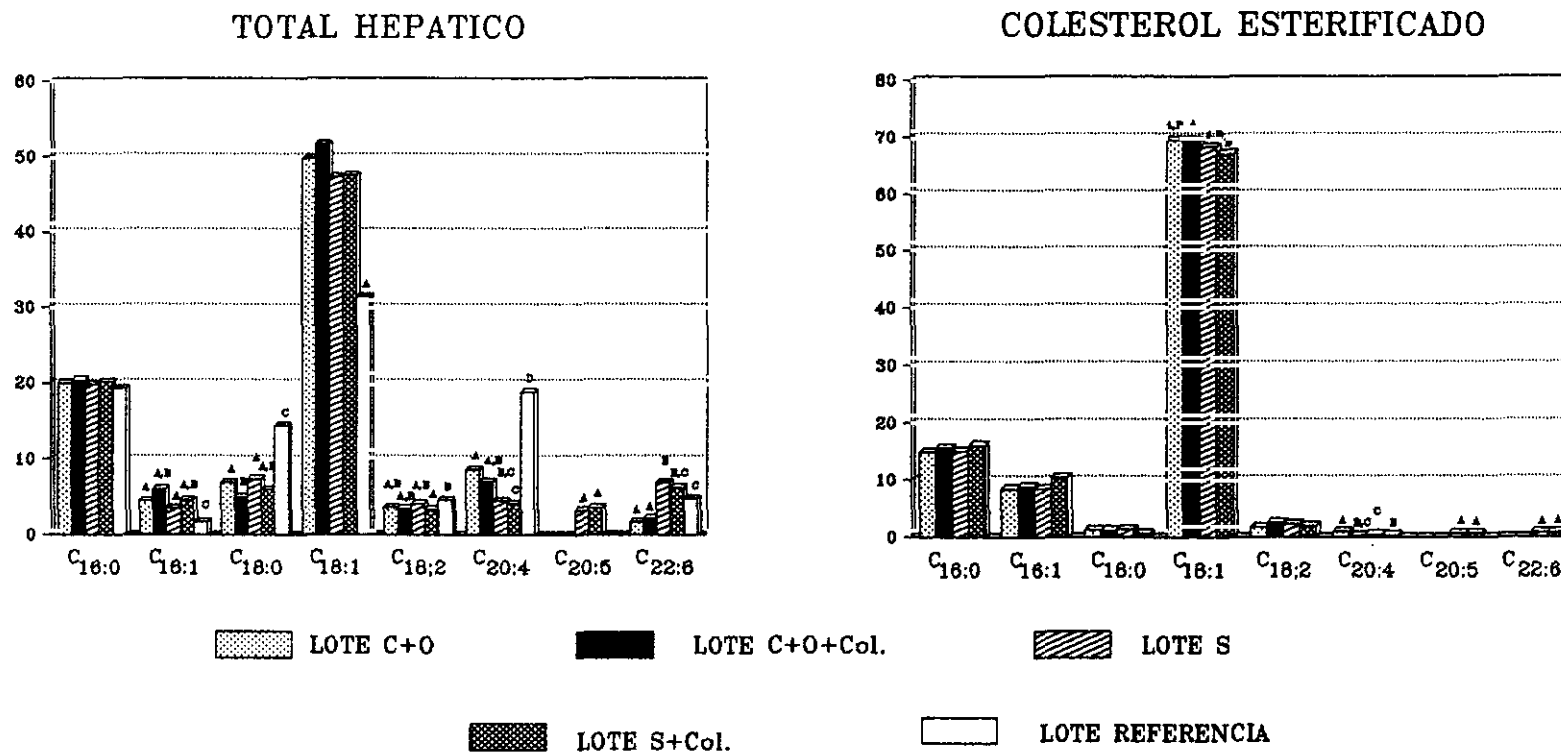
GRAFICA 23. PESO DE HIGADOS, INDICE RELATIVO HEPATOSOMATICO Y RELACION COLESTEROL LIBRE/COLESTEROL ESTERIFICADO (CL/CE) EN LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia B).



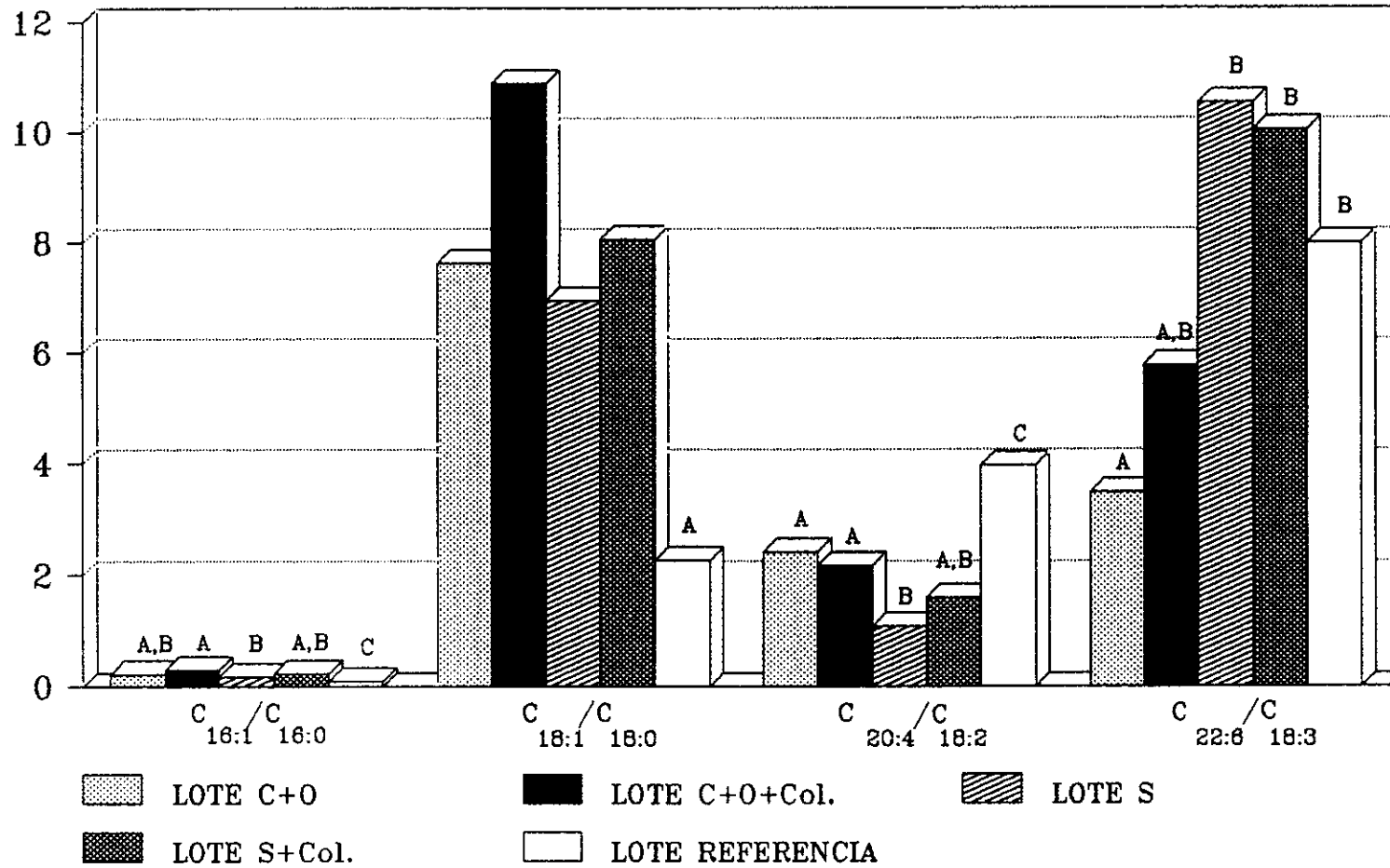
GRAFICA 24. CONCENTRACION DE COLESTEROL TOTAL (CT), LIBRE (CL) Y ESTERIFICADO (CE), FOSFOLIPIDOS (FOSFO) Y TRIGLICERIDOS (TG) EN LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia B)



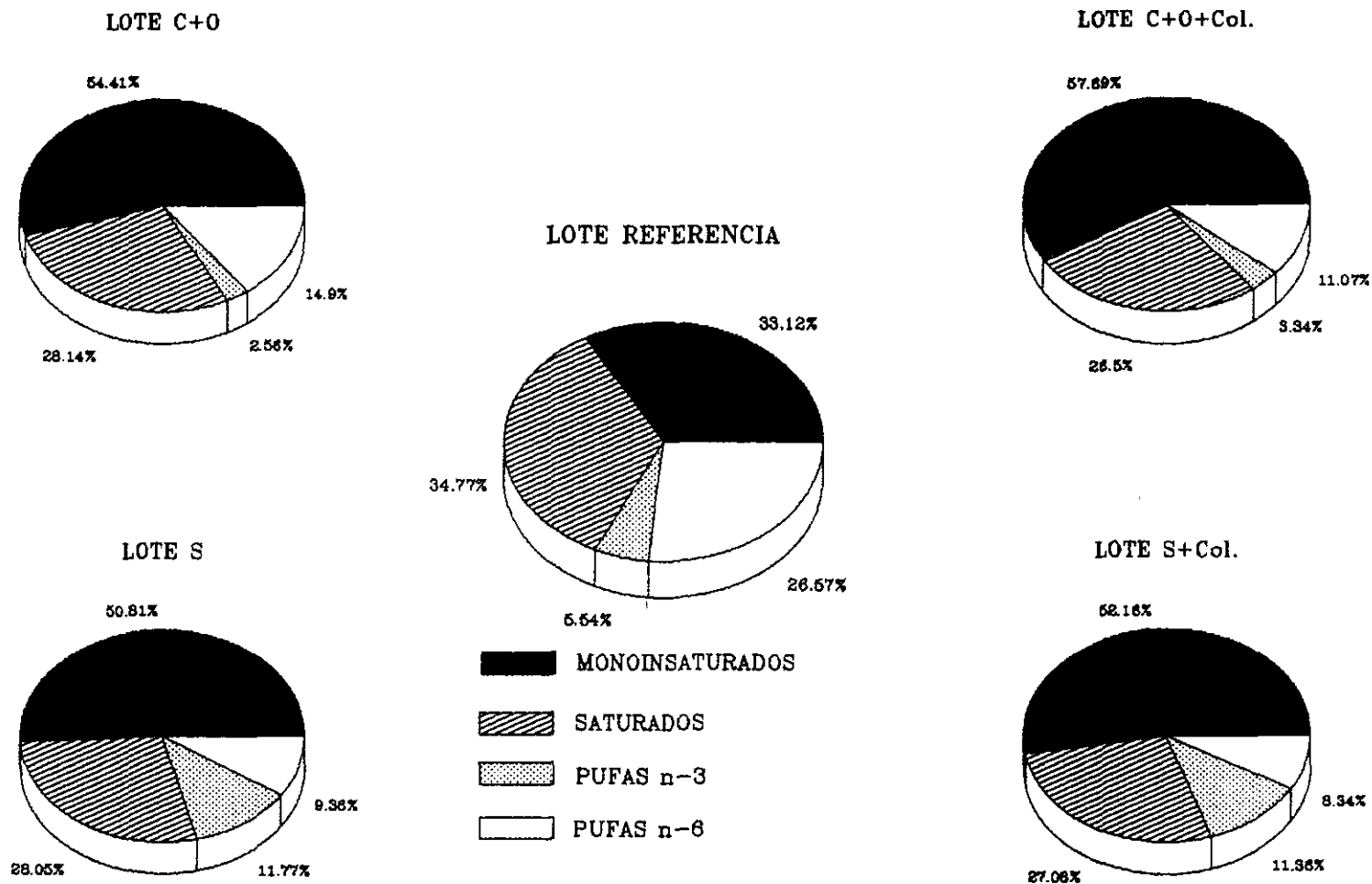
GRAFICA 25. COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS PRINCIPALES ACIDOS DEL TOTAL HEPATICO Y DE LA FRACCION DE COLESTEROL ESTERIFICADO. (Experiencia B)



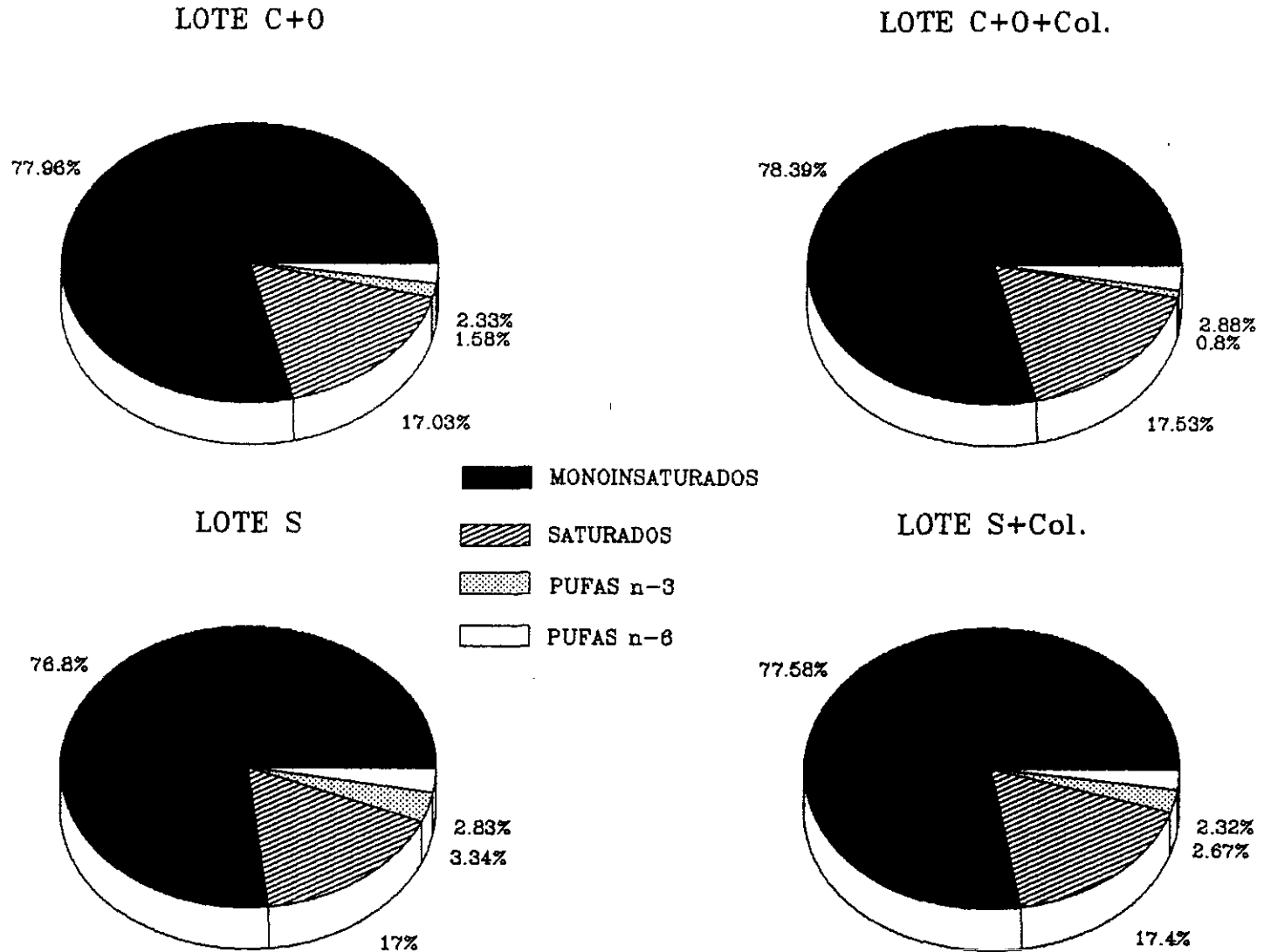
GRAFICA 26. RELACIONES ACIDOS PALMITOLEICO/PALMITICO, OLEICO/ESTEARICO, ARAQUIDONICO/LINOLEICO Y DOCOSAHEXAENOICO/LINOLENICO. (Experiencia B)



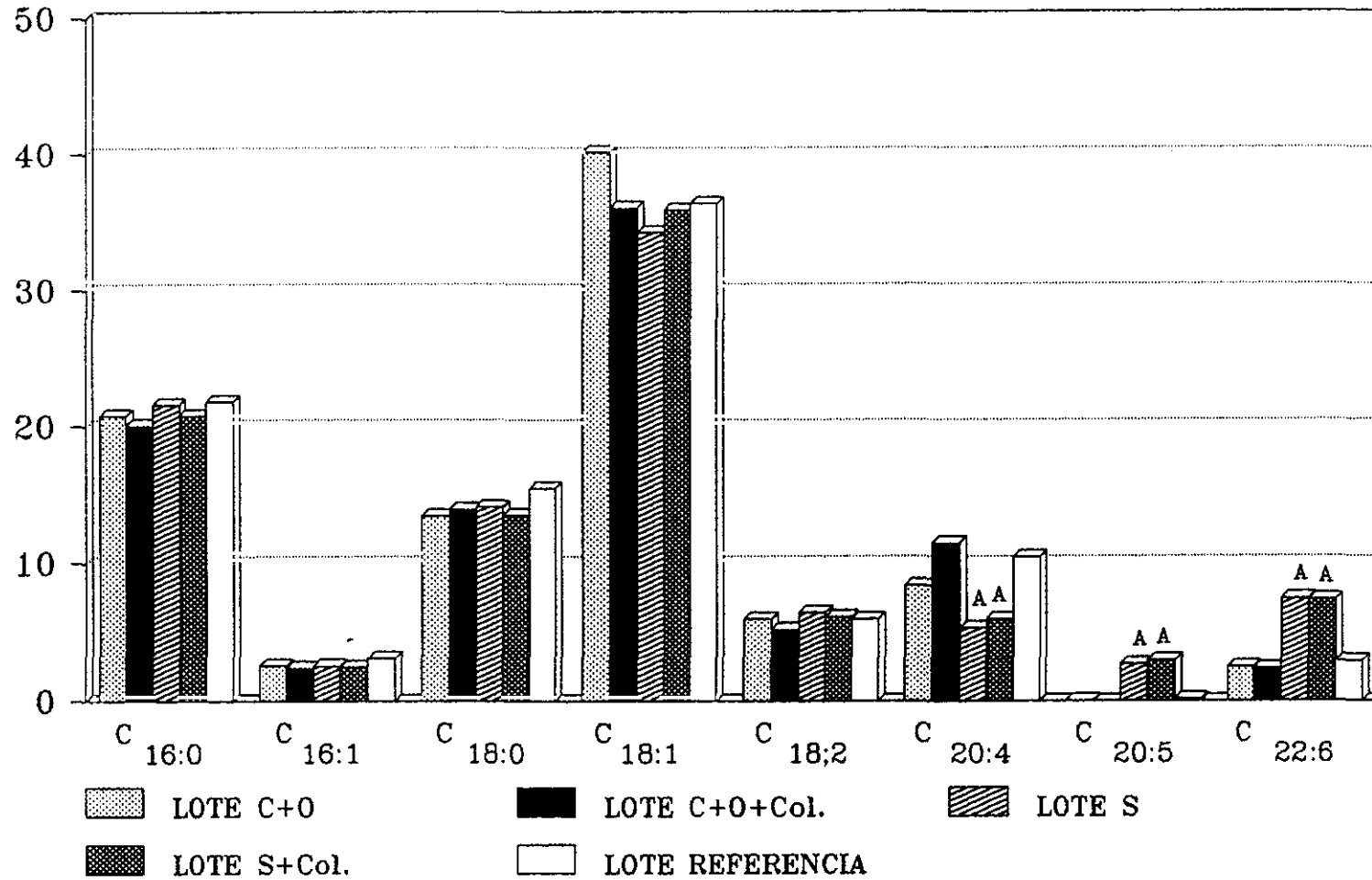
GRAFICA 27. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN EL TOTAL HEPATICO. (Experiencia B)



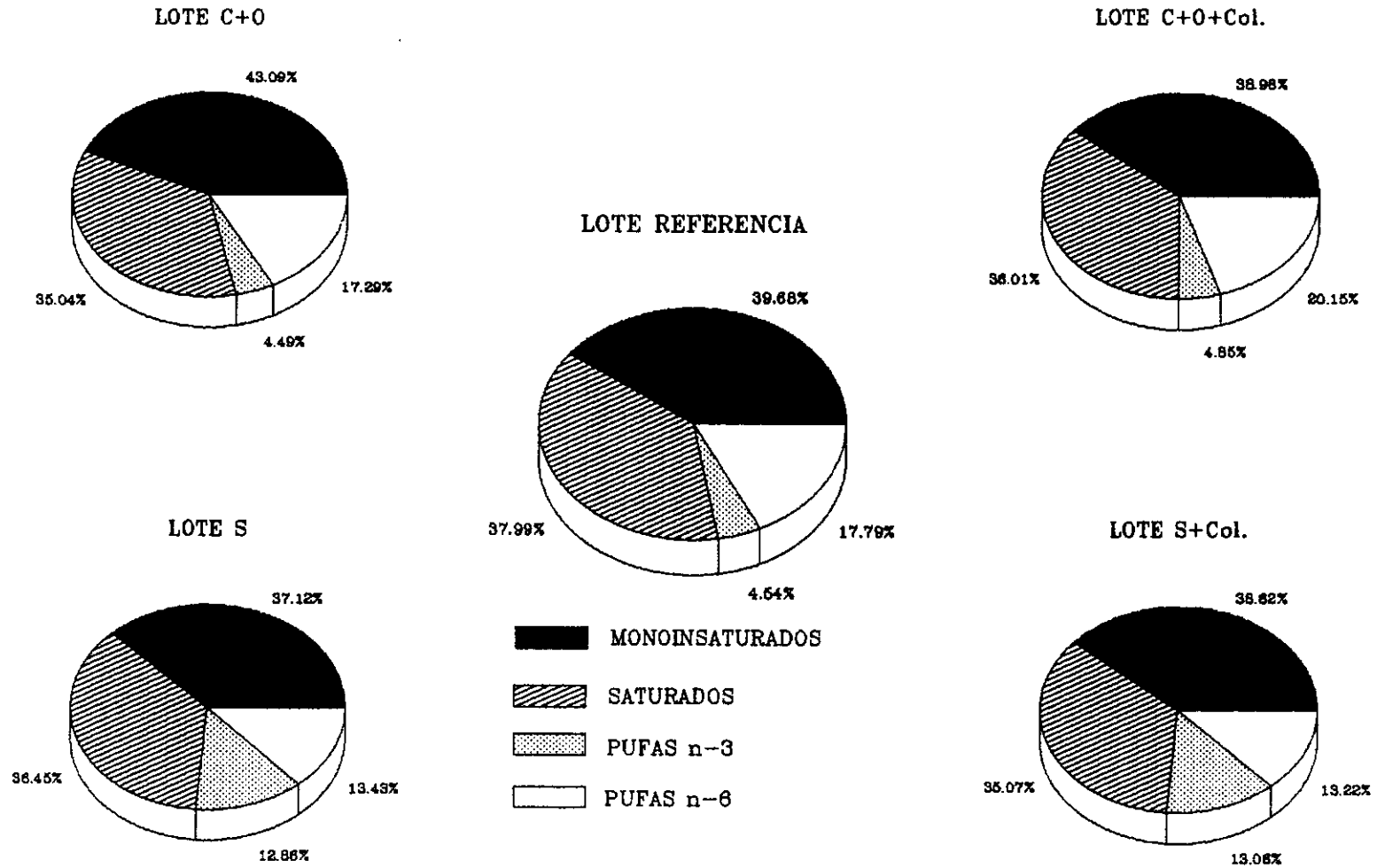
GRAFICA 28. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN LA FRACCION DE COLESTEROL ESTERIFICADO HEPATICO. (Experiencia B)



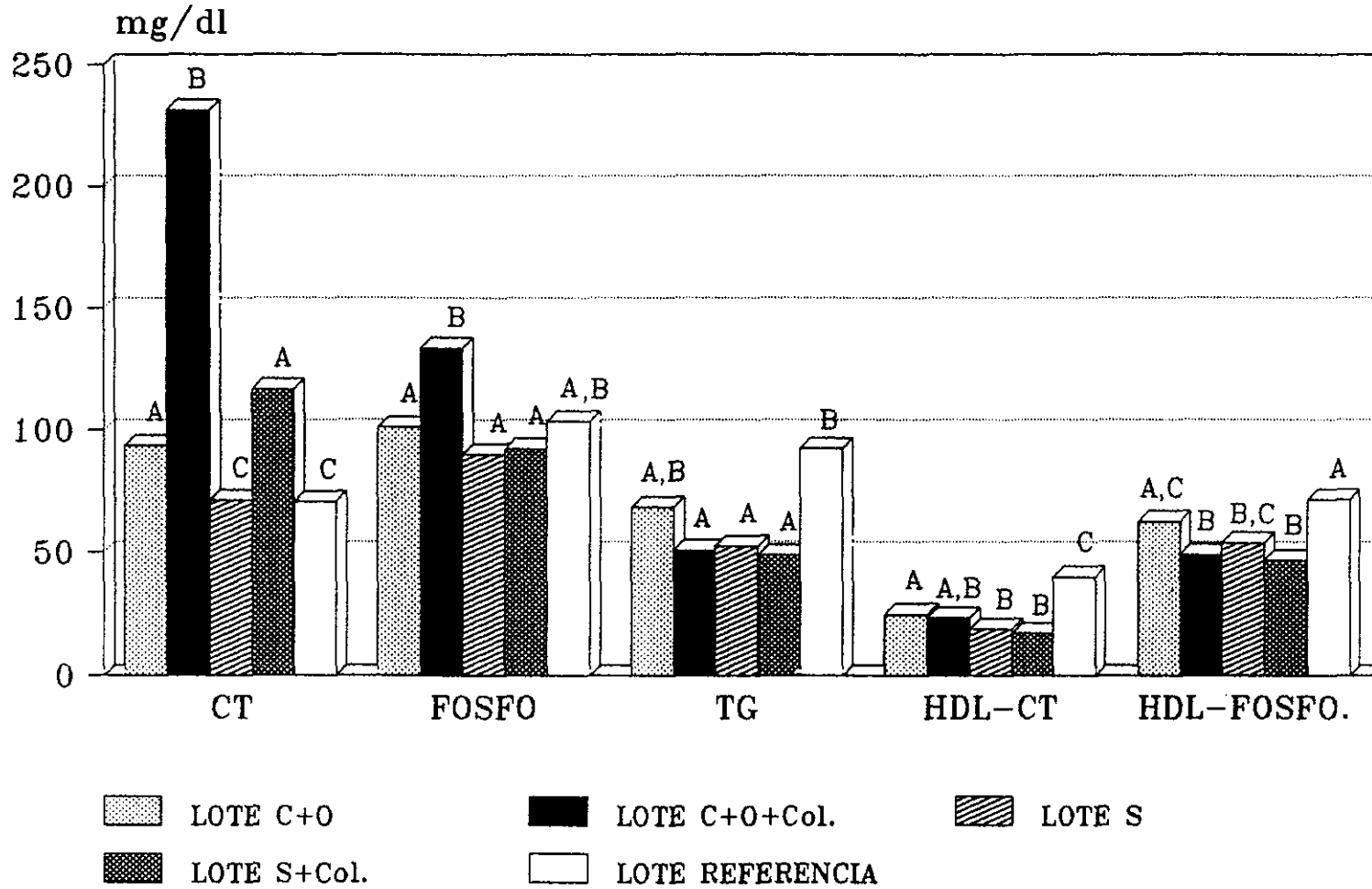
GRAFICA 29. COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS PRINCIPALES ACIDOS GRASOS DEL PLASMA. (Experiencia B)



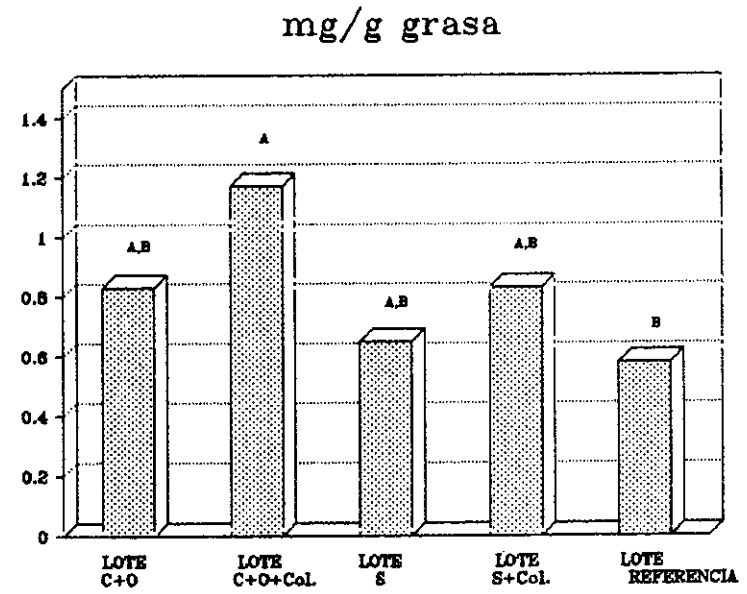
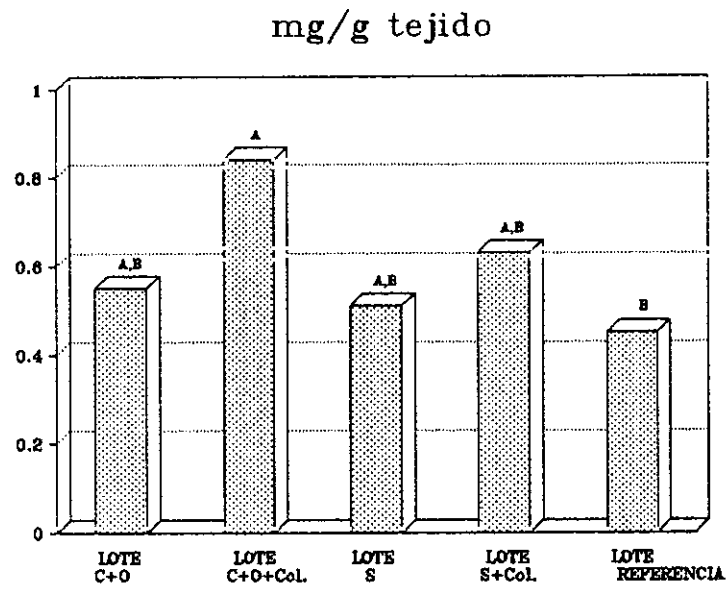
GRAFICA 30. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN EL PLASMA. (Experiencia B)



GRAFICA 31. CONCENTRACION PLASMATICA DE COLESTEROL TOTAL (CT), FOSFOLIPIDOS (FOSFO), TRIGLICERIDOS (TG), HDL-COLESTEROL (HDL-CT) Y HDL-FOSFOLIPIDOS (HDL-FOSFO). (Experiencia B)

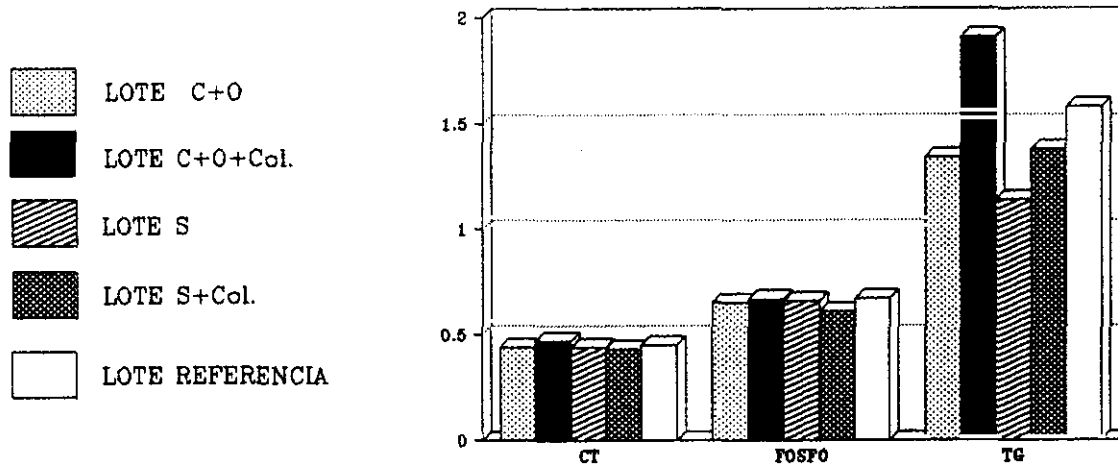


GRAFICA 32. CONCENTRACION DE COLESTEROL EN EL TEJIDO ADIPOSEO DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia B)

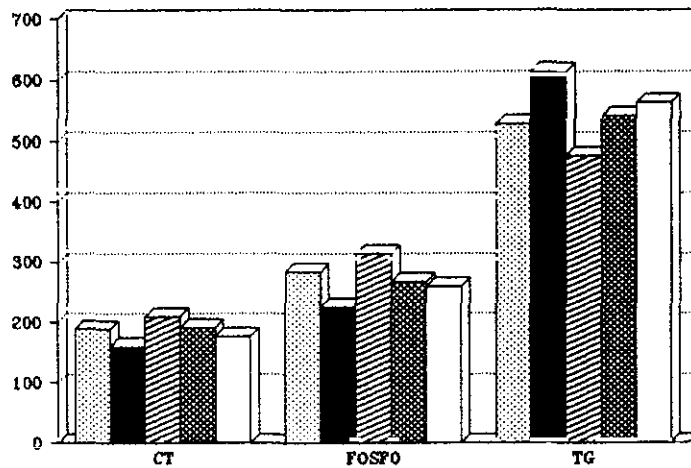


GRAFICA 33. CONCENTRACION DE COLESTEROL TOTAL (CT), FOSFOLIPIDOS (FOSFO) Y TRIGLICERIDOS (TG) EN EL BAZO DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia B)

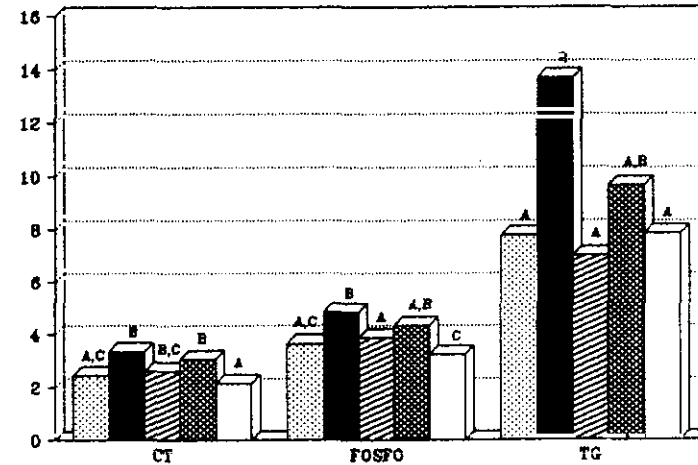
mg/100 mg tejido



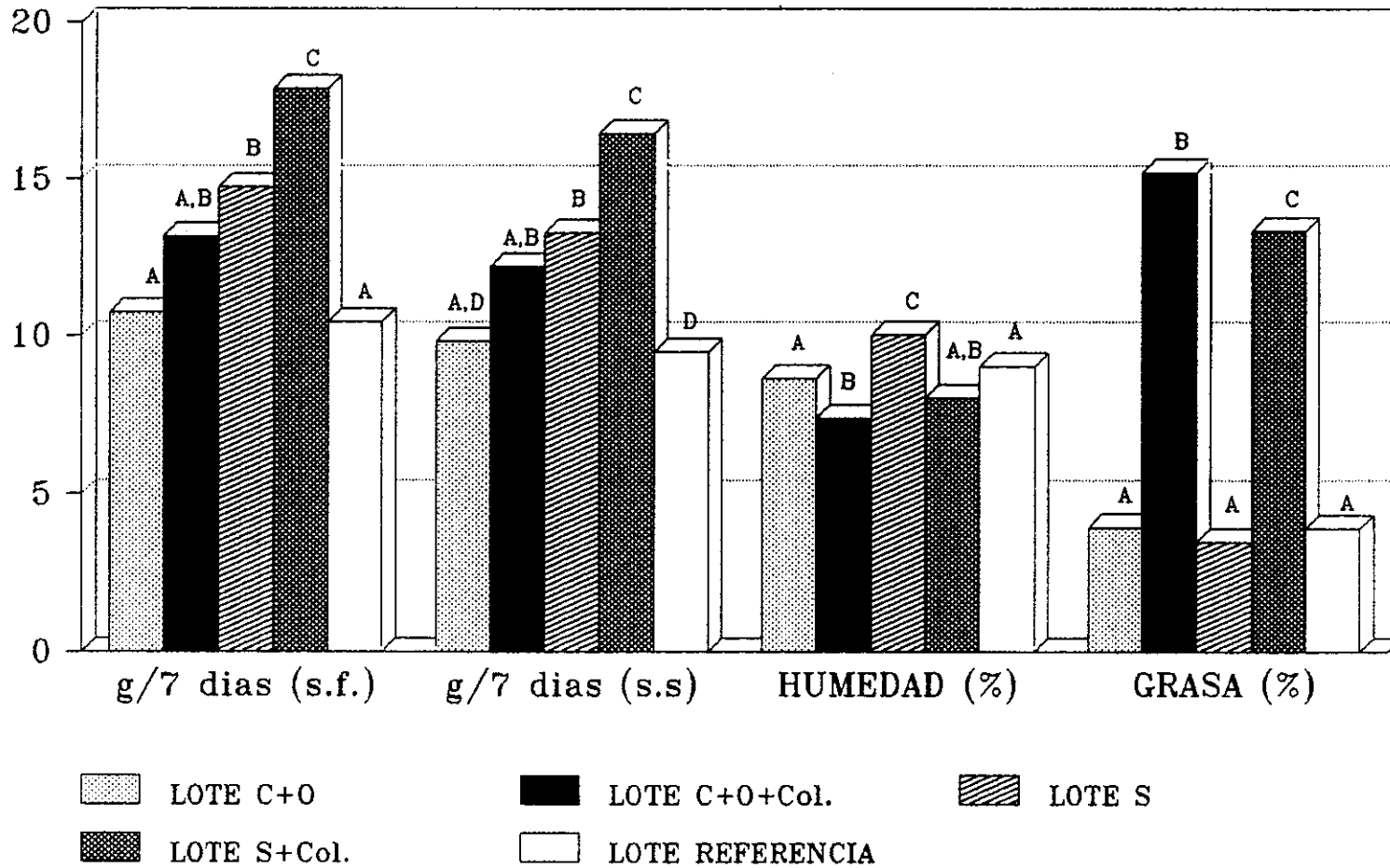
mg/g grasa



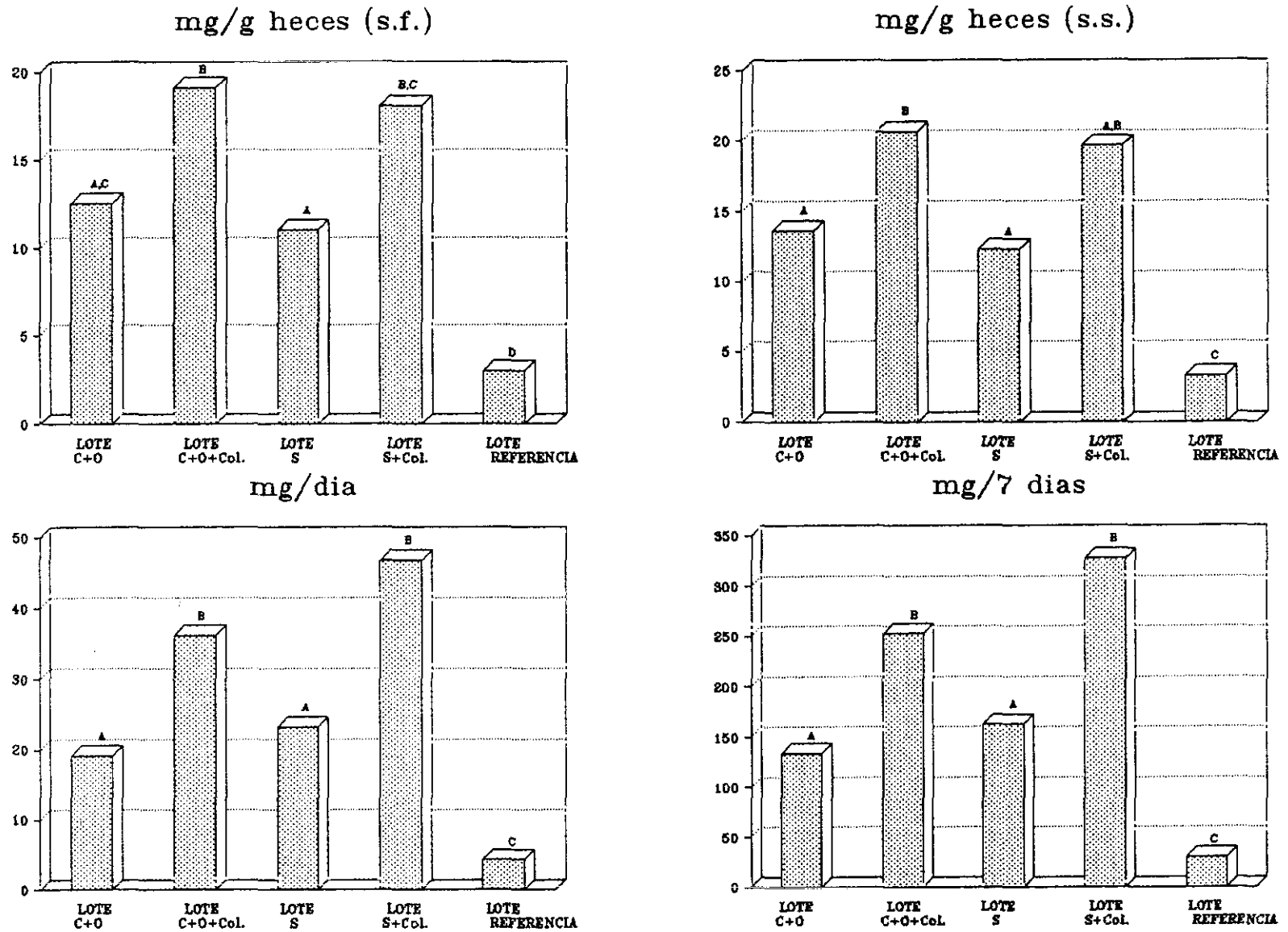
mg totales



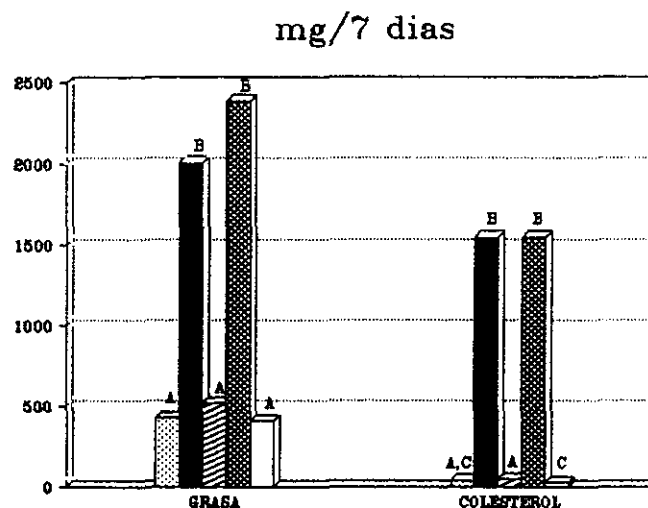
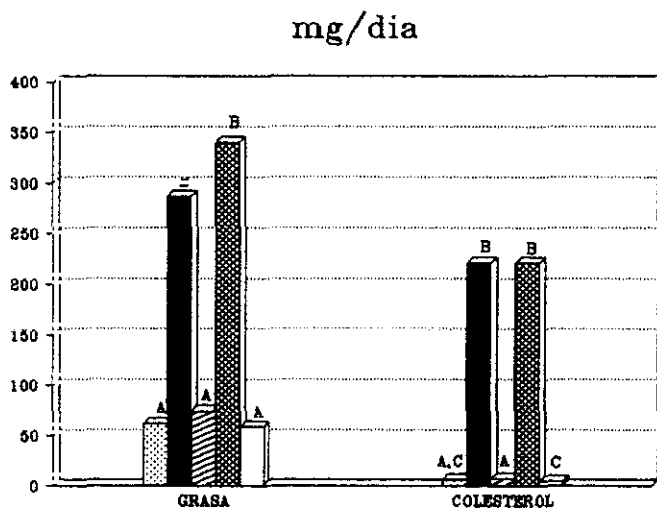
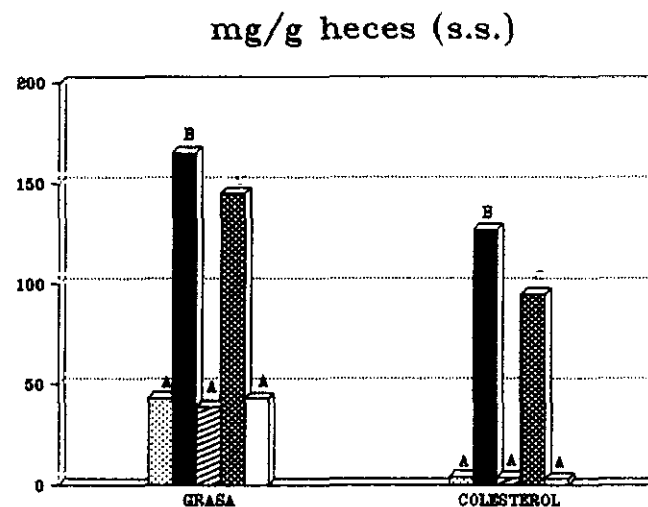
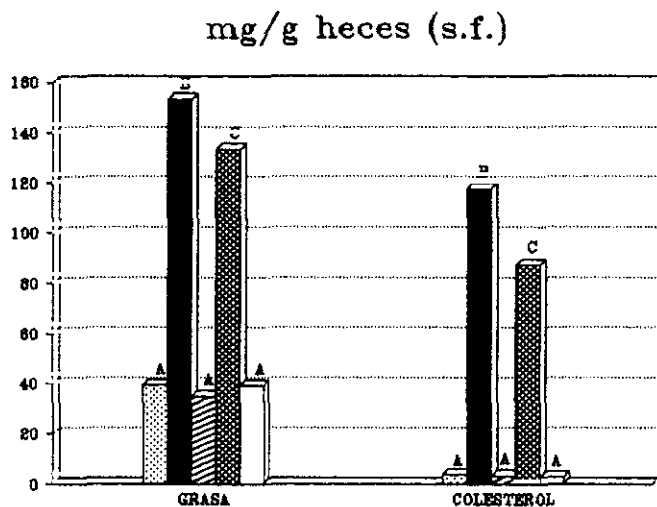
GRAFICA 34. PESO Y COMPOSICION EN HUMEDAD Y GRASA DE LAS HECES DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia B)



GRAFICA 35. EXCRECION DE ACIDOS BILIARES EN LAS HECE DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia B)



GRAFICA 36. EXCRECION DE GRASA Y COLESTEROL EN LAS HECEC DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia B)



LOTE C+O

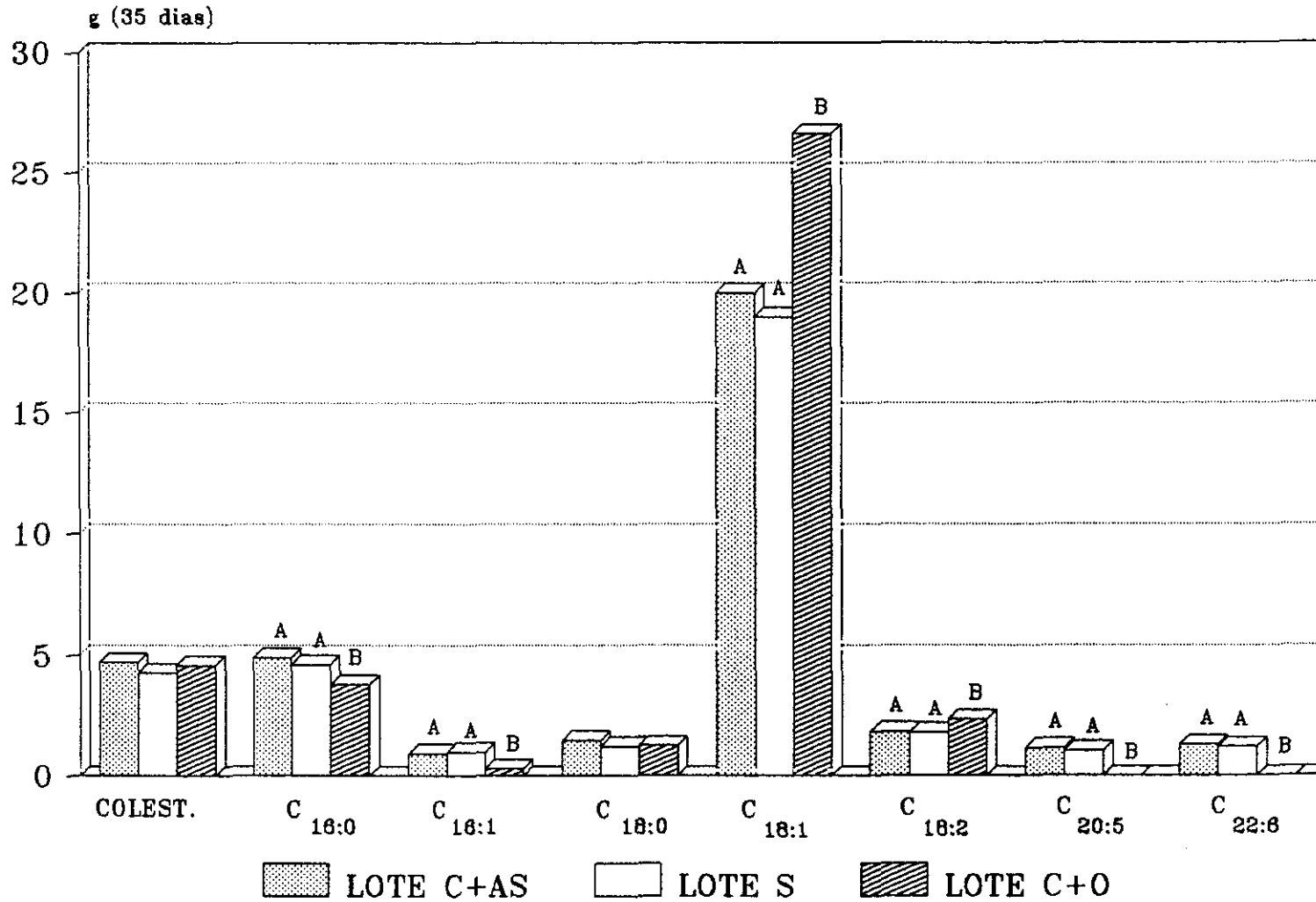
 LOTE C+O+Col.

 LOTE S

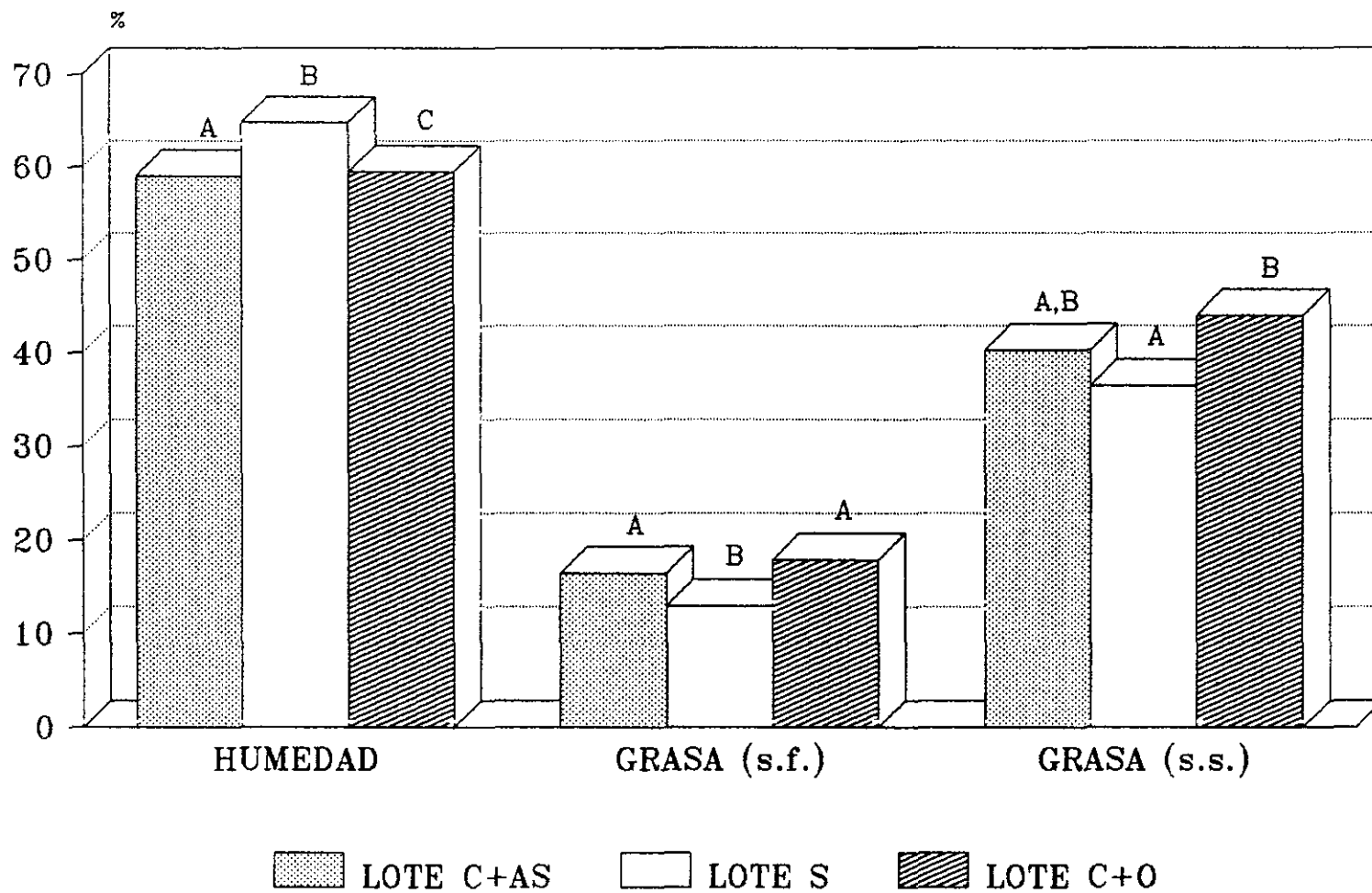
 LOTE S+Col.

 LOTE REFERENCIA

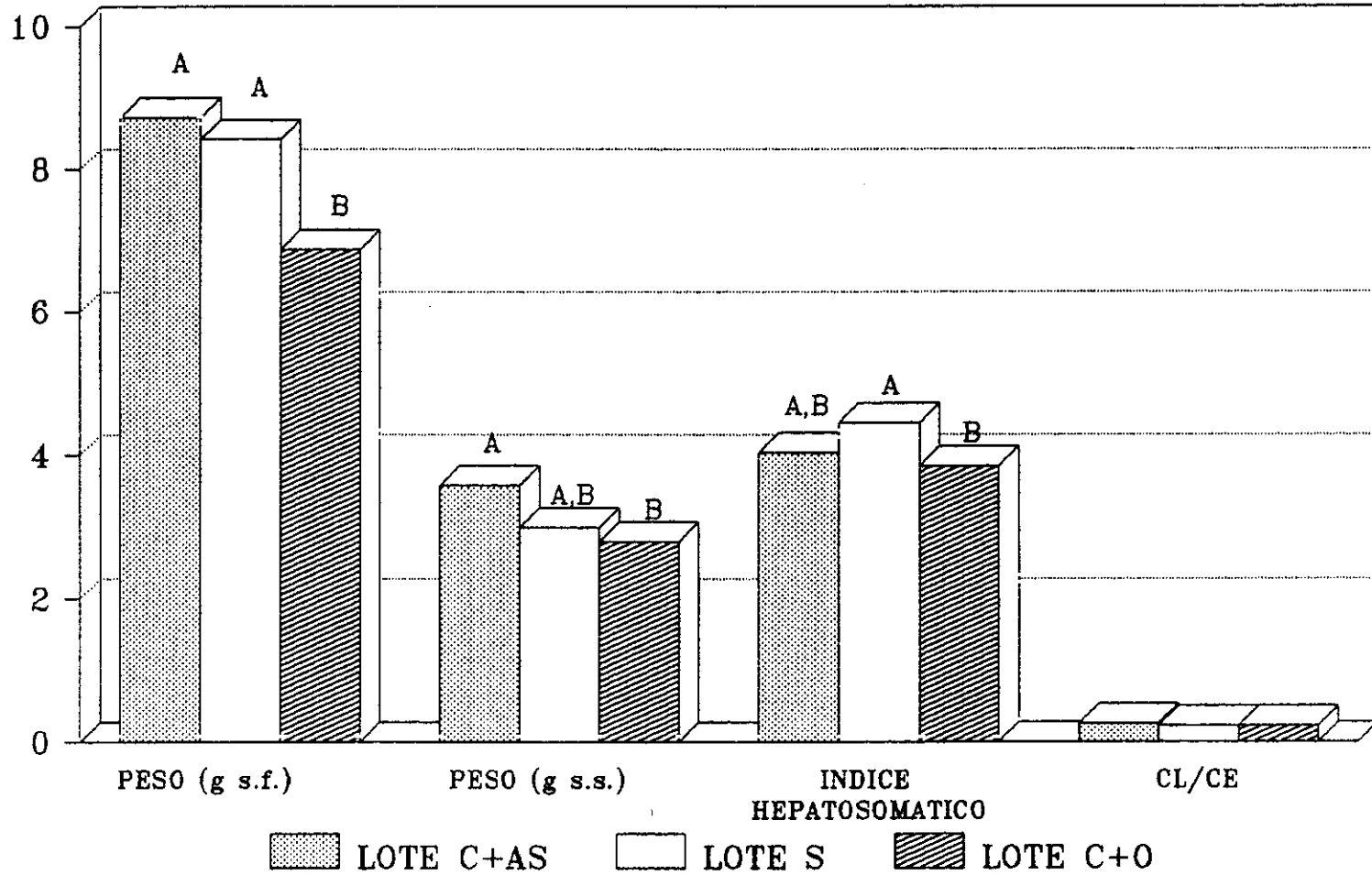
GRAFICA 37. INGESTA DE COLESTEROL Y DE LOS PRINCIPALES ACIDOS GRASOS POR LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C)



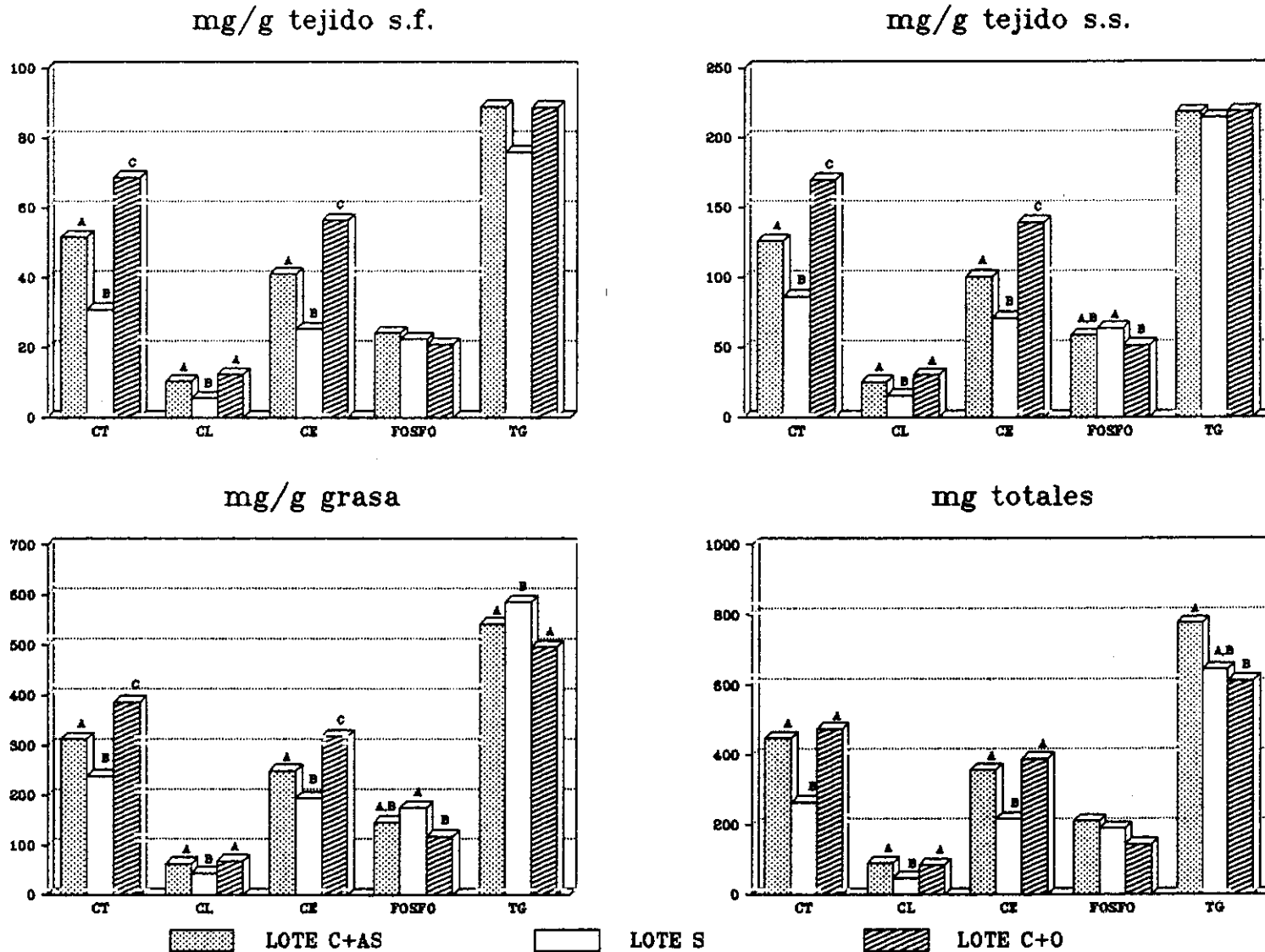
GRAFICA 38. COMPOSICION PORCENTUAL EN HUMEDAD Y GRASA EN LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C).



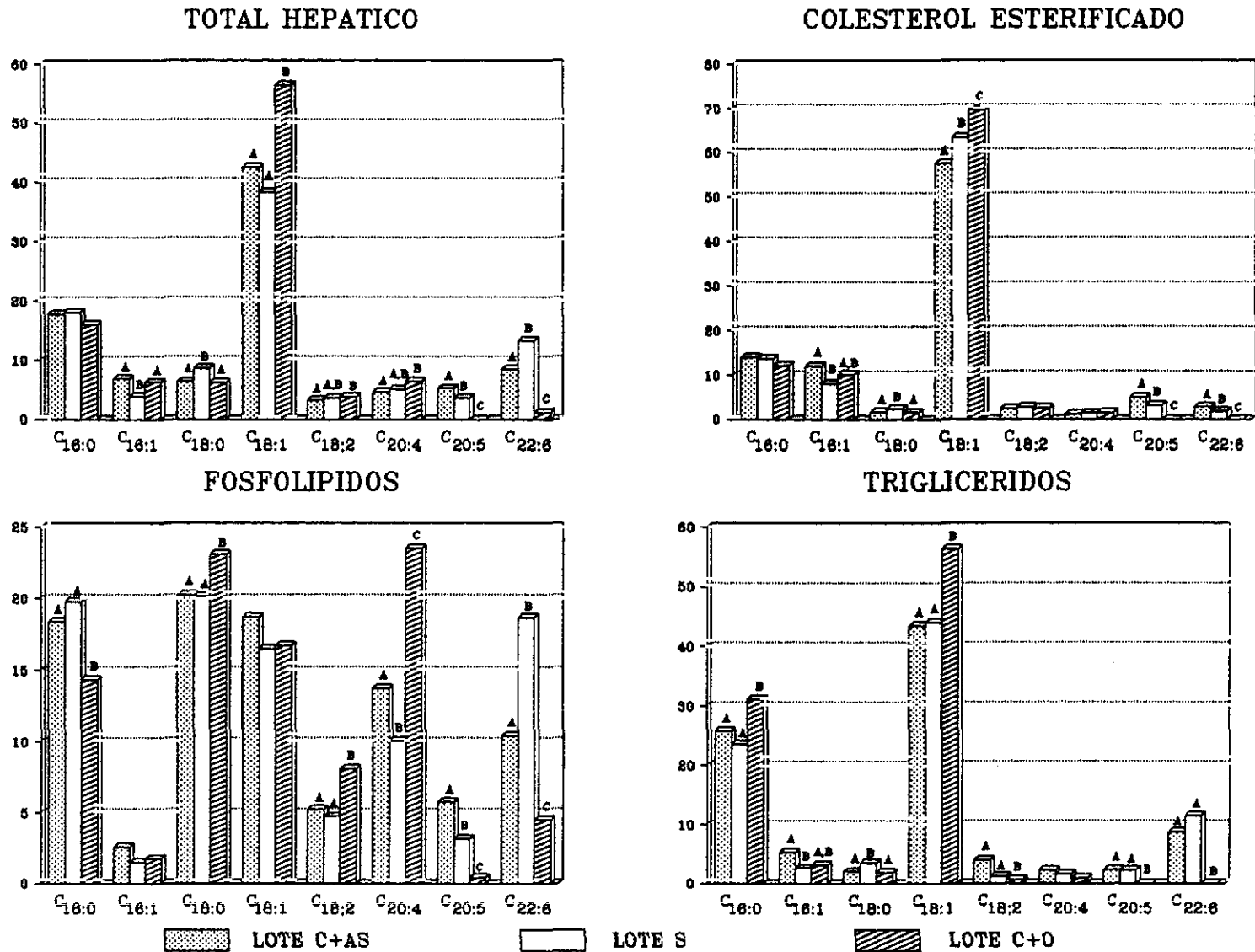
GRAFICA 39. PESO DE HIGADOS, INDICE RELATIVO HEPATOSOMATICO Y RELACION COLESTEROL LIBRE/COLESTEROL ESTERIFICADO (CL/CE) EN LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C).



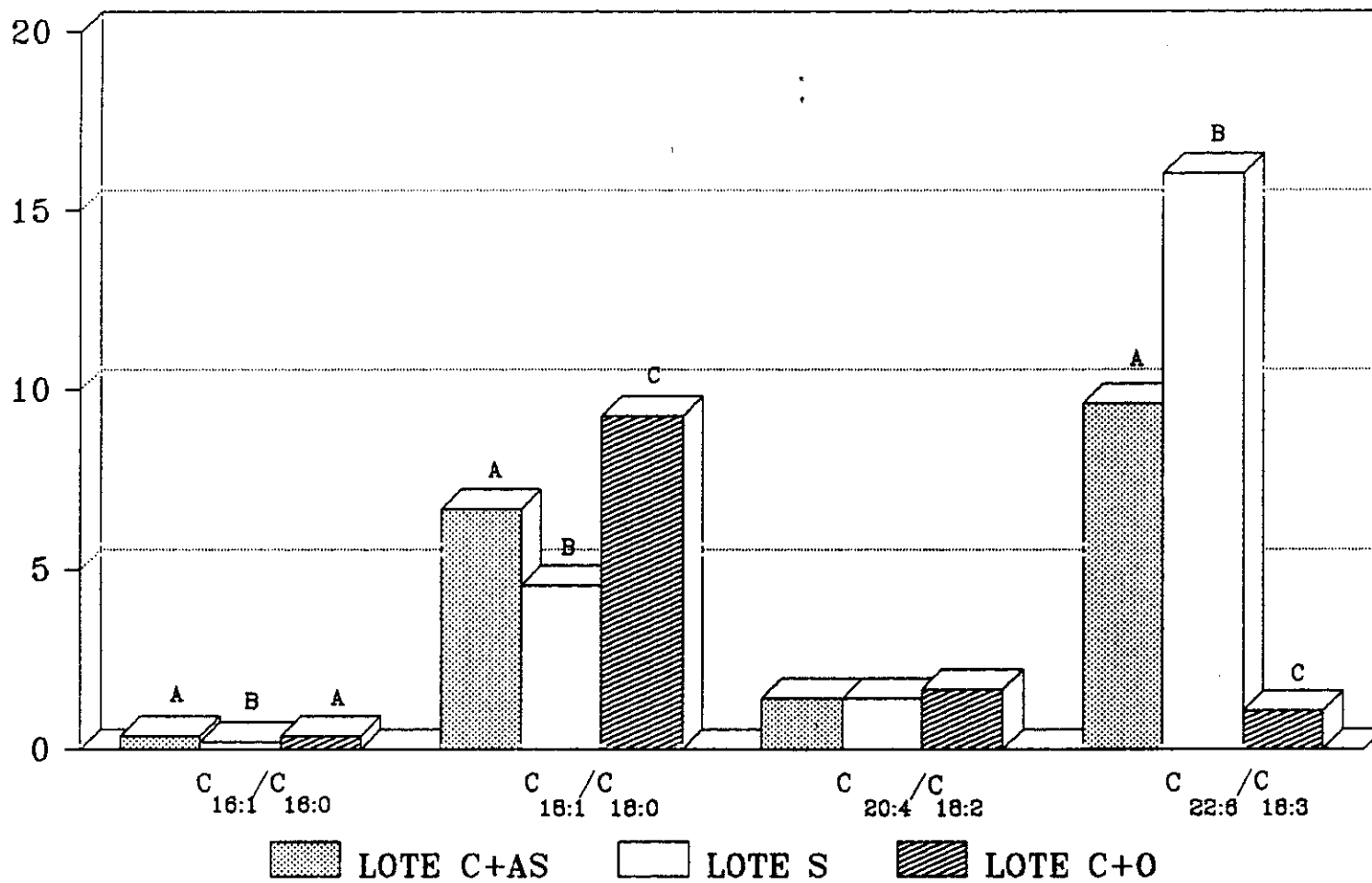
GRAFICA 40. CONCENTRACION DE COLESTEROL TOTAL (CT), LIBRE (CL) Y ESTERIFICADO (CE), FOSFOLIPIDOS (FOSFO) Y TRIGLICERIDOS (TG) EN LOS HIGADOS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C)



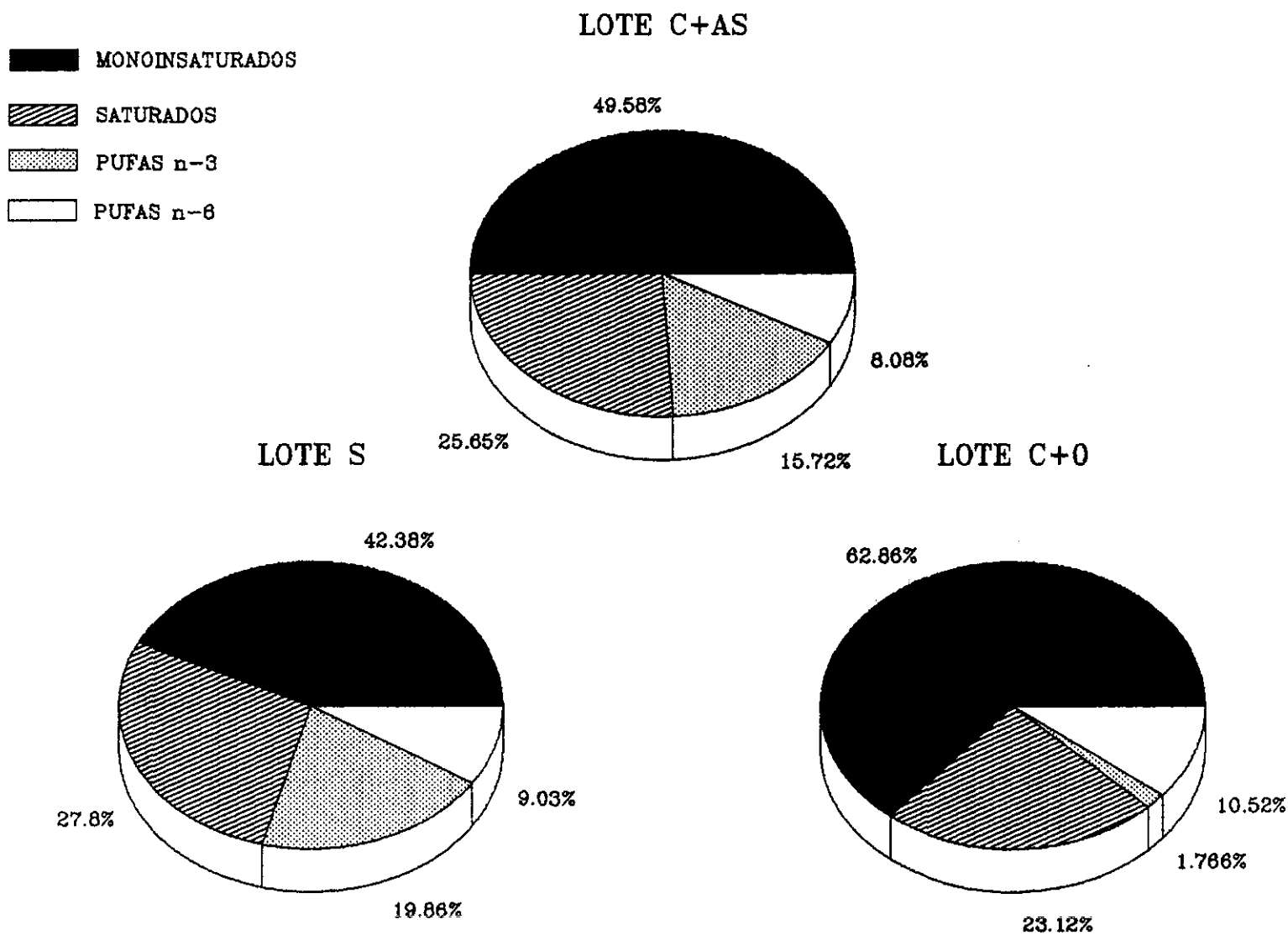
GRAFICA 41. COMPOSICION PORCENTUAL EN LOS PRINCIPALES ACIDOS GRASOS DEL TOTAL HEPATICO Y DE LAS FRACCIONES DE COLESTEROL ESTERIFICADO, TRIGLICERIDOS Y FOSFOLIPIDOS HEPATICOS. (Experiencia C)



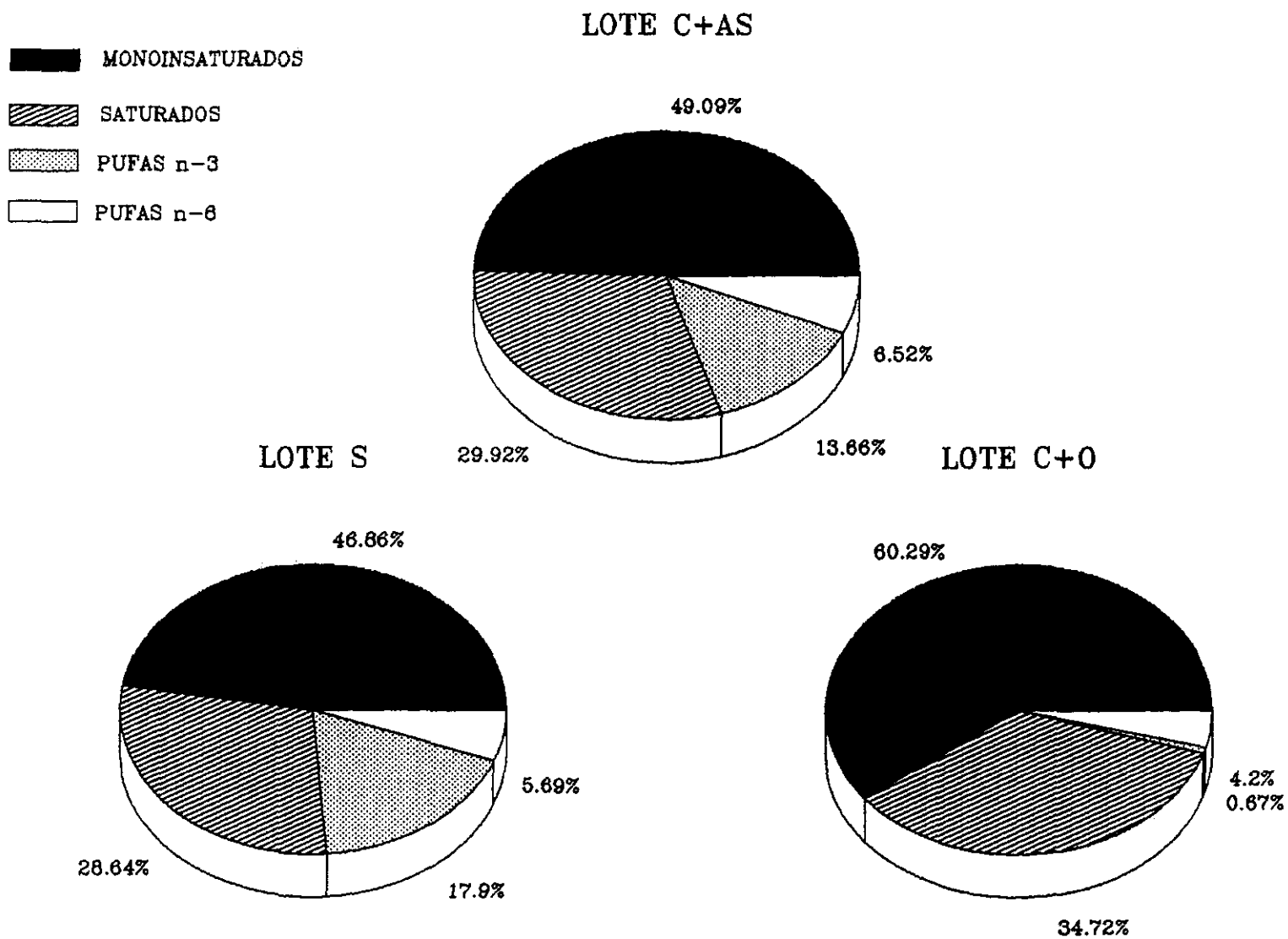
GRAFICA 42. RELACIONES ACIDOS PALMITOLEICO/PALMITICO, OLEICO/ESTEARICO, ARAQUIDONICO/LINOLEICO Y DOCOSAHEXAENOICO/LINOLENICO. (Experiencia C)



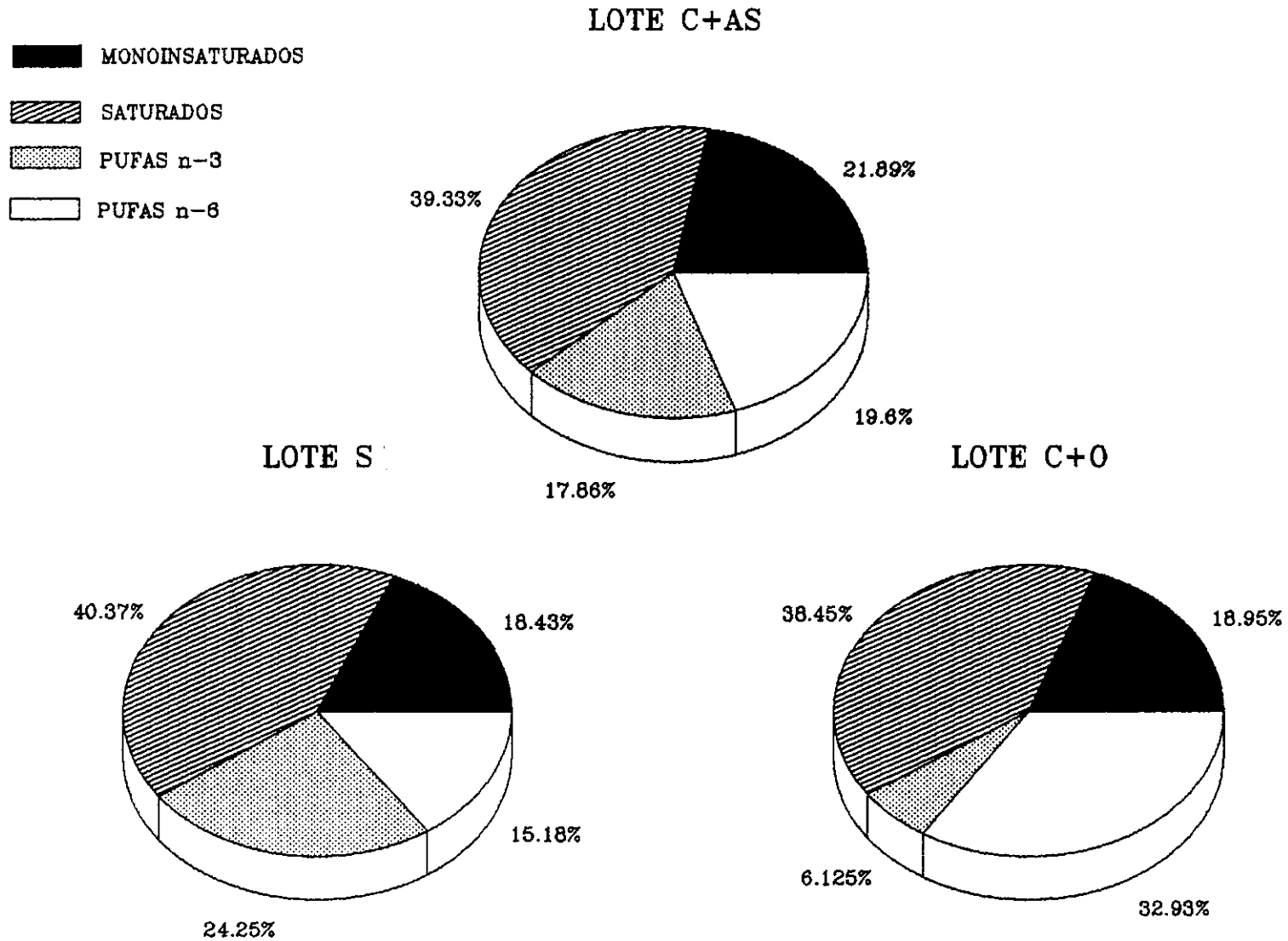
GRAFICA 43. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN EL TOTAL HEPATICO. (Experiencia C)



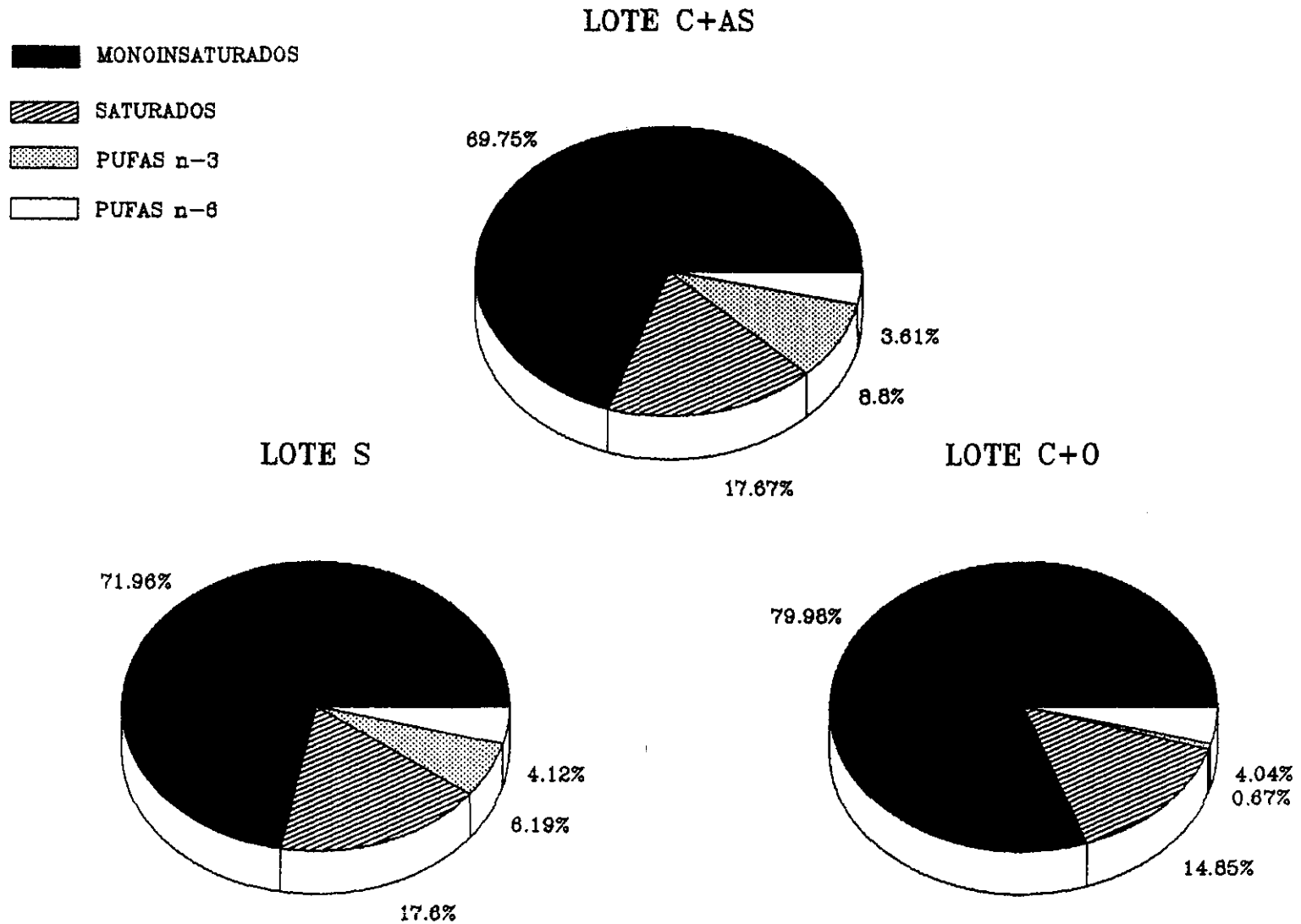
GRAFICA 44. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN LA FRACCION DE TRIGLICERIDOS HEPATICOS. (Experiencia C)



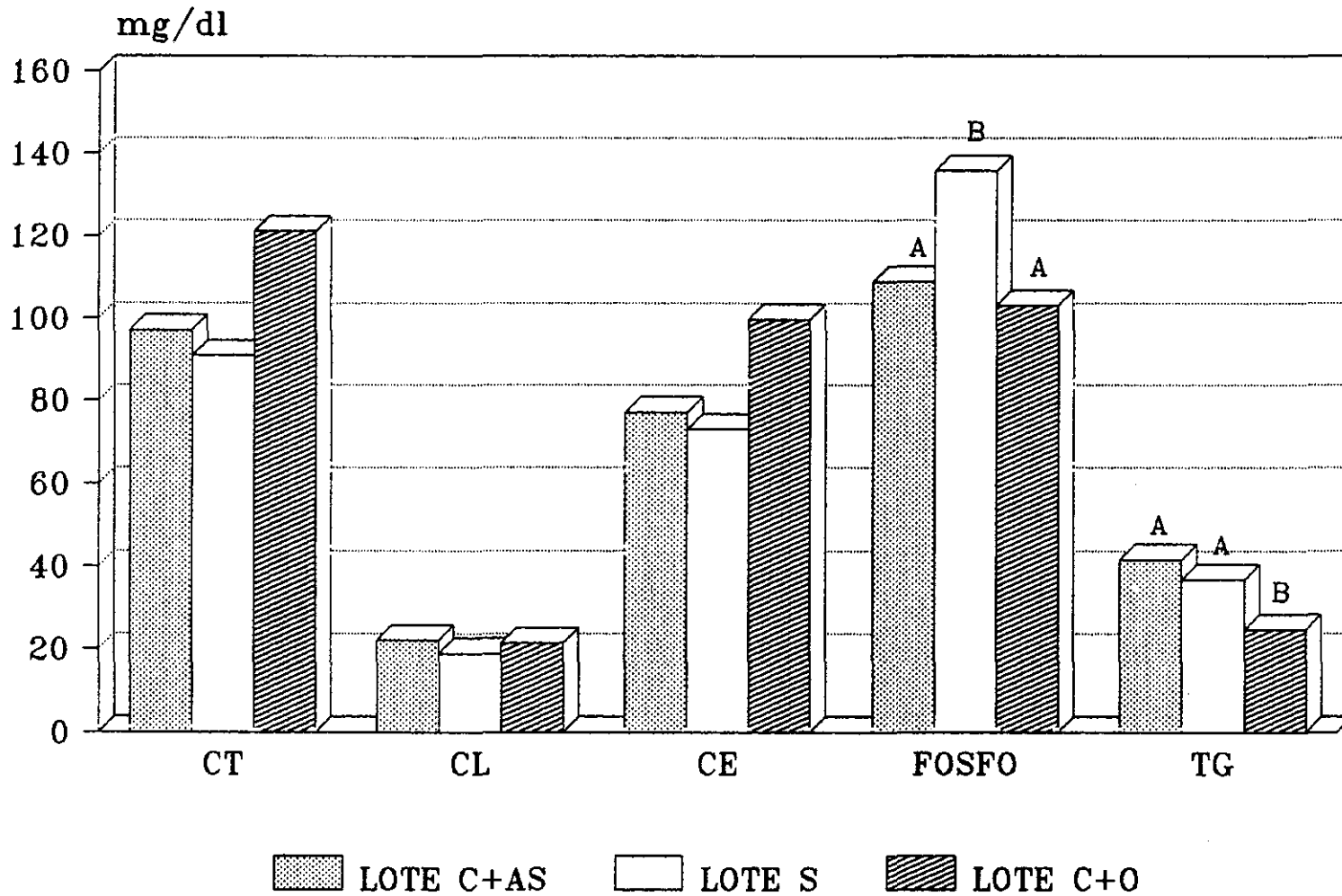
GRAFICA 45. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN LA FRACCION DE FOSFOLIPIDOS HEPATICOS. (Experiencia C)



GRAFICA 46. COMPOSICION PORCENTUAL DE LAS DIFERENTES FAMILIAS DE ACIDOS GRASOS EN LA FRACCION DE COLESTEROL ESTERIFICADO HEPATICO. (Experiencia C)

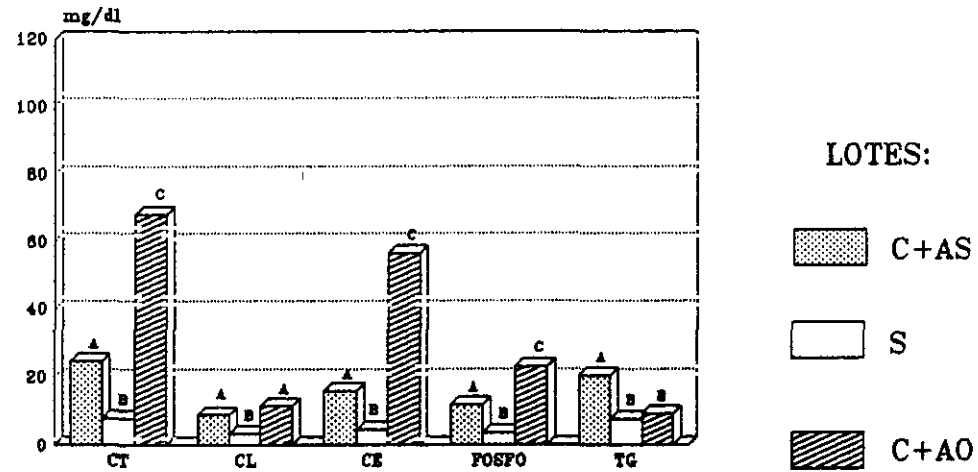


GRAFICA 47. CONCENTRACION PLASMATICA DE COLESTEROL TOTAL (CT), LIBRE (CL) Y ESTERIFICADO (CE), FOSFOLIPIDOS (FOSFO) Y TRIGLICERIDOS (TG). (Experiencia C)

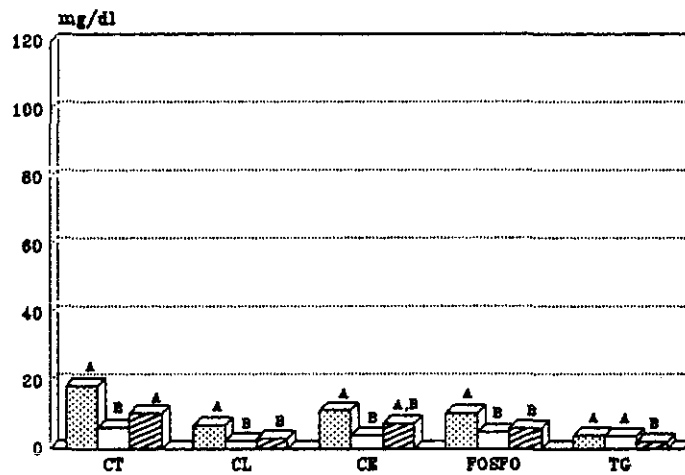


GRAFICA 48. CONCENTRACION LIPIDICA PLASMATICA (mg/dl) EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C)

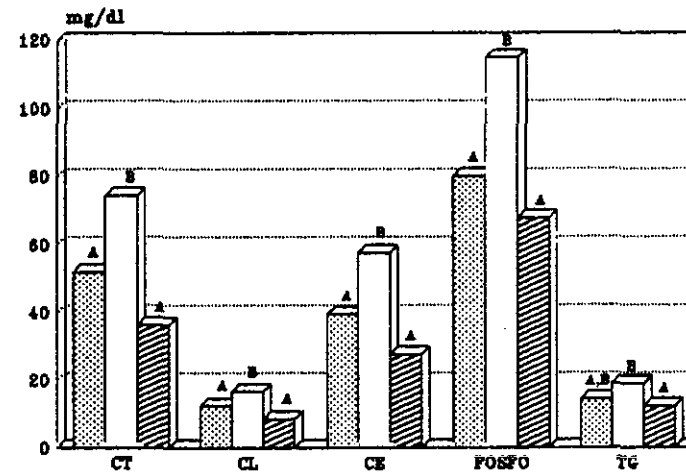
VLDL



LDL

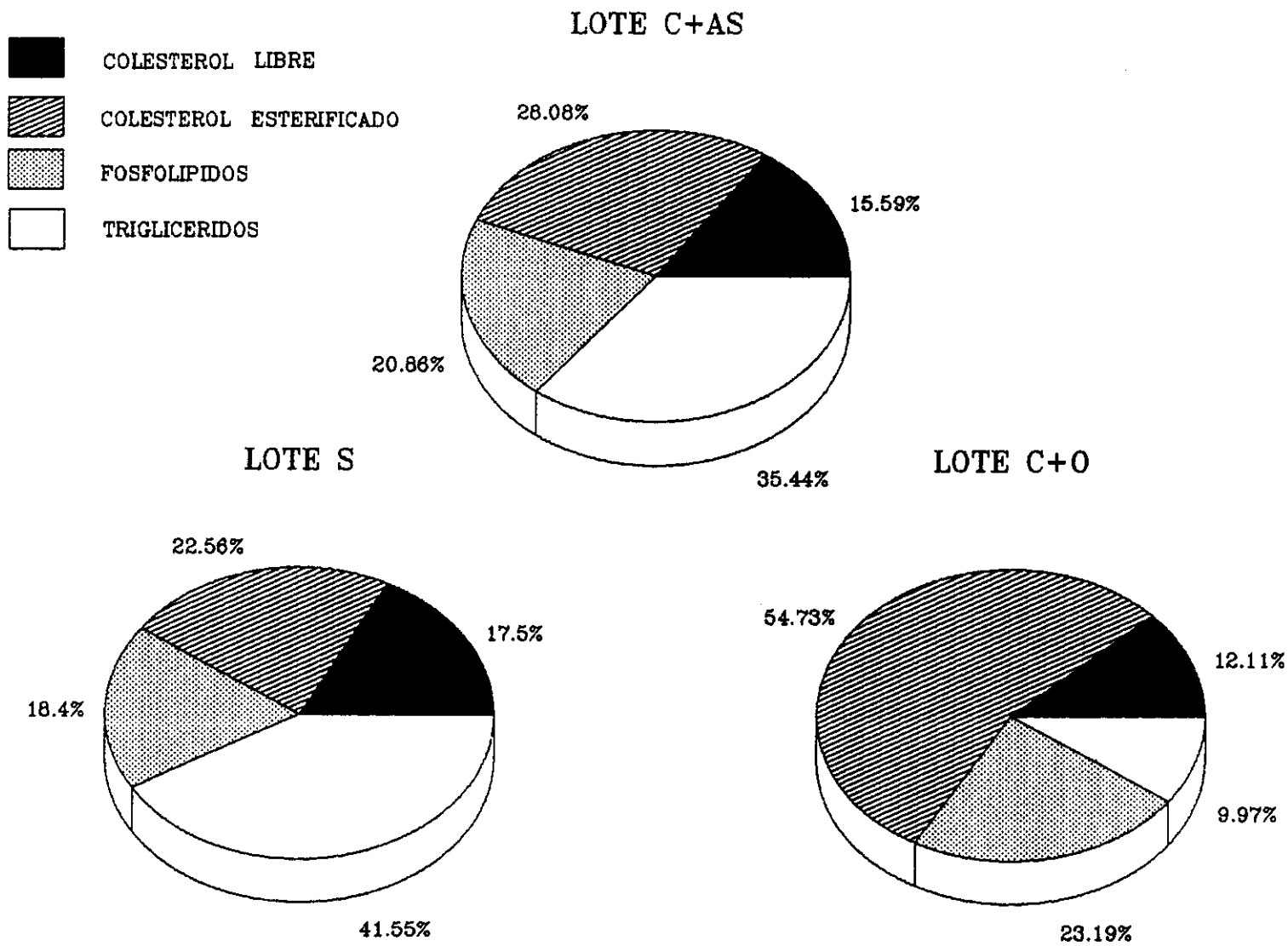


HDL

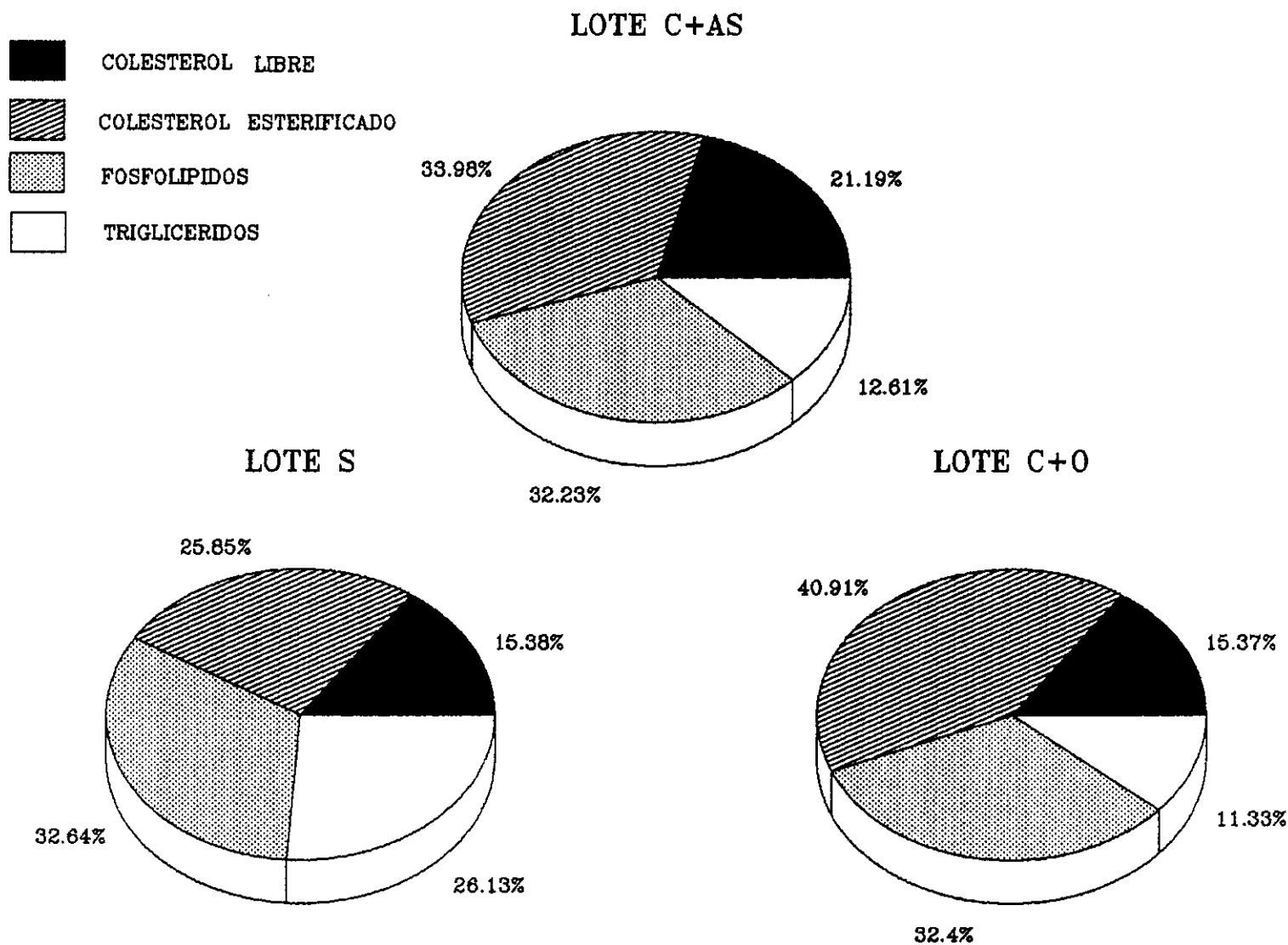


CT=Colesterol Total; CL=Colesterol Libre; CE=Colesterol Esterificado; FOSFO=Fosfolipidos; TG=Trigliceridos

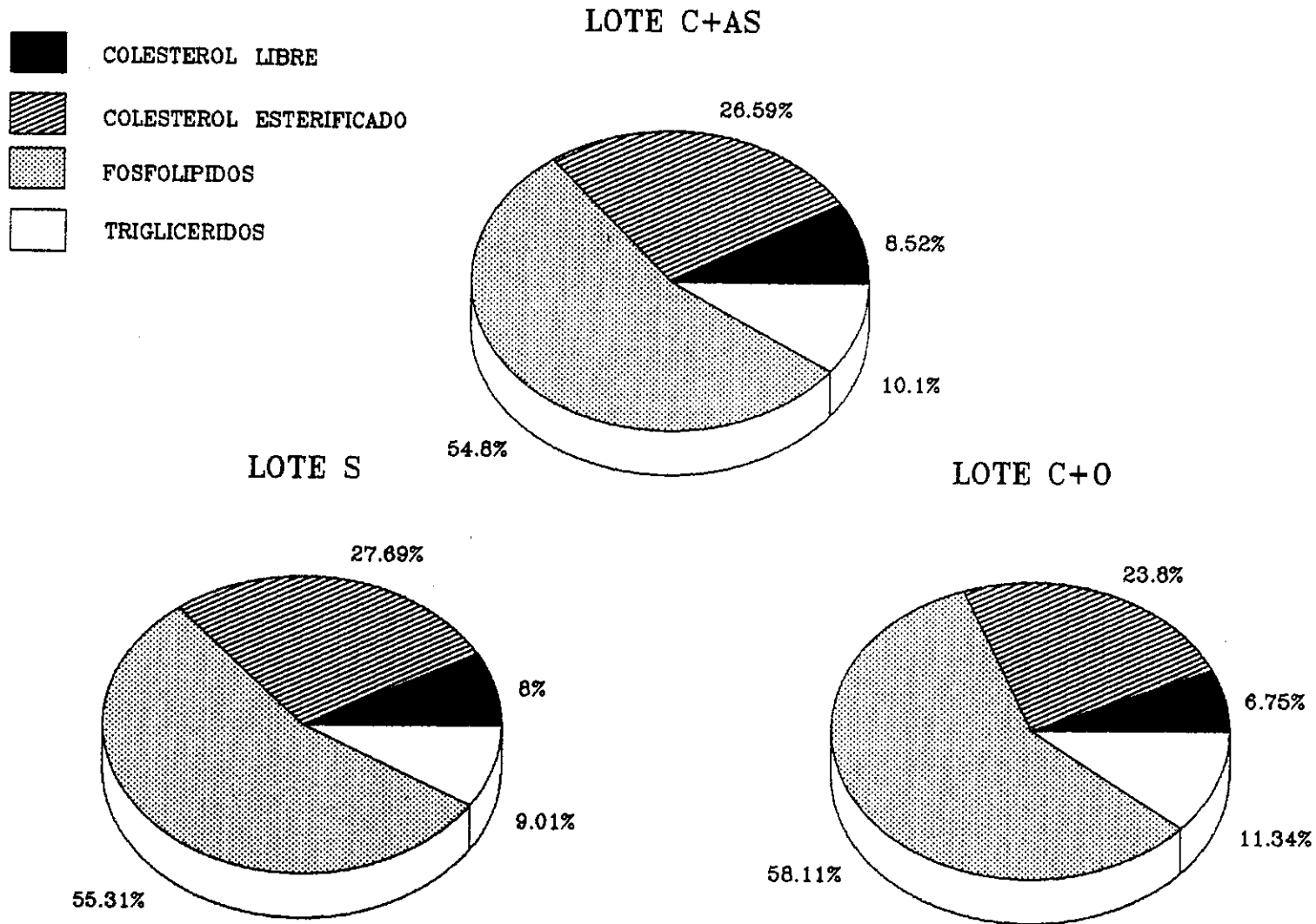
GRAFICA 49. COMPOSICION PORCENTUAL LIPIDICA DE LAS VLDL SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.(Experiencia C)



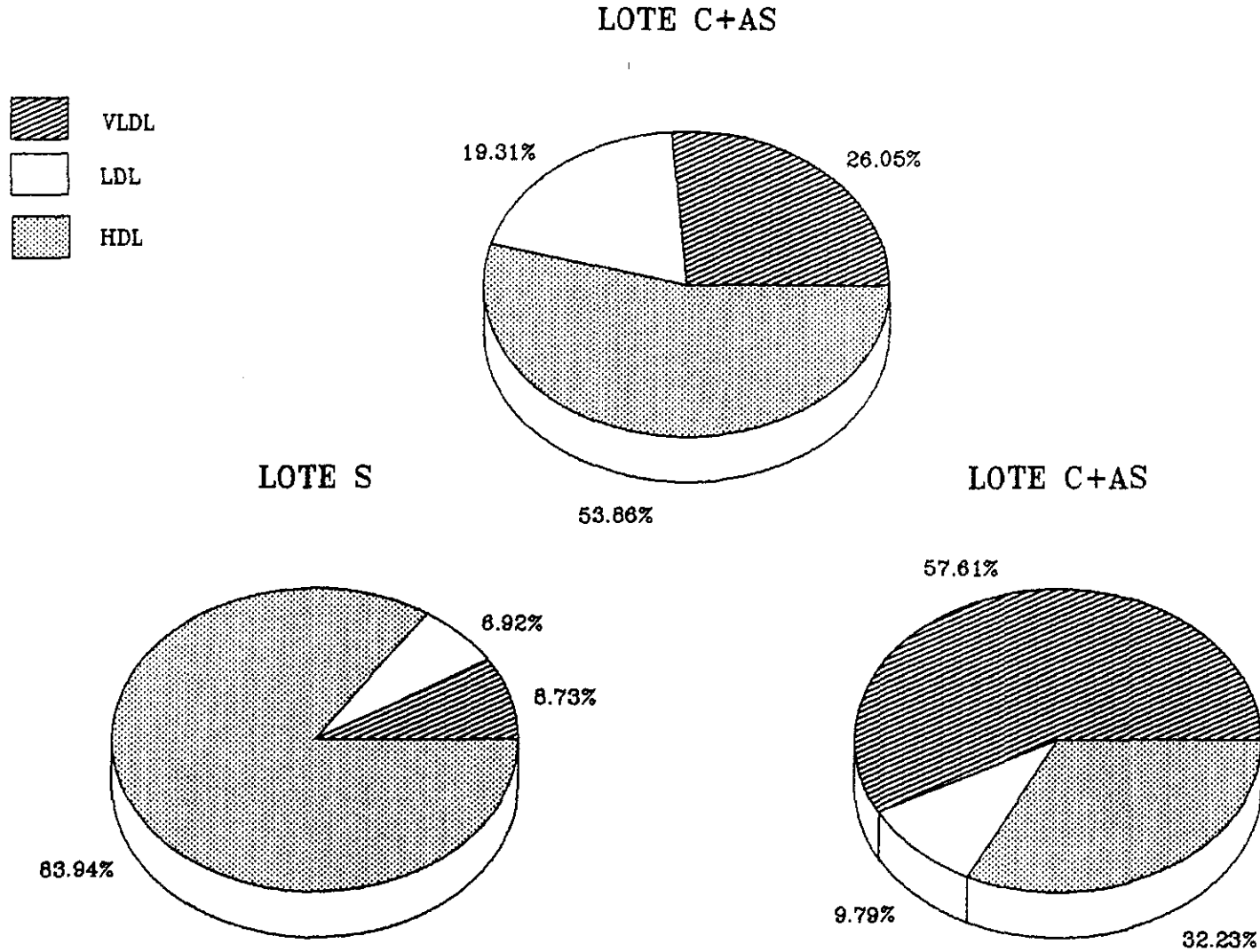
GRAFICA 50. COMPOSICION PORCENTUAL LIPIDICA DE LAS LDL SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C)



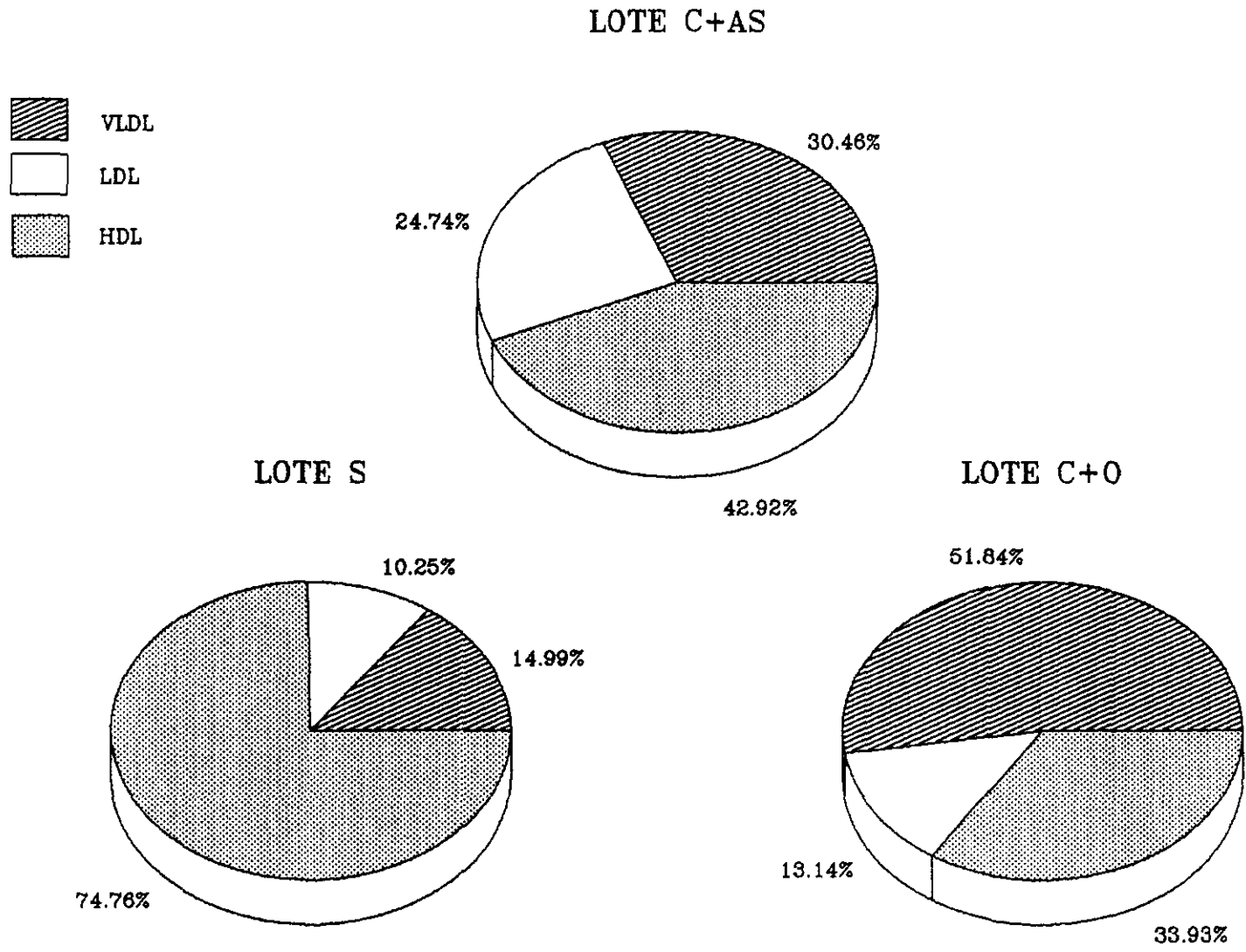
GRAFICA 51. COMPOSICION PORCENTUAL LIPIDICA DE LAS HDL SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES.(Experiencia C)



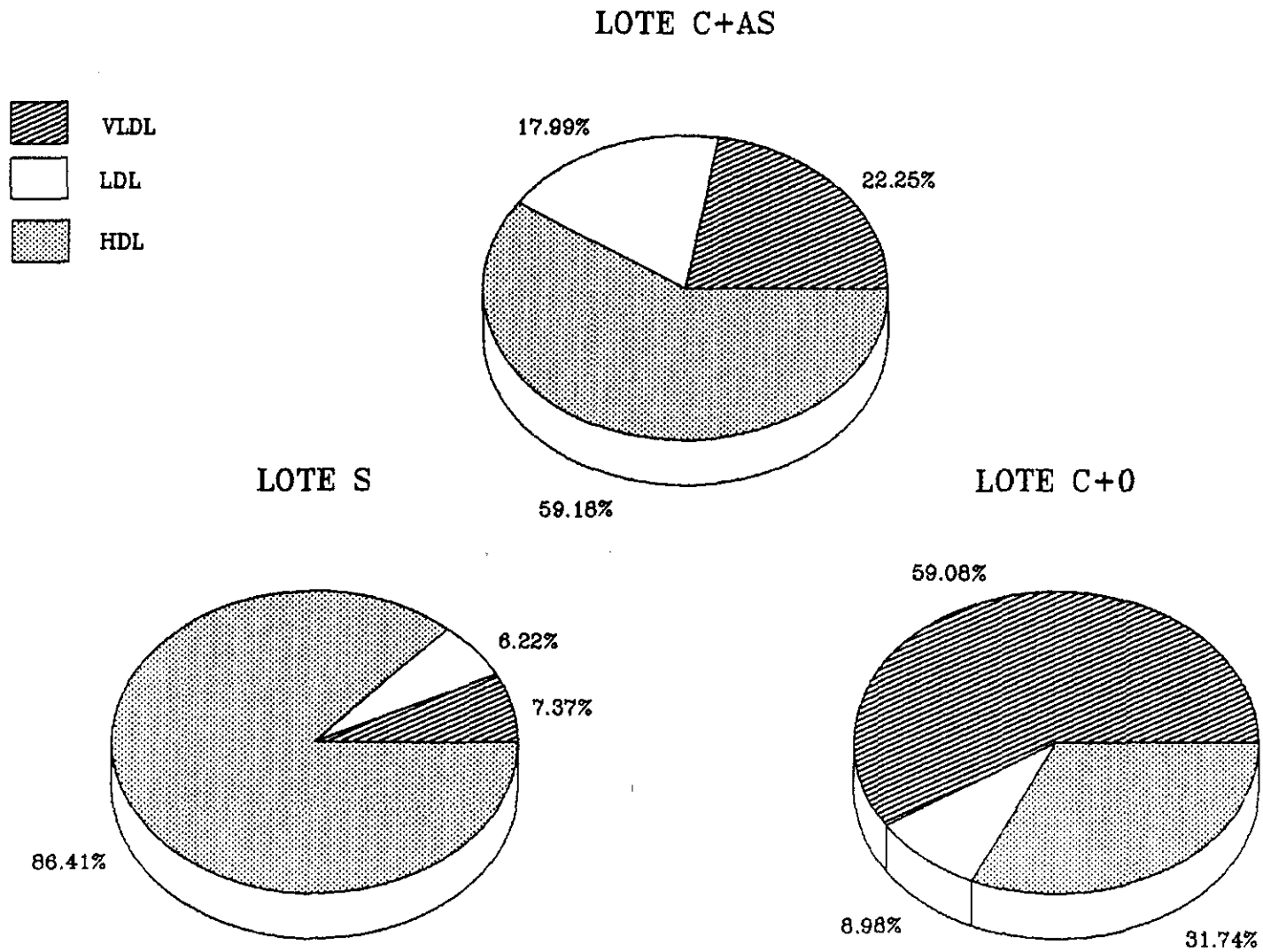
GRAFICA 52. DISTRIBUCION DEL COLESTEROL TOTAL EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C)



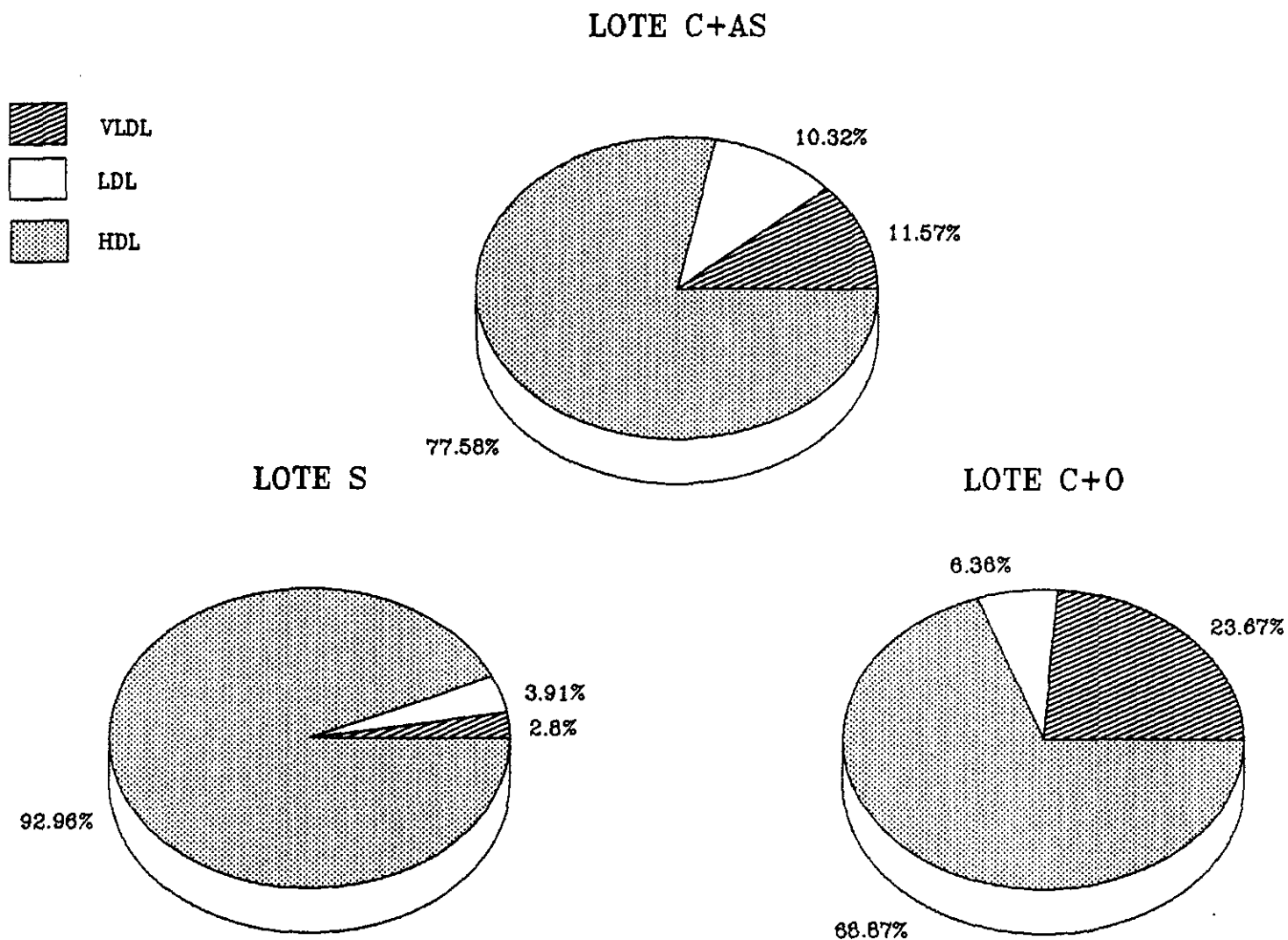
GRAFICA 53. DISTRIBUCION DEL COLESTEROL LIBRE EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C)



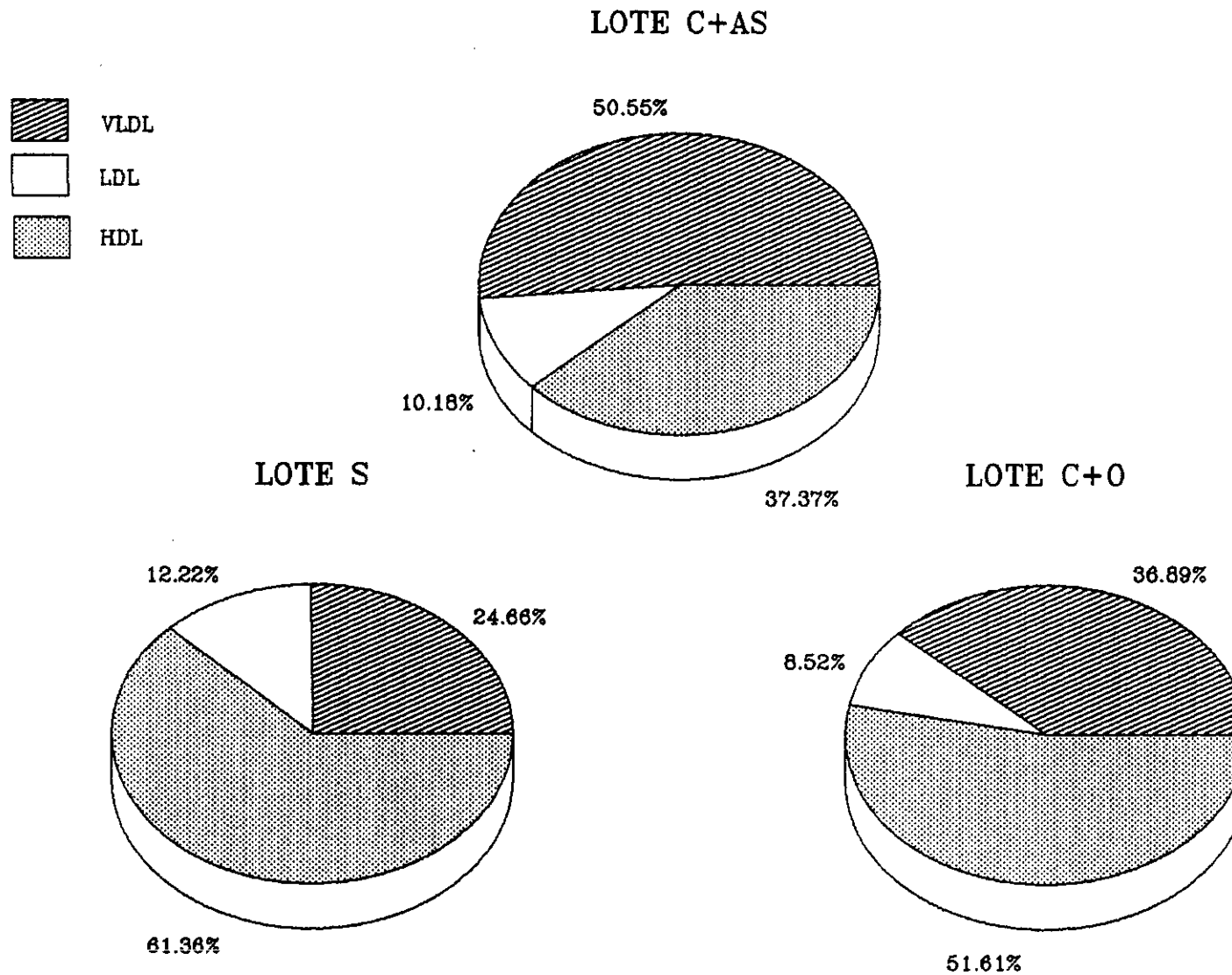
GRAFICA 54. DISTRIBUCION DEL COLESTEROL ESTERIFICADO EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C)



GRAFICA 55. DISTRIBUCION DE LOS FOSFOLIPIDOS EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C)



GRAFICA 56. DISTRIBUCION DE LOS TRIGLICERIDOS EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS SERICAS DE LOS LOTES EXPERIMENTALES. (Experiencia C)



5. DISCUSION DE RESULTADOS.

5.1. EXPERIENCIA A: "CARACTERIZACION DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA INDUCIDA POR DIETA CONTENIENDO CASEINA MAS ACEITE DE OLIVA MAS COLESTEROL. FACTORES HEPATICOS RELACIONADOS."

5.1.1. INGESTA.

En la tabla 2 y gráfica 1 se presentan las ingestas totales, de proteína, grasa y diferentes ácidos grasos de los lotes experimentales durante un período de tres semanas. No se aprecian diferencias significativas entre el consumo de dieta por el Lote C+O+Col frente al Lote C+O. Naim y col. (1977) señalaron que hay factores tales como el gusto, el olor y la textura en el alimento que podrían condicionar la ingesta del mismo, sin relación con otros factores post-ingesta que pueden influir en la cantidad de dieta consumida por la rata e incluso en la elección de la misma.

En esta experiencia la sustitución parcial de almidón por colesterol no tiene efectos significativos sobre la ingesta. Sánchez-Muniz y col. (1991b) encontraron en ratas alimentadas con una dieta equivalente a la del Lote C+O+Col una ingesta diaria de 11 g, de los que 221 mg eran de colesterol. En nuestro estudio la ingesta total es de 10,55 g/día y la de colesterol de 211 mg/día, algo menores que las comentadas del estudio de Sánchez-Muniz y col. (1991b) y atribuibles a la diferencia de peso de los animales por la menor duración del presente estudio (3 semanas frente a 4 semanas) y quizás al diferente contenido graso de las dietas.

Yoshida y col. (1990) encontraron en ratas Wistar alimentadas durante 20 días con una dieta conteniendo 15% de caseína con o sin suplemento de colesterol ingestas, alrededor de 14 g por día, algo superiores a nuestros resultados.

Dada la similitud de la composición de las dietas de los lotes C+O+Col y C+O, sólo se diferencian en el contenido de colesterol y almidón (tabla 1), la ingesta total, de proteína, de grasa y de los diferentes tipos de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados n-3) es equivalente. Sólo se encuentran diferencias, lógicamente, en la ingesta de colesterol y almidón (gráfica 1).

5.1.2. CRECIMIENTO.

Los datos de crecimiento en términos de incremento de peso corporal aparecen en la tabla 3 donde se detalla la modificación ponderal durante un período de 3 semanas. No se encontraron diferencias significativas entre los lotes estudiados.

El incremento de peso, del orden de 4,5 g/día, es ligeramente más elevado que el encontrado previamente por Sánchez-Muniz y col. (1991b).

Estos resultados son similares a los descritos por Yoshida

y col. (1990) donde la ganancia de peso corporal medio fue del orden de 4 g/día tanto para el lote de caseína como para el lote que consumió dieta con un suplemento de 1% de colesterol y 0,25% de ácido cólico.

La eficacia nutritiva de las dietas es valorada en términos de C.E.A y P.E.R (tabla 3). Ambos tratamientos dietarios presentan similares valores de C.E.A y P.E.R como fácilmente se deduce de ingestas e incrementos de peso no diferentes significativamente.

Sánchez-Muniz y col. (1991b) encontraron un C.E.A de 0,4 en un lote de ratas Wistar alimentado con caseína, aceite de oliva y colesterol. En este estudio los resultados son de $0,42 \pm 0,01$ para el Lote C+O+Col y de $0,43 \pm 0,01$ para el Lote C+O.

5.1.3. PESO DE HIGADO. COMPOSICION PORCENTUAL E INDICE RELATIVO HEPATOSOMATICO.

En la tabla 4 y gráficas 2 y 3 se presentan los pesos de los hígados, el índice relativo hepatosomático y la composición porcentual hepática en humedad y grasa de los Lotes C+O y C+O+Col a los 21 días. Estos datos se comparan con los de un lote basal alimentado con dieta estándar compuesto por ratas de 65 g de peso.

El incremento ponderal hepático encontrado en el Lote C+O responde paralelamente al incremento de peso de los animales, como lo sugiere el índice hepatosomático que se mantiene a los 21 días ($3,19 \pm 0,12$ vs $3,18 \pm 0,06$).

Sin embargo, en el Lote C+O+Col el peso hepático se incrementa con un ritmo mayor que el incremento de peso corporal, lo que origina un aumento del índice hepatosomático ($4,54 \pm 0,14$ vs $3,19 \pm 0,12$).

El contenido de humedad del Lote C+O no se modifica durante la experiencia. Sin embargo, en el Lote C+O+Col se produce una pérdida del contenido de agua.

El contenido en grasa se incrementa en el Lote C+O+Col siendo mucho menos marcado este aumento en el Lote C+O.

En todos los casos, tanto el peso del hígado como el índice relativo hepatosomático, contenido en grasa y humedad y el aspecto morfoestructural de los órganos de los animales que ingieren la dieta suplementada en colesterol (Lote C+O+Col) indican la existencia de hepatomegalia y esteatosis, situación no observada en el Lote C+O. Estos datos coinciden con los de Dolphin (1981) en ratas macho de la raza Long-Evans alimentadas con dietas trombogénicas conteniendo colesterol, y los de Cava (1986) y Sánchez-Muniz y col. (1991b) en ratas Wistar en condiciones similares a las del presente trabajo.

La hepatomegalia y esteatosis hepática parecen deberse a la

ingesta de colesterol y bilis de buey. Bochenek y Rodgers (1978) encuentran un peso hepático mayor en ratas alimentadas con dietas suplementadas con 1% de colesterol que en basales sin dicho suplemento.

5.1.4. COMPONENTES GRASOS DEL HIGADO.

Como hemos comentado en el apartado anterior, el contenido graso hepático tanto en sustancia fresca como en sustancia seca se incrementa de forma diferente en los 2 lotes experimentales.

El análisis de los componentes lipídicos: colesterol libre, total y esterificado, fosfolípidos y triglicéridos (tabla 5 y gráfica 4) concuerda con lo encontrado por otros autores cuando utilizan dietas con bajo y alto nivel de colesterol (Bochenek y Rodgers, 1978; Eklund y Sjöblom, 1986; Yoshida y col., 1990).

El contenido hepático de colesterol total es muy superior en las ratas alimentadas con dietas conteniendo C+O+Col como consecuencia del incremento del tamaño hepático y del acúmulo graso.

Así, el contenido de colesterol total en mg/g sobre sustancia seca es 13 veces superior en el Lote C+O+Col respecto al C+O ($153,89 \pm 14,74$ vs $11,83 \pm 0,98$).

Este mayor contenido de colesterol total hepático se debe, sobre todo, a un incremento del colesterol esterificado. Así, los valores en mg/g (s.f.) de colesterol libre son para el Lote C+O+Col unas 5 veces superior a las del Lote C+O, mientras que los de colesterol esterificado son unas 60 veces más elevados en el Lote C+O+Col. Esto origina que el cociente colesterol libre/colesterol esterificado en este órgano baje en los lotes que ingieren la dieta suplementada con colesterol ($0,24 \pm 0,02$ vs $4,59 \pm 1,02$).

Bochenek y Rodgers (1978) y Sirtori y col. (1984) también encontraron resultados similares a los de este estudio al aumentar la ingesta de colesterol.

Los valores de triglicéridos hepáticos también son más elevados en el Lote C+O+Col. En cambio, para los fosfolípidos, aunque se observa la misma tendencia, las diferencias no son tan marcadas.

Garg y col. (1988a) encontraron un incremento del colesterol total en microsomas hepáticos de ratas alimentadas con dietas con diferentes fuentes grasas y suplementadas con colesterol frente a esas mismas dietas sin suplemento de colesterol. En cambio, los niveles de fosfolípidos no se ven alterados.

Numerosos autores: Quazi y col. (1983), Lefevre y Scheneman (1984), Vahouny y col. (1985), Eklund y Sjöblom (1986) y Yoshida y col. (1990), en concordancia con los resultados encontrados en

esta memoria describieron en ratas alimentadas con dietas suplementadas con colesterol un incremento de los lípidos totales, colesterol total, colesterol esterificado y triglicéridos en el hígado.

Los resultados obtenidos en el hígado con respecto a las concentraciones de colesterol esterificado, triglicéridos y fosfolípidos parecen sugerir un proceso equivalente al producido en otras células corporales que resumimos a continuación: la llegada masiva de colesterol al hígado debe bloquear la síntesis endógena de colesterol por inhibición de la HMG-CoA reductasa y estimular la producción de ésteres de colesterol por el enzima microsomal ACAT, principalmente en forma de colesterol oleato.

En los microsomas también se encuentra la Acíl-Coa sintetasa, enzima necesaria para la síntesis de intermediarios Acíl-CoA, que son utilizados para la biosíntesis de triglicéridos (vía α -glicerol fosfato) y ésteres de colesterol (vía ACAT). Ambas vías, sobre todo la de los ésteres de colesterol, podrían estar estimuladas por la llegada masiva de colesterol. Cuando las células hepáticas están expuestas a un exceso de lípidos, los intermediarios Acíl-CoA deben dirigirse a formar lípidos neutros (triglicéridos) por al Acíl-CoA sintetasa, produciéndose, según la hipótesis propuesta por Cornwell y col. (1981) una deficiencia intracelular de ácidos grasos esenciales, cuando las células tienen exceso de colesterol. El acúmulo de ésteres de colesterol producido por baja utilización, como se discutirá más adelante, debido a una posible deficiencia en el enzima colesterol-ester hidrolasa disminuiría el "pool" utilizable de ácidos grasos poliinsaturados contribuyendo, probablemente, a una menor producción de fosfolípidos respecto a la de ésteres de colesterol y triglicéridos.

5.1.5.COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS TOTALES HEPATICOS.

En la tabla 6 y gráficas 5 y 7 aparece la composición de los principales ácidos grasos hepáticos en ambos lotes y también de un lote basal alimentado con dieta estándar de laboratorio integrado por ratas de aproximadamente 65 g de peso.

Como se puede apreciar la introducción de un suplemento de colesterol en la dieta supone un cambio en la composición hepática de ácidos grasos. Las principales modificaciones ocurren en los siguientes ácidos grasos : palmitoleico, esteárico, araquidónico y eicosapentaenoico (EPA). De esta manera las ratas que ingieren las dietas suplementadas con colesterol presentan más ácidos grasos monoinsaturados, palmitoleico y oleico, principalmente; mientras que el resto de los ácidos grasos: saturados, PUFAS n-3 y, sobre todo, PUFAS n-6 son más abundantes en los hígados de las ratas que no reciben colesterol añadido en sus dietas. Hay que destacar la gran disminución del ácido araquidónico que se produce en el Lote C+O+Col ($5,13 \pm 0,43$ vs $23,53 \pm 0,43$) e indicar que el ácido linoleico se incrementa en el Lote C+O+Col, aunque el porcentaje total de PUFAS n-3 es menor en este lote.

El incremento de los niveles de ácido oleico parece deberse al acúmulo de colesterol esterificado que ocurre en los hígados de los animales del Lote C+O+Col y a la preferencia del enzima ACAT por el ácido oleico (Goodman y col., 1964; Spector y col., 1979; Erickson y Cooper, 1980; Erickson y col., 1980). Como es sabido este enzima es el encargado de esterificar en el hígado el colesterol, principalmente con ácido oleico. Por lo tanto, ante una mayor presencia de este lípido, los hepatocitos responden incrementando la esterificación del colesterol por el enzima ACAT y provocando un incremento proporcional del ácido oleico de la fracción de colesterol esterificado (ver apartado 5.1.6.).

La disminución de los niveles de araquidónico y otros ácidos poliinsaturados de larga cadena que ocurre en el Lote C+O+Col es comentada también por otros autores, así Morin y col. (1962), citado por Huang y col. (1986), señalaron una disminución de estos ácidos grasos en el hígado, consecuente a un exceso en la ingesta de colesterol.

Otros autores indicaron un posible bloqueo de la síntesis del ácido araquidónico. Huang y col. (1986) observaron con la ingesta de colesterol, acumulación de ácido linoleico y reducción de araquidónico. En nuestro caso, no encontramos la acumulación del ácido linoleico dado el gran enriquecimiento en ácido oleico, pero si estudiamos la relación $C_{20:4} / C_{18:2}$ (tabla 6, gráfica 6) como medida del proceso de desaturación del ácido linoleico, observamos que el Lote C+O+Col presenta unos valores menores que el Lote C+O ($1,39 \pm 0,08$ vs $3,66 \pm 0,13$). Estos datos parecen indicar que la alimentación con dietas conteniendo colesterol inhiben la desaturación de los ácidos grasos poliinsaturados n-6, situación ya enunciada por Bochenek y Rodgers (1978), Huang y col. (1986), Garg y col. (1986), Huang y col. (1987), Huang y Horrobin (1987) y Sugano y col. (1988).

En cuanto a los ácidos grasos de la familia n-3, observamos un mayor acúmulo de ácido linolénico y menor cantidad de DHA en el Lote C+O+Col. Estos datos parecen indicar una inhibición de la desaturación del ácido linolénico. La relación $C_{22:6} / C_{18:3}$ (tabla 6, gráfica 6) como una medida de esta desaturación presenta en el lote que ingiere dietas suplementadas con colesterol los valores más bajos ($1,28 \pm 0,30$ vs $12,06 \pm 0,06$).

En conclusión, los datos comentados parecen indicar que el hígado ante la masiva llegada de colesterol, responde esterificando el mismo. Por esta razón, todo el sistema enzimático hepático relacionado con los ácidos grasos, intentaría proveer principalmente ácido oleico al enzima encargada de esta esterificación de los ácidos grasos: ACAT, inhibiéndose los procesos de desaturación de las familias n-3 y n-6.

Pensamos además, que puede existir una activación de la Delta-9-desaturasa, incrementándose los niveles de ácidos grasos monoinsaturados, sobre todo de ácido oleico, y disminuyendo, por tanto, los del ácido esteárico. Por esta razón, el cociente $C_{18:1} / C_{18:0}$ (tabla 6, gráfica 6) es unas 12 veces más elevado en el

Lote C+O+Col.

5.1.6.COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE TRIGLICERIDOS, FOSFOLIPIDOS Y COLESTEROL ESTERIFICADO HEPATICOS.

En las tablas 7, 8 y 9 y gráficas 5, 8, 9 y 10 se muestran la composición de las distintas fracciones lipídicas hepáticas de los lotes C+O y C+O+Col, así como los de un lote basal alimentado con dieta estándar al comienzo de la experiencia.

El diferente perfil de ácidos grasos encontrado en las fracciones de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol esterificado se explicaría por la incorporación preferente de algunos ácidos grasos hacia fosfolípidos y colesterol esterificado.

Así es conocido que normalmente los fosfolípidos contienen más cantidades de ácido araquidónico o de EPA y DHA (Durand y col., 1985; Huang y col., 1986; Garg y col., 1988a; Bernadier, 1988), mientras que debido a la preferencia del enzima ACAT por el ácido oleico. Ya comentada en el apartado anterior, los ésteres de colesterol son especialmente ricos en este ácido.

En nuestro estudio, en la fracción de fosfolípidos en el Lote C+O los ácidos grasos mayoritarios son: araquidónico, esteárico y palmítico; mientras que en el Lote C+O+Col. el ácido graso que aparece en mayor cantidad es el oleico, seguido muy de cerca por araquidónico y esteárico. La cantidad de DHA cae en este último lote aproximadamente un 39% respecto al Lote C+O.

Respecto a la fracción de colesterol esterificado en ambos lotes el ácido graso más abundante es el oleico, seguido de palmítico. Es importante reseñar el incremento relativo de un 99,1% de ácido palmítoleico y una disminución de 14 veces de ácido araquidónico en el Lote C+O+Col respecto al Lote C+O.

Por su parte, en la fracción de triglicéridos más de las 3/4 partes están constituidas por los ácidos oleico y palmítico en ambos lotes, debiendo resaltarse la desaparición del ácido araquidónico en el Lote C+O+Col.

Teniendo en cuenta los porcentajes de los diferentes ácidos grasos en el total hepático y en las diferentes fracciones consideradas: triglicéridos, fosfolípidos y colesterol esterificado, pensamos que en los 2 lotes el ácido oleico, aunque mayoritario en las 3 fracciones, se incorpora preferentemente a los triglicéridos y los ésteres de colesterol, el ácido palmítico a triglicéridos y el ácido palmitoleico a la fracción de colesterol esterificado, mientras que a fosfolípidos se incorporan mayoritariamente ácido araquidónico (principalmente en el Lote C+O), esteárico, linoleico y DHA.

Las diferencias encontradas entre ambos lotes se explicarían por la ingesta de colesterol. Así, la esterificación de colesterol en el Lote C+O+Col exigiría una incorporación preferente del ácido oleico en esta fracción. Por otro lado, la inhibición de

las desaturasas encargadas de la formación de ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena, supondrá unos niveles más bajos de estos ácidos en las fracciones lipídicas del lote C+O+Col (Huang y col., 1986; Garg y col., 1988a; Huang y col., 1990).

5.1.7.VARIACIONES SOBRE LOS LIPIDOS PLASMATICOS.

Los resultados del análisis de los lípidos plasmáticos e índices relacionados con estos lípidos de los lotes experimentales y del lote basal aparecen en la tabla 10 y gráfica 11.

Tanto los valores de colesterol como el índice colesterol/fosfolípidos, considerado como índice aterogénico (Kannel y col., 1971), señalan una marcada hipercolesterolemia en el Lote C+O+Col atribuible principalmente a la ingesta de colesterol y bilis de buey. Este incremento del colesterol total plasmático se debe a la elevación de las 2 fracciones, libre y esterificada, de dicho estero.

De las 2 fracciones lipídicas plasmáticas restantes: triglicéridos y fosfolípidos, sólo los triglicéridos sufren modificaciones con la ingesta de dietas ricas en colesterol. Así, los valores plasmáticos de triglicéridos son menores en el Lote C+O+Col (39,01±7,95 mg/dl vs 75,35±7,31 mg/dl). Este efecto pensamos es debido a la secreción por parte del hígado de lipoproteínas V.L.D.L. ricas en colesterol y pobres en triglicéridos, resultados que comentaremos posteriormente.

Durand y col. (1985) utilizando durante 6 semanas un régimen semisintético similar al de nuestra experiencia encontraron en ratas de 3 meses de edad una elevación de la colesterolemia de 90 a 373 mg/dl.

Sánchez-Muniz y col. (1991b) después de 14 días de alimentar ratas con caseína más aceite de oliva y agentes hipercolesterolemiantes encontraron un incremento del 250% en los niveles de colesterol. En el presente trabajo la hipercolesterolemia conseguida en el Lote C+O+Col no es tan marcada, probablemente debido al contenido sensiblemente menor de antioxidantes (BHT y BHA) utilizados en las dietas. A este respecto, en ratas Wistar hembras alimentadas con dietas sin colesterol conteniendo cantidades crecientes de BHT se ha visto un efecto sobre la colesterolemia directamente proporcional a la dosis de antioxidante utilizada (Olsen y col., 1986).

Quazi y col. (1983) refieren en ratas Wistar alimentadas durante 3 semanas con una dieta basal unos valores de 101 mg/dl de colesterol y de 315 mg/dl de triglicéridos, mientras que los valores de las ratas alimentadas con esa misma dieta, pero suplementada con 1% de colesterol eran de 264,6 mg/dl de colesterol total y 108 mg/dl de triglicéridos.

Lefevre y Schneeman (1984) señalaron un incremento de colesterol total (49,7 mg/dl vs 76,2 mg/dl) y disminución de triglicéridos (53,8 mg/dl vs 41,4 mg/dl) al alimentar ratas con

dietas conteniendo un 1% de colesterol frente a otras que reciben esa misma dieta pero sin el suplemento de colesterol.

Similares resultados a los comentados son descritos por otros autores: Huang y col. (1986), Eklund y Sjöblom (1986). Yoshida y col. (1990) señalaron que la alimentación con dietas suplementadas con 1% de colesterol y 0,25% de ácido cólico supuso un incremento en el colesterol plasmático (208,1 mg/dl vs 93,3 mg/dl) y una pequeña disminución de la trigliceridemia (95 mg/dl vs 92,5 mg/dl).

5.1.8. EFECTO SOBRE LAS LIPOPROTEINAS.

La ingesta de dietas suplementadas con colesterol provoca un marcado cambio en las lipoproteínas plasmáticas (tablas 11, 12 y 13, gráficas 12-20).

Esta modificación afecta tanto a la composición de cada lipoproteína (tabla 12, gráficas 13, 14 y 15), como a la distribución de cada lípido en las diferentes lipoproteínas (tabla 13, gráficas 16-20).

El incremento de colesterol plasmático observado en el Lote C+O+Col se debe principalmente al incremento del colesterol transportado por las V.L.D.L. (127,09±16,4 mg/dl vs 8,09±1,32 mg/dl).

Eklund y Sjöblom (1986) indicaron que la ingesta de dietas enriquecidas en colesterol originan en ratas la aparición de unas V.L.D.L. enriquecidas en ésteres de colesterol, denominadas β -V.L.D.L. Para estos autores si el suplemento dietario de colesterol no es superior al 0,25%, estas partículas β -V.L.D.L. serían también ricas en triglicéridos, pero si el suplemento es superior a esta cifra, los triglicéridos serían sustituidos gradualmente por ésteres de colesterol.

De acuerdo con esta observación, en nuestro estudio, las V.L.D.L. secretadas por el Lote C+O+Col son mucho más ricas en colesterol esterificado que las del Lote C+O (55,81±1,87% vs 7,46±1,66%) y más pobres en triglicéridos (11,2±1,87% vs 70,03±1,47%) (tabla 12, gráfica 13).

A su vez, el contenido de colesterol libre y fosfolípidos de las V.L.D.L. del Lote C+O+Col también se encuentra incrementado, pero en menor cuantía.

El cociente colesterol libre+fosfolípidos/colesterol esterificado+triglicéridos (indicativo de una relación entre parte superficial y la zona central de las lipoproteínas) se incrementó en las V.L.D.L. del Lote alimentado con colesterol (0,49±0,03 vs 0,29±0,01) lo que sugiere un menor tamaño de partícula para este lote.

Manhley y Holcombe (1977) en ratas macho de la raza Osborne-Mendel señalaron en ratas con hipercolesterolemia severa (680

mg/dl) que un 84,6% del colesterol era transportado por la fracción de $d < 1,006$, es decir por las V.L.D.L., mientras que en ratas hipercolesterolémicas moderadas (259 mg/dl) este porcentaje era del 54,2%.

Dolphin (1981) en ratas macho de raza Long-Evans encontró que en ratas hipercolesterolémicas el 82,4% de los lípidos de las V.L.D.L. era colesterol (libre más esterificado), mientras que con niveles de colesterolemia mucho más bajos sólo lo era el 13%.

Las cantidades de colesterol libre, colesterol esterificado y fosfolípidos en mg/dl transportadas por las L.D.L. del Lote C+O+Col son más elevadas significativamente que las del Lote C+O. Los triglicéridos disminuyen, si bien, de manera no significativa. Por lo tanto, la composición de las L.D.L. va a sufrir modificaciones similares a las ya comentadas para las V.L.D.L. Así, las L.D.L. del Lote C+O+Col son más ricas en colesterol esterificado y más pobres en triglicéridos que las del Lote C+O.

Sautier y col. (1990) estudiando el efecto de proteína de origen animal o vegetal sobre lipoproteínas en ratas Wistar encontraron una composición lipídica similar en las L.D.L. con un cociente colesterol total/fosfolípidos de 0,74. En nuestro estudio, este cociente es de $0,85 \pm 0,10$ para el Lote C+O. Dicho cociente se incrementa significativamente ($p < 0,05$) a $1,87 \pm 0,12$ en el Lote C+O+Col.

El cociente colesterol libre+fosfolípidos/colesterol esterificado+triglicéridos no varía significativamente, indicando un tamaño análogo de las L.D.L. de ambos lotes.

En lo referente a las H.D.L., la ingesta de la dieta rica en colesterol provoca valores de colesterol esterificado, colesterol libre y fosfolípidos transportados por estas partículas menores que en las H.D.L. del Lote C+O.

Resultados similares a los de este estudio fueron descritos por otros autores: Quazi y col. (1983), Lefevre y Schneeman (1984), Eklund y Sjöblom (1986) y Yoshida y col. (1990).

Estas variaciones absolutas repercutieron significativamente en el contenido relativo de colesterol esterificado de las H.D.L., que disminuyen en el Lote C+O+col., con una tendencia al incremento de triglicéridos en este mismo lote.

Respecto al cociente colesterol libre+fosfolípidos/colesterol esterificado+triglicéridos no encontramos diferencias significativas entre los lotes, lo que sugiere un tamaño similar de sus H.D.L.

El menor transporte por la fracción de H.D.L. de lípidos totales (tabla 11) y el tamaño similar de estas partículas en el Lote C+O+Col respecto al C+O, sugiere una menor cantidad de partículas H.D.L. en el lote que recibe colesterol añadido en sus dietas que en el Lote C+O.

En la tabla 13, gráficas 16-20 se pueden estudiar como todos los cambios explicados hasta ahora afectan a la distribución de cada lípido en las diferentes lipoproteínas. Así los triglicéridos son en ambos lotes vehiculizados preferentemente por las V.L.D.L., mientras que el colesterol es transportado mayoritariamente por las H.D.L. en el Lote C+O ($79,7 \pm 1,39\%$) y por las V.L.D.L. en el Lote C+O+Col ($69,61 \pm 3,85\%$). Los fosfolípidos se encuentran preferentemente en las H.D.L. en ambos lotes. El Lote C+O+Col respecto al Lote C+O incrementa los niveles de fosfolípidos sobre todo en las V.L.D.L. y los disminuye marcadamente en las H.D.L.

En estudios previos, Cuesta y col. (1986) y Sánchez-Muniz y col. (1986) encontraron que elevaciones muy moderadas de la colesterolemia en la rata conllevan incrementos paralelos de los ésteres de colesterol y H.D.L.-colesterol, y disminución de los triglicéridos, no encontrándose prácticamente variaciones en las fracciones de V.L.D.L. y L.D.L.. Sin embargo, incrementos más marcados de la colesterolemia en la rata conllevan la formación incrementada de β -V.L.D.L. y disminución de las H.D.L. Estos datos sugieren que ante un incremento masivo del "pool" de colesterol hepático se produciría una demanda de componentes estructurales (fosfolípidos, triglicéridos, colesterol esterificado y colesterol libre) hacia las V.L.D.L. que repercutiría en una menor producción de H.D.L. Por otra parte, el menor contenido de H.D.L. de estas ratas incidiría negativamente en el transporte reverso del colesterol hacia el hígado y en el metabolismo lipoproteico.

El cociente colesterol libre/colesterol esterificado en las H.D.L. es 2 veces más elevado en las ratas hipercolesterolémicas, esto sugiere una captación incrementada del colesterol libre procedente de las V.L.D.L. por las H.D.L., acompañada de una esterificación deficiente de este colesterol libre por el enzima LCAT (Lecitin-Colesterol-Acíl Transferasa) y con una cesión limitada de colesterol esterificado desde las H.D.L. hacia otras lipoproteínas, dada la producción limitada de la proteína transferidora de ésteres de colesterol en la rata (Barter y Lally, 1978).

5.2. EXPERENCIA B: "EFECTO PREVENTIVO Y/O CURATIVO DE DIETAS CONTENIENDO SARDINAS FRITAS EN ACEITE DE OLIVA SOBRE LA HIPERCOLESTEROLEMIA INDUCIDA POR DIETAS SUPLEMENTADAS CON COLESTEROL".

5.2.1. INGESTA.

Como se ha comentado en el diseño experimental (3.1.3.2.) esta experiencia se subdividió en 3 períodos: de adaptación, preexperimental de inducción hipercolesterolemiante y experimental o de tratamiento de dicha hipercolesterolemia. Los resultados obtenidos durante el período de inducción hipercolesterolemiante son similares a los ya comentados en la Experiencia A, por lo que detallaremos sólo lo sucedido durante el período experimental (22-35 días) o en su caso durante toda la experiencia (0-35 días).

Así, durante el período experimental la ingesta de los lotes que consumen dietas con sardinas fritas en aceite de oliva (S y S+Col) son ligeramente superiores a la de los lotes que ingieren las dietas conteniendo caseína y aceite de oliva (C+O, C+O+Col y REFERENCIA) (tabla 15, gráfica 21).

Sánchez-Muniz y col. (1991b) encontraron en ratas Wistar una aceptabilidad semejante, aunque ligeramente mayor, de una dieta conteniendo sardinas fritas en aceite de oliva más caseína, lo que coincide con nuestros resultados.

La mejor aceptabilidad, si bien no significativa, de las dietas conteniendo sardinas se explicaría, en parte, por el aroma del aceite de sardina y la proporción ligeramente más elevada de ácidos grasos saturados de estas dietas frente a las que contienen caseína.

Durante dicho período (22-35 días) se encuentran pequeñas diferencias en las ingestas de grasa y proteína debidos a los contenidos ligeramente distintos de sus dietas respectivas (tabla 14). Así, para la grasa los valores oscilan entre $19,70 \pm 0,72$ g en el Lote REFERENCIA y $23,79 \pm 1,04$ g del Lote S+Col, mientras que los de proteína varían entre $30,26 \pm 1,51$ g (Lote C+O+Col) y $36,07 \pm 0,78$ (Lote S+Col) (tabla 14). Estas diferencias desaparecen al contabilizar la ingesta en el total de la experiencia.

La ingesta de colesterol, como es de fácil deducción, es superior en los lotes que ingieren las dietas suplementadas con este lípido (C+O+Col y S+Col) que en los otros lotes (tabla 15, gráfica 21).

En lo referente a la ingesta de ácidos grasos aparecen diferencias significativas entre los lotes, que se detallan en la tabla 15 y gráfica 21, debidas a la distinta composición de las dietas en estos ácidos grasos (tabla 14), no existiendo diferencias significativas en la ingesta de ácidos grasos monoinsaturados, en particular de ácido oleico, en ninguno de los períodos estudiados.

Los lotes que ingieren las dietas con sardinas fritas (S y S+Col) consumen significativamente más ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) y PUFAS n-3 (linolénico, EPA, DHA) que los lotes C+O, C+O+Col y REFERENCIA. Estas diferencias ocurren en los períodos experimental y total, pero hay que indicar que son menos marcadas para la ingesta de ácidos grasos saturados durante el total de la experiencia.

El consumo de PUFAS n-6, principalmente de ácido linoleico, no difiere marcadamente entre los lotes en ninguno de los períodos estudiados, aunque en el experimental existen diferencias significativas en la ingesta de estos ácidos grasos entre los lotes C+O ($0,92 \pm 0,04$) y REFERENCIA ($0,92 \pm 0,03$) y el Lote S ($1,12 \pm 0,02$).

5.2.2. CRECIMIENTO.

En la tabla 16 aparecen los datos de crecimiento durante los períodos preexperimental, experimental y total expresados en términos de incremento de peso corporal.

No se encuentran diferencias significativas entre los lotes en ninguno de los períodos estudiados. Similares resultados fueron encontrados por Sánchez-Muniz y col. (1991b), alimentando ratas Wistar con sardinas fritas en aceite de oliva o con caseína más aceite de oliva.

Eklum y Sjöblom (1980) no encontraron diferencias significativas después de 4 semanas en la ganancia de peso de ratas alimentadas con un concentrado de proteína de pescado frente a otras que recibían caseína más D-L metionina, si bien, si se hallaron entre estos 2 lotes y otro alimentado sólo con caseína.

Jacques y col. (1986) suministrando a ratas durante 3 semanas dietas enriquecidas en colesterol conteniendo como fuente proteica pescado o caseína sin suplemento de D-L metionina encontraron diferencias significativas en el crecimiento.

La eficacia nutritiva de las dietas es evaluada en términos de C.E.A y P.E.R aparece en la tabla 17. No se encuentran diferencias significativas entre los C.E.A. y P.E.R de las ratas sometidas a los distintos tratamientos dietarios. Solomko y col. (1985) utilizando un purificado proteico de pescado encontraron en ratas en crecimiento un P.E.R de 2,56. En nuestro trabajo, los valores de P.E.R oscilan entre $2,03 \pm 0,08$ del Lote REFERENCIA) y $2,40 \pm 0,08$ del Lote S+Col).

5.2.3. PESO DE HIGADO, COMPOSICION PORCENTUAL E INDICE RELATIVO HEPATOSOMATICO.

Los pesos de los hígados, índices hepatosomáticos y composición porcentual hepática en grasa y humedad de los lotes experimentales se presentan en la tabla 18, gráficas 22 y 23.

Como hemos comentado en la Experiencia A, la ingesta de dietas suplementadas con colesterol supone la aparición de hepatomegalia y acúmulo graso en hígado. La supresión del colesterol después de los 21 días (lotes C+O y S) supone una tendencia a la normalización, sobre todo del peso hepático y del índice hepatosomático, sin conseguir nunca los valores del Lote REFERENCIA.

Kobatake y col. (1983) encontraron que el índice relativo hepatosomático se incrementa significativamente cuando la grasa en forma de metil oleato se sustituyó totalmente por otra poliinsaturada procedente de hígado de calamar, pero no cuando la sustitución fue parcial.

Las ligeras diferencias en el contenido de ácidos grasos de las dietas utilizadas (tabla 14) explicaría el porqué en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en el peso hepático e índice relativo hepatosomático, si bien, cuando se suprime la suplementación con colesterol, estos valores son superiores, pero no significativamente, en el lote que ingiere la dieta con sardinas (Lote S).

El mayor contenido graso hepático se obtiene para el Lote S+Col (60,33±3,08% s.s.) y el menor en el Lote S (45,31±2,25% s.s.).

La adición de colesterol produce un aumento significativo en el contenido graso hepático de los lotes alimentados con dietas conteniendo sardinas fritas, pero no con las que contienen caseína. Esto sugiere un claro efecto diferencial debido a la fuente proteica, a la grasa o a ambas, aspecto que será discutido más adelante (Experiencia C, apartado 5.3.).

Kobatake y col. (1983) señalaron que el contenido graso del hígado raramente es alterado por el consumo de grasa de animales marinos. Eklund y Sjöblom (1980) sugirieron que la fuente proteica (caseína más D-L metionina vs pescado) no tiene efecto sobre el peso y contenido de lípidos hepáticos. Estos dos estudios pueden contribuir a explicar, al menos en parte, los resultados obtenidos en esta Experiencia B en los lotes alimentados con dietas sin colesterol.

5.2.4.COMONENTES GRASOS DEL HIGADO.

El análisis y comparación estadística de los componentes lipídicos (colesterol: libre, total y esterificado; fosfolípidos y triglicéridos) que aparece en la tabla 19 y en la gráfica 24, muestra que la no suplementación de las dietas con colesterol y bilis de buey supone un contenido significativamente menor de colesterol en el total hepático. El contenido de triglicéridos y fosfolípidos también es menor, aunque las diferencias no son tan claras. Estos resultados van a deberse, sobre todo, al mayor peso hepático en los lotes C+O+Col y S+Col. Es de señalar el mayor contenido de fosfolípidos en mg/g tejido (s.s. ó s.f.) o en mg/g de grasa de los lotes que ingieren dietas no suplemen-

tadas con colesterol (C+O, S y REFERENCIA), diferencias que desaparecen al contabilizar los mg de fosfolípidos en el total hepático.

La ingesta de dietas conteniendo sardinas fritas suplementadas o no de colesterol, frente a sus respectivas con caseína más aceite de oliva, no induce diferencias significativas en los lípidos hepáticos.

Hay que indicar, que numerosos autores encontraron en diferentes especies animales que dietas conteniendo PUFAS n-3 estimulaban el enzima hepático ACAT, lo que supondría una acumulación de ésteres de colesterol en dicho órgano (Spector y col., 1980; Johnson y col., 1983; Parks y Bullock, 1987; Field y col., 1987). Sin embargo, debemos comentar que en todos estos trabajos se comparó los efectos de los PUFAS n-3 sólo frente a grasas saturadas.

Spady y Dietschy (1987) encontraron en hamsters que el aceite de oliva dietario promovía la esterificación del colesterol hepático en mayor medida que el aceite de cártamo o que el aceite de coco.

Kobatake y col. (1983) describieron en ratas que frente a los ácidos grasos de la manteca de cerdo, los PUFAS n-3 disminuían los niveles de colesterol en hígado de forma proporcional a la dosis usada.

Beynen (1988) indicó que dietas ricas en ácido oleico generalmente causan concentraciones más altas en el colesterol total hepático que dietas conteniendo otros tipos de ácidos grasos. La adición de colesterol a las dietas incrementaba este efecto.

Por tanto, en nuestro estudio, los resultados obtenidos se explicarían, por un lado, por la baja concentración de PUFAS n-3 en la dieta conteniendo sardinas y, por otro, porque los efectos de estos PUFAS n-3 se comparan frente a una dieta con aceite de oliva y no con ácidos grasos saturados.

El cociente colesterol libre/colesterol esterificado es similar en todos los lotes y muy inferior al obtenido en el Lote REFERENCIA. Estos resultados son similares a los comentados por Sirtori y col. (1984) o a los descritos en la Experiencia A de esta tesis doctoral.

5.2.5.COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS TOTALES HEPATICOS.

Como hemos comentado en la Experiencia A la ingesta de dietas con colesterol supone principalmente una disminución de PUFA y de ácido esteárico e incremento de los ácidos grasos monoinsaturados.

En esta Experiencia B en todos los lotes que recibieron suplemento de colesterol en sus dietas durante los 21 días del

periodo de inducción hipercolesterolemia encontramos a los 35 días, probablemente como fruto de esta inducción, modificaciones similares a las descritas para los PUFA, ácido esteárico y ácido oleico que en la Experiencia A (tabla 20, gráficas 25 y 27).

Los lotes S y S+Col presentan niveles superiores significativamente de EPA y DHA y menores en ácido araquidónico que los otros lotes, situación que se debe a la introducción de sardinas fritas en la dieta y no a la supresión del colesterol (tabla 20, gráfica 25).

Estos resultados coinciden con los de muchos trabajos donde el consumo de aceite de pescado se acompañó normalmente de cambios en los ácidos grasos hepáticos, incrementándose enormemente el contenido de EPA y DHA (De Scrijver y Privett, 1982; Iritani y Fujikawa, 1982; Iritani y Norita, 1984; Bruckner y col., 1984) y disminuyendo el de ácido araquidónico (De Scrijver y Privett, 1982; Iritani y Fujikawa, 1982; Bruckner y col., 1984; Croft y col., 1984 y Swanson y Kinsella, 1986).

De igual forma que en plaquetas, endotelios o cultivos celulares de animales alimentados con aceite de pescado (Sánchez-Muniz, 1987), los datos obtenidos en hígado sugieren que el EPA y el DHA deben desplazar al ácido araquidónico de las membranas celulares de otras partes del cuerpo.

De acuerdo con lo señalado en la revisión de Kinsella (1987), el mayor contenido en PUFAS n-3 de los hígados de los lotes S y S+Col se debería al mayor contenido de estos ácidos grasos en sus dietas y no a una mayor actividad Delta-6 + Delta-5 desaturasas que transformarían el $C_{18:3}$ n-3 en $C_{22:6}$ n-3.

Sin embargo, de acuerdo con Kurata y Privett (1980), Garg y col. (1988a) y Garg y col. (1988b) el menor contenido en ácido araquidónico en los lotes S y S+Col se explicaría por una disminución de las actividades Delta-6 desaturasa, elongasa y Delta-5 desaturasa (requeridas para la síntesis del ácido araquidónico a partir de ácido linoléico), ya que los ácidos grasos de la familia n-3 pueden deprimir el contenido del ácido araquidónico de los tejidos mediante la inhibición de dichos enzimas.

5.2.6.COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL COLESTEROL ESTERIFICADO HEPATICO.

La esterificación del colesterol hepático (tabla 21, gráficas 25 y 28) presenta la misma tendencia comentada en la Experiencia A. Los ácidos grasos mayoritarios presentes en esta fracción son el oleico y el palmítico. El mantenimiento de la suplementación dietaria de colesterol (lotes C+O+Col y S+Col) supone un contenido significativamente menor de ácido araquidónico en el colesterol esterificado respecto a los lote C+O y S, respectivamente. Estas diferencias pensamos de deben a una mayor inhibición en la producción de este ácido en los lotes que continúan ingiriendo colesterol añadido en sus dietas, aunque,

en el total hepático no aparecen estas variaciones.

Hay que señalar que en el caso de los lotes que ingieren dietas con sardinas, la suplementación con colesterol parece afectar menos a la producción de ácido araquidónico que en los lotes que toman las dietas con caseína. Así, el cociente $C_{20:4}/C_{18:2}$ en la fracción de colesterol esterificado para los lotes S y S+Col es de 0,22 y 0,19 respectivamente; mientras que para los lotes C+O y C+O+Col es de 0,54 y 0,13 respectivamente.

Estos resultados estarían de acuerdo con lo señalado por Garg y col. (1988a) quienes indicaron una disminución de la actividad Delta-6 y Delta-5 desaturasas en animales ingiriendo dietas suplementadas con colesterol conteniendo grasas saturadas o con PUFAS n-6 respecto a otras sin dicho esterol. Esta inhibición no apareció cuando la grasa presente en la dieta suplementada con colesterol era aceite de pescado.

Por último, el mayor contenido de PUFAS n-3 en el colesterol esterificado de los lotes S y S+Col se debe a una mayor ingesta de estos ácidos grasos.

5.2.7.VARIACIONES SOBRE LOS LIPIDOS PLASMATICOS.

Tras el período de inducción hipercolesterolémica (0-21 días), ya discutido en la Experiencia A, la ingesta de las dietas experimentales provocan sobre los lípidos plasmáticos (colesterol total, H.D.L.-colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y H.D.L.-fosfolípidos) las variaciones que se pueden observar en las tablas 22 y 23, gráfica 31.

El Lote C+O+Col, que sigue ingiriendo la misma dieta que durante el periodo preexperimental, es el que presenta los valores más altos de colesterol ($231,43 \pm 31,49$ mg/dl), mientras que las otras dietas experimentales reducen marcadamente el colesterol plasmático, respecto a los valores del día 21. Estos resultados indican la progresión de la hipercolesterolemia en el Lote C+O+Col y que las dietas con sardinas son efectivas bajando los niveles de colesterol plasmático, aun manteniendo la suplementación de colesterol en la dieta (Lote S+Col).

Así, en el Lote S la dieta produce el efecto más hipocolesterolemiante, igualando incluso la colesterolemia del Lote REFERENCIA, mientras que la dieta conteniendo sardinas fritas más colesterol (Lote S+Col) decrece los niveles de colesterol plasmático en menor cuantía que el Lote S, pero de forma similar a la dieta de caseína y aceite de oliva (Lote C+O).

Desde hace tiempo se conoce que los PUFAS n-3 son muy efectivos disminuyendo los niveles de colesterol,. No obstante, el mecanismo por el que producen estos efectos permanece sin esclarecer, habiendose propuesto varias hipótesis (Beynen y Katan, 1985; entre otros autores). En la actualidad se piensa que los PUFAS n-3 afectan principalmente a la síntesis y liberación de V.L.D.L. (Von Lossonczy y col., 1978; Bronsgeest-Schoute y

col., 1981; Harris y col., 1983; Oh y Monaco, 1985). En la rata se ha descrito que los efectos hipocolesterolemiantes del aceite de pescado pueden ser explicados debido a que el hígado secreta menor cantidad de V.L.D.L. y mayor de cuerpos cetónicos (Wong y col., 1984).

Nestel (1987) señaló que el tratamiento de la hipercolesterolemia con aceite de pescado es controvertido, excepto cuando el exceso de colesterol de encuentra en las V.L.D.L. En la rata, tal y como hemos visto en la Experiencia A, el colesterol dietario induce la producción de V.L.D.L. ricas en colesterol esterificado (β -V.L.D.L.), modificando el perfil normocolesterolémico (donde la mayor proporción de colesterol aparece en las H.D.L.) a otro perfil donde el colesterol es transportado preferentemente por las V.L.D.L. (Eisenberg y Levy, 1976; Mahley y Holcombe, 1977; Cuesta y col., 1987a). Así, el aceite de pescado podría modificar los efectos hipercolesterolemiantes del colesterol de la dieta (Nestel, 1986) reduciendo la salida de lipoproteínas V.L.D.L. del hígado.

Durand y col. (1985) indicaron que en ratas hipercolesterolémicas la sustitución del 50% de aceite de oliva por aceite de sardina produjo un descenso en los niveles de colesterol de un 28%. Higón y col. (1987) señalan que la ingesta total de 1,97 g y 4,64 g de PUFAS n-3, después de 14 y 28 días respectivamente, redujo la tendencia hipercolesterolemiantes observada en el lote testigo 5 y 14 veces respectivamente.

En la tabla 23, gráfica 31 encontramos que los niveles más elevados de H.D.L.-colesterol aparecen en el Lote REFERENCIA, siendo similares para los demás grupos de ratas, si bien, significativamente más altos en el Lote C+O que en los lotes que ingieren sardinas.

El mantenimiento del suplemento de colesterol en las dietas con caseína o con sardinas fritas no produce efectos sobre este parámetro. Sin embargo, cuando se comparan el tanto por ciento de colesterol transportado por las H.D.L. observamos niveles siempre más elevados en los lotes sin suplemento de colesterol. El valor más bajo se observa en el Lote C+O+Col (11,91 \pm 2,12%) y, claramente, el más elevado en el Lote REFERENCIA (58,18 \pm 5,48%).

Cava (1986) señaló en ratas con severa hipercolesterolemia que el porcentaje de colesterol vehiculizado por las H.D.L. fue del 4%, mientras que en hipercolesterolemias mucho más moderadas (del orden de 130 mg/dl) el transporte de colesterol por las H.D.L. fue de un 12,6% del total.

Mahley y Holcombe (1977) en ratas macho de la raza Osborne-Mendel, alimentadas con una dieta hipercolesterolemiantes señalaron que un 3% del colesterol está vehiculizado por la fracción de densidad 1,08-1,21, cuando la colesterolemia fue de 680 mg/dl, mientras que en hipercolesterolemias más moderadas (259 mg/dl) un 7% del colesterol total se vehiculizó por las H.D.L..

Yoshida y col. (1990) encontraron en ratas alimentadas con

dietas conteniendo un 15% de caseína niveles de H.D.L.-colesterol de 62,9 mg/dl, siendo el tanto por ciento de colesterol transportado por las H.D.L. del 67%. La introducción de 1% de colesterol indujó una colesterolemia moderada en la cual sólo el 20% del total del colesterol es transportado por las H.D.L.

Kobatake y col. (1983) encontraron en ratas alimentadas con dietas basales suplementadas con un 5% de una mezcla de PUFAS n-3, procedentes de hígado de calamar, niveles un 40% más bajos en colesterol total y un 109% más elevados en H.D.L-colesterol que en ratas alimentadas con dieta basal suplementada con 5% de manteca de cerdo. Estos autores no encontraron diferencias en los niveles de H.D.L.-colesterol al sustituir parcialmente con metil oleato los PUFAS n-3 del hígado de calamar. Sin embargo, un estudio más detallado de los resultados de Kobatake y col. (1983) si indican que el porcentaje de colesterol transportado en las H.D.L. se incrementa al aumentar el aporte de PUFAS n-3.

Nuestros datos sugieren que en el Lote C+O+Col la hipercolesterolemia es más severa que en los otros lotes, no sólo por los niveles de colesterol total, sino también por el tanto por ciento de colesterol transportado por las H.D.L.

En el Lote S, aún cuando la colesterolemia es normal el porcentaje de colesterol transportado por las H.D.L. es más bajo que en el Lote REFERENCIA, situación que sugiere aun una cierta alteración en el metabolismo lipoproteico, siendo probablemente necesario para su total normalización un tratamiento más prolongado con dietas de sardinas sin colesterol, o bien, el empleo en las dietas de unas sardinas con un contenido más elevado de PUFAS n-3. Este aspecto se comentará nuevamente en la Experiencia C.

Aún cuando los efectos hipocolesterolemiantes de la ingesta de sardinas fritas en aceite de oliva deben atribuirse principalmente a los PUFAS de la familia n-3, no debemos olvidar el posible efecto de la diferente fuente proteica sobre los niveles de colesterol. Así, Terpstra y col. (1983), señalaron efectos en la colesterolemia diferentes entre la caseína y mezcla de proteínas compuestas por caseína, proteína de pescado y gelatina. Los animales alimentados con esta última dieta no modificaron su colesterol frente a basales, mientras que los alimentados con caseína lo hacían de forma marcadamente significativa. Eklund y Sjöblom (1980) encontraron valores significativamente menores de colesterol plasmático en ratas alimentadas con dietas cuya fuente proteica era un concentrado de proteína de pescado frente a dietas cuya fuente proteica era caseína más 0,5% de metionina.

Jacques y col. (1986) señalaron, en dietas enriquecidas con colesterol, unos valores menores de colesterol en suero para ratas que ingirieron pescado como fuente proteica frente a las que ingirieron caseína. Este diferente efecto se cree, como ya se ha comentado en la revisión bibliográfica, que es debido a la diferente composición en aminoácidos y/o péptidos liberados durante la digestión de estas fuentes proteicas.

Bergeron y Jacques (1989) también señalaron que la proteína de pescado puede afectar a los valores de colesterol plasmático.

Los mismos autores Jacques y col. (1988) indicaron que la adición de tirosina a una dieta enriquecida con colesterol cuya fuente proteica era pescado, elevaba los niveles de colesterol un 40% respecto a la misma dieta sin la adición de dicho aminoácido.

Según Zhang y Beynen (1990) cantidades crecientes de proteína de pescado en la dieta puede reducir los niveles de colesterol en suero y en hígado, no encontrándose tal relación dosis/respuesta cuando la proteína utilizada fue caseína.

La trigliceridemia se mantiene baja en todos los lotes respecto al Lote REFERENCIA, aunque en el Lote C+O tiende a normalizarse. Estos resultados, aparentemente, parecen contradictorios con lo señalado por la abundante bibliografía sobre los efectos hipotrigliceridémicos de los PUFAS n-3. Si bien hay que indicar que sólo en los estudios en los que los aceites de pescado fueron incluidos en gran proporción en la dieta se observaron disminución en la trigliceridemia (Ruiter y col., 1978; Kobatake y col., 1983; Wong y col., 1984). Los investigadores concluyen que el descenso producido de los triglicéridos fue debido principalmente a un incremento en la oxidación de ácidos grasos y disminución en la secreción de triglicéridos por el hígado (Wong y col., 1984). Sin embargo, cuando sólo se utilizaron 81 mg de EPA/Kg de peso corporal (Hamazaki y col., 1982) o 100 mg/día de EPA y DHA (Morisaki y col., 1983) no se observaron diferencias significativas entre la media plasmática de triglicéridos de ratas controles respecto a las tratadas.

En concordancia con estos resultados, en el presente estudio no se aprecia modificación en la trigliceridemia debido a la baja ingesta de EPA y DHA.

Cava (1986) durante las 2 primeras semanas de experiencia utilizando sardinas fritas en aceite de oliva con un contenido sensiblemente mayor de PUFAS n-3 que el de nuestro estudio tampoco encontró efecto sobre la trigliceridemia, aún cuando este lípido disminuyó significativamente cuando la experiencia se prolongó durante 14 días más.

En lo referente a los fosfolípidos, los valores son significativamente superiores en el Lote C+O+Col que en los otros lotes, excepto el de REFERENCIA. En el resto de los grupos, incluido el de referencia, los valores son similares.

Cava (1986), coincidiendo con Mahley y Holcombe (1977) y Durand y col. (1985), señaló que la inducción hipercolesterolemia incrementa también los niveles de fosfolípidos, aunque en menor cuantía.

Kannel y col. (1971), en el estudio de Framingham, señalaron al cociente colesterol total/fosfolípidos como índice de aterogénesis, siendo la elevación de colesterol más peligrosa

cuando no se acompaña de una elevación semejante de los fosfolípidos. En las ratas en condiciones normales este cociente es menor de la unidad (Mahkey y Holcombe, 1977; Cava, 1986; Cuesta y col., 1987a). En casos de hipercolesterolemia este cociente es mayor de 1.

En el presente estudio, el cociente colesterol total/fosfolípidos más elevado aparece en el Lote C+O+Col ($1,81 \pm 0,13$) y el más bajo en el Lote S ($0,79 \pm 0,04$), junto con el Lote REFERENCIA; permaneciendo ligeramente por encima de la unidad en el Lote S+Col ($1,24 \pm 0,16$) y con unos valores de $0,96 \pm 0,10$ en el Lote C+O.

En la tabla 23, gráfica 31 aparecen las concentraciones de H.D.L.-fosfolípidos de los diferentes lotes experimentales.

De forma paralela a lo encontrado para las H.D.L.-colesterol los niveles más bajos de H.D.L.-fosfolípidos aparecen en el Lote S+Col y los más elevados en el Lote C+O. En el Lote C+O+Col, el transporte relativo de fosfolípidos por esta lipoproteína es mucho más bajo, lo que coincide con los datos de Cava (1986) y Mahley y Holcombe (1977) en ratas con hipercolesterolemia moderada.

Los resultados en las dietas de sardinas referentes al transporte relativo de fosfolípidos en las H.D.L. es similar a lo descrito por Cava (1986) utilizando dietas con sardinas fritas en aceite de oliva.

Los resultados comentados sobre los lípidos plasmáticos de los grupos experimentales pensamos puedan ser debidos principalmente a una diferente secreción de lipoproteínas V.L.D.L.; ya que, por un lado la ingesta de colesterol promueve la secreción de V.L.D.L. ricas en ésteres de colesterol, mientras que por otro, los PUFAS n-3 inhibirían la secreción de estas lipoproteínas.

Este posible mecanismo inhibitor de la secreción de V.L.D.L. provocado por el aceite de pescado, así como el efecto de la proteína se estudiarán con más detalle en la Experiencia C.

En cuanto a los ácidos grasos presentes en suero (tabla 24, gráficas 29 y 30), las diferencias entre los lotes que ingieren dietas con caseína y aceite de oliva frente a las que ingieren dietas con sardinas fritas en aceite de oliva aparecen en el ácido araquidónico, EPA y DHA. Así, en los lotes S y S+Col es mayor la presencia de EPA y DHA y menor la de ácido araquidónico.

Si comparamos los ácidos grasos presentes en suero de los lotes C+O y C+O+Col y REFERENCIA observamos que no existen diferencias significativas. Estos datos indican que la ingesta de dietas suplementadas con colesterol no afecta a los ácidos grasos presentes en el suero. Esto contrasta con lo señalado previamente a nivel hepático, donde indicábamos un incremento de la actividad Delta-9 desaturasa y disminución de la Delta-6 y Delta-5 desaturasas.

Creeemos que los datos encontrados se deben a una distribución semejante de los diferentes ácidos grasos en las fracciones de triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol plasmáticos, que por tanto, no modificarían el porcentaje relativo de los diferentes ácidos grasos en suero. De igual forma en los lotes que reciben dietas con sardinas, la suplementación con colesterol no afecta significativamente la composición de ácidos grasos del suero.

Huang y col. (1990) con dietas conteniendo un 5% de aceite de primula con un 19,9% de ácido linoleico y 9% de Gamma-linoleico observaron con la adición de colesterol modificaciones en el porcentaje de ácidos grasos de fosfolípidos y ésteres de colesterol.

5.2.8.EFECTOS SOBRE TEJIDO ADIPOSEO Y BAZO.

El contenido en colesterol del tejido adiposo y el contenido en grasa, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos del bazo aparece en las tablas 25 y 26, gráficas 32 y 33.

Los valores medios encontrados en los tejidos adiposos de los lotes tanto en mg/g de tejido como en mg/g de grasa coinciden con los de De Waard (1978). Los resultados en el Lote C+O+Col son superiores significativamente a los del Lote Referencia y parecen relacionarse con el contenido de colesterol plasmático. En nuestro caso, por lo tanto, el contenido de colesterol plasmático parece condicionar el contenido de este lípido en tejido adiposo, ya que lotes con colesterolemias intermedias a las de los lote C+O+Col y REFERENCIA (lotes S, C+O y S+Col) presentan niveles de colesterol en tejido adiposo también intermedios.

La hipótesis de que el tejido adiposo podría actuar como un almacén de colesterol no aparece claramente definida en este estudio, si lo comparamos con el incremento de colesterol mucho más marcado que se produce en el hígado. Sin embargo, algunos autores, (Rodrigues y col., 1987) comentan la capacidad de captación de los ésteres de colesterol por el tejido adiposo, dada la existencia de receptores para la Apo B-100-L.D.L. en dicho órgano.

Zsigmond y col. (1990) indicaron que los PUFAS incrementarían la captación de los ésteres de colesterol de las H.D.L. por los adipocitos de la rata, si bien, dicho estudio se realizó comparando aceite de girasol frente a manteca, no haciéndose ningún comentario sobre el posible papel de los PUFAS n-3.

Como es sabido el aclaramiento de colesterol plasmático se realiza mediante captación de lipoproteínas por las células del cuerpo por sistemas específicos (dependientes de receptor) e inespecíficamente mediante pinocitosis. Esta captación inespecífica se realizaría entre otros sistemas por células macrofágicas el sistema retículo-endotelial, de las cuales el bazo es muy rico. En esta experiencia quisimos conocer la participación del bazo en la captación de colesterol y si se modificaba además el

contenido esplénico de otros lípidos. Los resultados parecen indicar un papel muy secundario del bazo en los mecanismos de aclaramiento del colesterol, ya que no se encuentran diferencias significativas en mg/g de tejido o mg/g de grasa. Si bien, dado el mayor peso de los bazos de los animales de los lotes C+O+Col y S+Col, el contenido total de lípidos y en particular de colesterol es más elevado; sobre todo, en el lote más hipercolesterolémico (Lote C+O+Col).

5.2.9.EFECTOS SOBRE LA EXCRECION TOTAL DE HECES, Y SU CONTENIDO DE GRASA, COLESTEROL Y SALES BILIARES.

Los valores de la excreción total de heces, su composición en humedad y grasa, así como la excreción fecal de grasa, colesterol y ácidos biliares aparecen en las tablas 27, 28 y 29, gráficas 34, 35 y 36.

La excreción fecal, tanto en sustancia húmeda como en sustancia seca, es más elevada en los lotes de sardina que en los de caseína. A su vez, en los animales que se mantiene el suplemento de colesterol durante los 35 días la excreción tiende a ser más elevada que en los otros lotes.

El contenido de humedad más elevado se encuentra en el Lote S, mientras que el porcentaje de grasa fecal es mucho más alto en los lotes C+O+Col y S+Col. Siendo en estos últimos lotes la grasa fecal mucho más rica en colesterol que en los otros lotes (70% vs 9%, aproximadamente).

La reacción enzimática empleada para la determinación de colesterol en heces también engloba a otros 3- β -OH esteroides, con excepción del coprostanol, formados en el tracto intestinal por acción microbiana (De Waard, 1978). Sin embargo, esta medida enzimática nos da una idea razonable de la excreción de colesterol en las heces (De Waard, 1978).

Los resultados obtenidos en el Lote REFERENCIA coinciden con los de otros autores. Así, en lo referente a la excreción de colesterol, De Waard (1978) encontró en rata Zucker alimentadas con una dieta comercial unos valores de 2,6 mg/g de heces frente a los $2,79 \pm 0,17$ mg/g de heces de nuestro estudio.

Nagata y col. (1981), en condiciones similares a las de este estudio encontraron valores de esteroides neutros fecales, incluido coprostanol, de 4,94 mg/día y de 4,84 mg/día de esteroides ácidos. En nuestro trabajo los resultados de excreción/día son de $4,15 \pm 0,32$ mg/día de 3- β -OH esteroides (sin incluir coprostanol) y de $4,32 \pm 0,53$ mg/día de ácidos biliares expresados como ácido cólico. Para Yoshida y col. (1990) los valores excretados fueron de aproximadamente 0,5 mg/día de colesterol y de 2 mg/día de esteroides ácidos. Estas diferencias quizás sean debidas a la distinta composición grasa de las dietas, un 2% para el trabajo de Yoshida y col. (1990) frente a los 10% empleados en esta memoria de tesis doctoral.

Con la suplementación dietaria de colesterol se incrementa la excreción tanto de ácidos biliares como de 3- β -OH esteroides y grasa total en los lotes S+Col y C+O+Col respecto a los lotes REFERENCIA, C+O y S.

La supresión del suplemento dietario de colesterol tras los 21 de experiencia (lotes C+O y S) supone la normalización en la excreción de grasa y colesterol respecto la Lote REFERENCIA. La mayor excreción total de colesterol encontrada en el Lote S ($47,55 \pm 5,01$ mg/7 días) frente al Lote REFERENCIA ($29,04 \pm 2,26$ mg/7 días) se debe exclusivamente a una mayor excreción de heces ($13,26 \pm 0,67$ g/7 días vs $9,48 \pm 0,51$ g/7 días). En cambio, la eliminación de ácidos biliares se mantiene unas 5 veces más elevada en los lotes S y C+O respecto al lote REFERENCIA.

Yoshida y col. (1990) al estudiar en ratas el efecto de la suplementación de colesterol sobre la excreción del mismo y la de esteroides ácidos observaron un incremento en ambos valores. Así, la excreción de colesterol pasó de 0,5 mg/día a 30 mg/día y la de esteroides ácidos de 2 mg/día a 10 mg/día al añadir a las dietas un 1% de colesterol y 0,25% de ácido cólico.

Lovati y col. (1990) también encontraron resultados similares a los comentados en conejos alimentados con dietas suplementadas con colesterol frente a los de otros animales que ingirieron la misma dieta sin la adición de dicho esterol.

La mayor excreción de colesterol y ácidos biliares por parte de los lotes C+O+Col y S+Col puede ser debida, o bien, a que la gran concentración hepática de colesterol de estos lotes promueva una eliminación de más colesterol y ácidos biliares a través de la bilis, o que parte del colesterol y bilis de buey añadido a la dieta no se absorba.

Los resultados obtenidos en este trabajo parecen indicar que el mucho mayor contenido de colesterol presente en las heces de los lotes C+O+Col y S+Col se debería a una limitación en la absorción intestinal del mismo a pesar de la utilización de la bilis de buey, ya que cuando se suprime el suplemento de colesterol en la dieta (lotes S y C+O) la excreción del mismo, a pesar de la concentración hepática de colesterol, se asemeja a los del Lote REFERENCIA. Esta hipótesis parece confirmarse al estudiar el coeficiente de digestibilidad aparente del colesterol en los lotes C+O+Col y S+Col, siendo este coeficiente de 28,5% y 32,8%, respectivamente.

Estos datos estarían de acuerdo con los resultados obtenidos por Eklund y Sjöblom (1986). Estos autores no encontraron un incremento en el colesterol plasmático al pasar de dietas conteniendo 1% de colesterol a otras conteniendo un 2%, justificando este fenómeno por la limitación en la absorción intestinal del colesterol.

También, Turley y Dietschy (1981) describieron que ratas alimentadas con dietas conteniendo un 0,25% de colesterol no aumentaban la excreción biliar de colesterol, aunque disminuyeron

el porcentaje de colesterol sintetizado "de novo" en la bilis por los hepatocitos.

En cambio, para los ácidos biliares, pensamos que dado que prácticamente toda la bilis de buey añadida a la dieta debe absorberse (Anderson y col., 1987), el mantenimiento de niveles elevados de excreción de ácidos biliares, en los lotes C+O y S, sería el mecanismo preferente utilizado por las ratas para defenderse de la hipercolesterolemia y del acúmulo de colesterol hepático previamente inducido.

Coincidiendo con esta hipótesis, Davis y col (1983) observaron un incremento en la concentración de colesterol esterificado (2-24 veces) y un incremento en la secreción de ácidos biliares (2-10 veces) en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con dieta basal suplementada con 20% de aceite de oliva y 2% de colesterol frente a otras que ingieren la dieta basal.

Para estos autores, el enzima regulador de la síntesis de ácidos biliares (7- α hidroxilasa) estaría modulado por la cantidad disponible de su sustrato, es decir, de colesterol hepático, de forma que a más colesterol disponible más actividad del mencionado enzima.

Finalmente, la presencia de sardinas fritas en la dieta parece inducir un mayor contenido en las heces de ácidos biliares. Así, aunque las diferencias no son significativas, la excreción en mg/7 días de ácidos biliares es 29% más elevada en el Lote S+Col que en el Lote C+O+Col y 21% más alto en el Lote S frente al C+O. De acuerdo con esta afirmación, Balasubramanian y col. (1985) describieron un incremento en la secreción biliar de ratas alimentadas con aceite de pescado.

Esta tendencia a la mayor excreción de ácidos biliares por los lotes S y S+Col respecto a los respectivos lotes que ingieren caseína se asemeja a lo encontrado por otros autores al comparar caseína con otras fuentes proteicas, tales como proteína de soja, proteína de pescado y proteína de suero de leche (Lovati y col., 1990). Esta aparente mayor excreción podría explicar el menor contenido de colesterol en suero en los lotes que reciben sardina respecto a los lotes de caseína.

Resumiendo, los datos de esta Experiencia B sugieren que la utilización de sardinas fritas en aceite de oliva como fuente proteica y grasa evita en gran parte la inducción hipercolesterolemia producida por la suplementación de colesterol y bilis de buey en la dieta, al promover una menor secreción de lipoproteínas ricas en colesterol (β -V.L.D.L. y L.D.L.). Esta menor secreción de lipoproteínas implica un incremento no significativo (alrededor del 10%) del colesterol hepático y una excreción un 29% más elevada de ácidos biliares. La retirada de la suplementación de colesterol y bilis de buey produce una normalización en la colesterolemia plasmática, más acelerada en el lote que recibe sardinas fritas en aceite de oliva que en el de caseína más aceite de oliva, probablemente producida por una excreción del

orden de un 20% más elevada tanto de colesterol como de ácidos biliares fecales.

5.3. EXPERIENCIA C: "EFECTO DIFERENCIAL DE LA PROTEINA Y DE LOS ACIDOS GRASOS DE LAS SARDINAS FRITAS EN ACEITE DE OLIVA SOBRE RATAS HIPERCOLESTEROLEMICAS."

5.3.1. INGESTA.

Los datos de la tabla 31 muestran la ingesta total, proteica, grasa y de los diferentes ácidos grasos durante los periodos de inducción hipercolesterolemizante (0-21 días), experimental (22-35 días) y total (0-35) de los lotes experimentales: C+O, S y C+AS.

No existen diferencias significativas en las ingestas total, proteica y de grasa entre los lotes en ninguno de los periodos estudiados, a pesar de las diferencias de la fuente proteica y grasa estudiadas. Sin embargo, la introducción de las dietas experimentales a los 22 días origina un distinto consumo de ácidos grasos en las fase experimental y total. Así, los lotes que ingieren sardinas fritas en aceite de oliva y caseína más grasa extraída de estas sardinas fritas (lotes S y C+AS) consumen significativamente más ácidos grasos saturados (palmítico) y PUFAS n-3 (linolénico, EPA y DHA) y menos ácidos grasos monoinsaturados (oleico) que el Lote C+O (tabla 31, gráfica 37). En lo referente a la ingesta de los PUFAS n-6 las diferencias significativas entre los lotes sólo aparecen en la fase experimental y no en el total de este estudio (tabla 31, gráfica 37). Lógicamente, estas diferentes ingestas se deben a la distinta procedencia y composición de la grasa de las dietas experimentales (tabla 30).

Estos datos sugieren una aceptabilidad similar de las dietas experimentales, a pesar de la diferente naturaleza de la grasa dietaria de los lotes C+AS y S respecto al Lote C+O lo que coincide con los datos de un trabajo previo (Sánchez-Muniz y col., 1991b).

5.3.2. CRECIMIENTO.

Los datos de crecimiento expresados en incremento de peso corporal durante los distintos periodos estudiados aparecen en la tabla 32. Como en las anteriores experiencias no existen diferencias significativas entre los lotes.

Así mismo, el estudio de los coeficientes de eficacia alimentaria (C.E.A.) y eficacia proteica (P.E.R.) (tabla 33) muestran que las dietas empleadas en el periodo experimental (22-35 días): C+O (conteniendo caseína más aceite de oliva), S (conteniendo sardinas fritas en aceite de oliva) y C+AS (conteniendo caseína más grasa extraída de sardinas fritas) poseen la misma eficacia alimentaria. Estos valores de C.E.A. y P.E.R. son similares a los comentados en las experiencias A y B de esta memoria.

5.3.3. PESO DE HIGADO. COMPOSICION PORCENTUAL E INDICE RELATIVO HEPATOSOMATICO.

Los pesos de los hígados, índices hepatosomáticos y la composición porcentual hepática en humedad y grasa aparecen en la tabla 34, gráficas 38 y 39.

El menor peso hepático y el menor índice relativo hepatosomático es el correspondiente al Lote C+O. En cambio, el menor contenido de grasa y el mayor de humedad es el de los hígados del Lote S.

La comparación de los lotes S y C+AS muestra diferencias significativas sólo en el contenido de grasa hepática sobre sustancia fresca ($12,93 \pm 1,02\%$ vs $16,46 \pm 0,44\%$, respectivamente). Lógicamente, este efecto es atribuible sólo al diferente tipo de proteína dietaria (sardina vs caseína).

Los lotes C+AS y C+O sólo difieren en el peso de los hígados, que fue menor en los animales de este último lote.

En cambio, el Lote S presenta un mayor peso hepático (s.f.), índice hepatosomático y contenido en humedad y una menor proporción de grasa hepática respecto al Lote C+O.

Estos datos sugieren un efecto importante sobre la composición hepática, no sólo del tipo de grasa empleada, sino también de la proteína dietaria o de un posible efecto sinérgico de ambos componentes dietarios.

Las fotografías indican claramente la disminución de la esteatosis hepática en los lotes C+O, S y C+AS respecto al Lote C+O+Col. Este efecto fue más neto en el Lote S que en el Lote C+AS.

Estos resultados comparados con los de la Experiencia A, ya comentados, indican que a pesar de la retirada del colesterol dietario, se mantiene la esteatosis hepática, siendo posiblemente necesario un mayor tiempo de tratamiento para una total normalización hepática.

5.3.4. COMPONENTES GRASOS DEL HIGADO.

El efecto diferencial de la proteína y grasa dietarias sobre los componentes hepáticos: colesterol (libre, total y esterificado), fosfolípidos y triglicéridos de los lotes experimentales aparecen en la tabla 35, gráfica 40.

El contenido de colesterol total y esterificado en mg/g de tejido o mg/g de grasa es significativamente distinto en los tres grupos estudiados. El menor valor corresponde al lote S y el mayor al Lote C+O. El contenido total hepático, aunque muestra la misma tendencia, no es significativamente distinto entre los lotes C+AS y C+O debido al mayor peso hepático del primero.

En cuanto al colesterol libre, el Lote S presenta significativamente menor contenido de este lípido respecto a los otros dos grupos que no difieren entre sí.

El cociente colesterol libre/colesterol esterificado es muy similar en los 3 lotes, y es característico de ratas que han sido alimentadas con dietas ricas en colesterol. Este aspecto ya fue comentado en la Experiencia A.

Respecto al contenido de triglicéridos y fosfolípidos, las diferencias entre los lotes no son muy marcadas, resaltando principalmente el mayor contenido de estos dos lípidos en la grasa hepática del lote S y el contenido total de triglicéridos, significativamente superior, en el Lote C+AS frente al Lote C+O ($776,50 \pm 33,59$ mg vs $612,48 \pm 42,32$ mg).

Resumiendo, el Lote C+O presenta el mayor contenido de colesterol total y esterificado, y el menor de triglicéridos y fosfolípidos. El Lote C+AS tiene los valores más elevados de colesterol libre, triglicéridos y fosfolípidos, mientras que el Lote S presenta los menores valores de colesterol total, libre y esterificado.

Lovati y col. (1990) encontraron en conejos alimentados con dietas ricas en colesterol que el empleo de proteína procedente de pescado respecto a la caseína supuso una disminución del colesterol hepático similar al encontrado con la proteína de soja, lo que apoya los resultados de esta Experiencia C.

Sugano y col. (1984) señalaron una disminución del 10% en el colesterol hepático en ratas alimentadas con una dieta conteniendo un 20% de proteína de sardina frente a dietas con caseína.

Basandonos en los datos de estos autores es importante indicar que en la Experiencia C la fuente proteica juega un papel, probablemente más importante que la composición grasa de la dieta, sobre los niveles hepáticos de colesterol: total, libre y esterificado, como se deduce de la comparación de los 3 lotes.

Respecto al contenido total de fosfolípidos y triglicéridos, es la fuente grasa dietaria, y no la proteica, es la que ejerce mayor influencia; participando probablemente los PUFAS n-3 en la limitación hepática de la secreción de triacilglicéridos en las V.L.D.L. Esto concuerda con lo obtenido por Wong y col. (1984) al suplementar dietas basales con un 15% en peso de MAX-EPA.

5.3.5.COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS TOTALES HEPATICOS.

La composición hepática en ácidos grasos de los lotes experimentales se muestra en la tabla 36, gráficas 41 y 43.

Las diferencias encontradas entre los 3 lotes se explicaría por la ingesta distinta de ácidos grasos, proteína y el contenido hepático de colesterol, como se discutirá más adelante.

Así, los lotes que ingieren la grasa de las sardinas fritas en aceite de oliva (lotes S y C+AS) presentan un contenido hepático mayor de ácidos grasos saturados, PUFAS n-3 y menor de ácidos grasos monoinsaturados que el Lote C+O.

Por otro lado, como ya hemos comentado en la Experiencia A, en incremento de colesterol en el hígado supone en dicho órgano una inhibición de las actividades Delta-6 y Delta-5 desaturasas y, posiblemente, una activación de la Delta-9 desaturasa. Por lo tanto, el mayor contenido hepático de colesterol en el Lote C+AS respecto al Lote S, únicamente atribuible a la distinta fuente proteica, originaría una mayor inhibición de las Delta-6 y Delta-5 desaturasas provocando un incremento del EPA (intermediario del DHA) y disminución del DHA, por lo que el índice $C_{22:6}/C_{18:3}$ (tabla 34, gráfica 42) es menor en el Lote C+AS. Por otro lado, la activación de la Delta-9 desaturasa implicará el aumento del ácido palmitoleico y disminución del ácido esteárico, incrementándose en el Lote C+AS los índices $C_{16:1}/C_{16:0}$ y $C_{18:1}/C_{18:0}$ (tabla 34, gráfica 42).

Kimura y col. (1990) analizaron los efectos del EPA sobre la inducción hipercolesterolemia de dietas conteniendo colesterol según la fuente proteica de las mismas, encontrando un cociente EPA/ácido araquidónico en los hígados de ratas alimentadas con caseína más EPA menor que las que reciben proteína de soja más EPA. Estos autores sugieren que el EPA se acumularía primero en hígado y después sería transferido mediante lipoproteínas a otras células diana. En nuestro caso, el cociente EPA/ácido araquidónico es más elevado en el lote de caseína que en el lote de proteína de sardina, lo que sugiere una mayor demanda de EPA por los diferentes tejidos de las ratas del Lote S, repercutiendo favorablemente en una mejor utilización de este ácido graso por las diferentes células corporales.

5.3.6.COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE TRIGLICERIDOS, FOSFOLIPIDOS Y COLESTEROL ESTERIFICADO HEPATICOS.

Las tablas 37, 38 y 39, gráficas 41, 44, 45 y 46 muestran la composición en ácidos grasos de los triglicéridos, fosfolípidos y colesterol esterificado de los hígados de los animales de los lotes experimentales.

La incorporación de los distintos ácidos grasos a las diferentes fracciones lipídicas hepáticas se realiza de forma similar a lo descrito en la Experiencia A. La introducción de las dietas conteniendo el aceite de sardinas fritas (lotes S y C+AS) respecto al Lote C+O supone un incremento del contenido de EPA y DHA en todas las fracciones. Este incremento junto con la incorporación preferente de determinados ácidos grasos a triglicéridos, fosfolípidos y colesterol esterificado origina las diferencias encontradas entre los lotes.

Sin embargo, hay que hacer dos observaciones importantes en este apartado. Por un lado, el desplazamiento del ácido araquidónico de los fosfolípidos por EPA y DHA que provoca la ingesta de

dietas con aceite de sardinas fritas y, por otro, el efecto de la proteína de sardina frita respecto a la caseína sobre el contenido de colesterol hepático que a su vez condiciona la distribución de los ácidos grasos (lotes S y C+AS).

Los PUFAS n-3 (EPA y DHA) pueden inhibir la Delta-6 desaturasa reduciendo la conversión del ácido linoleico dietario hacia ácido araquidónico (Iritani y Fujikawa, 1982; De Scrijver y Privett, 1982; Iritani y Norita, 1984; Dyerberg, 1986; Adam, 1987; Cook y Spence, 1987; Hwang y col., 1988; Garg y col., 1988a; Garg y col., 1988b; Kinsella y col., 1990a). También, compiten por las acíl-tioquinasas, que activan los ácidos grasos, y acíl-transferasas desplazando al ácido araquidónico de los fosfolípidos tisulares y reduciendo la disponibilidad de este ácido para la producción de eicosanoides (Bang y Dyerberg, 1980; Iritani y col. 1980; Galli y col. 1981; De Scrijver y Privett, 1982; Iritani y Fujikawa, 1982; Sanders y Roshanai, 1983; Kimura, 1983; Sanders y Mistry, 1984; Iritani y Norita, 1984; Yamori y col., 1985; Von Schacky y col., 1985; Dyerberg, 1986; Herold y Kinsella, 1986; Kinsella, 1987; Cook y Spence, 1987; Garg y col. 1988a; Hornstra, 1989). Por tanto, EPA y DHA compiten con el ácido araquidónico por los enzimas encargados de las síntesis de eicosanoides. Este sería un mecanismo por el cual los PUFAS n-3 dietarios afectarían funciones fisiológicas mediadas por estos eicosanoides (Bruckner y col., 1984; German y col., 1986; Lands, 1986; Lands 1987), incluidas reacciones relacionadas con la aterogénesis y la trombosis.

En cuanto al efecto de la proteína de sardinas, comparando los lotes S y C+AS, observamos una diferente composición en ácidos grasos en las fracciones lipídicas hepáticas estudiadas. En triglicéridos, el Lote S presenta un porcentaje menor de palmitoleico y mayor de esteárico; en fosfolípidos, este mismo lote tiene mayor proporción de DHA y menor de EPA y ácido araquidónico; en cambio, en el colesterol esterificado el Lote S es más rico proporcionalmente en esteárico y oleico y más pobre en palmitoleico, EPA y DHA. Estas diferencias pensamos son debidas al mayor contenido de colesterol hepático del Lote C+AS, que demandaría una mayor esterificación del colesterol con PUFAS n-3, disminuyendo el contenido de estos ácidos grasos en la fracción de fosfolípidos. Este aspecto se explicaría por la hipótesis de Cornwell y col. (1981), ya comentado en la Experiencia A, según la cual un acúmulo de colesterol para ser esterificado provocaría una disminución del "pool" utilizable de ácidos grasos poliinsaturados para la producción de fosfolípidos.

Además, el contenido de EPA y DHA se ve profundamente afectado en la fracción de fosfolípidos en el Lote C+AS vs Lote S. Este efecto podría ser explicado bajo 3 puntos de vista: 1.) Una mayor demanda de EPA por otros territorios extrahepáticos en el Lote S. 2.) Una mayor conversión de EPA en DHA. 3.) Una menor retroconversión de DHA en EPA (Sprecher, 1991).

5.3.7.VARIACIONES SOBRE LOS LIPIDOS PLASMATICOS.

Los valores de colesterol (libre, total y esterificado), triglicéridos y fosfolípidos en plasma aparecen en la tabla 40, gráfica 47.

El consumo de aceite de sardinas fritas (lotes S y C+AS) respecto al Lote C+O origina niveles de colesterol total menores, aunque no significativamente. Esto se debe, sobre todo, a la menor concentración del colesterol esterificado en estos lotes.

Respecto a la trigliceridemia, los lotes S y C+AS presentan unos valores más altos de triglicéridos plasmáticos que el lote C+O. Este efecto contrario al descrito por otros autores (Ruiter y col.; 1978; Kobatake y col., 1983; Wong y col., 1984) pensamos puede ser debido a que durante la inducción hipercolesterolemiantes se producen unas V.L.D.L. ricas en ésteres de colesterol (Experiencia A); posteriormente la introducción de dietas conteniendo grasa de las sardinas fritas (lotes S o C+AS) originaría una modificación en la secreción de V.L.D.L., apareciendo nuevas V.L.D.L. enriquecidas en triglicéridos, situación que no se produciría en el Lote C+O. Esta hipótesis se analizará detenidamente en el apartado 5.3.8.

Kimura y col. (1990) encontraron que los efectos sobre la colesterolemia y trigliceridemia de un suplemento del 4% de un concentrado de EPA (78,9% de EPA y 5,6% de DHA) son diferentes dependiendo de la naturaleza de la proteína dietaria utilizada.

Finalmente, indicar que la relación colesterol total/fosfolípidos, comentada en el apartado 5.2.7. como un índice de aterogénesis, es significativamente menor ($0,67 \pm 0,02$) en el Lote S, mientras que el Lote C+O con un índice >1 sugiere una hipercolesterolemia más marcada que en los otros lotes.

5.3.8.EFECTOS SOBRE LAS LIPOPROTEINAS.

El estudio de los efectos de las diferentes fuentes proteicas y grasas utilizadas sobre la lipoproteinemia (tablas 39, 40 y 41, gráficas 48-56) señala una clara acción de ambas fuentes.

5.3.8.1.EFECTOS SOBRE LAS V.L.D.L.

El análisis del contenido total en mg/dl de los diferentes lípidos (tabla 41, gráfica 48) en las distintas lipoproteínas indica, principalmente, un transporte significativamente mayor de colesterol en las V.L.D.L. del Lote C+O respecto al Lote C+AS y de éste respecto al Lote S. La misma tendencia aparece en los fosfolípidos de las V.L.D.L., mientras que estas lipoproteínas en el Lote C+AS vehiculizan más triglicéridos que las V.L.D.L. de los otros 2 lotes.

El estudio de la composición porcentual lipídica de las V.L.D.L. (tabla 42, gráfica 49), muestra que tales partículas son similares en los lotes C+AS y S, pero diferentes significativamente a las del Lote C+O. En este último lote el lípido mayoritario en estas lipoproteínas es el colesterol esterificado ($54,73 \pm 3,72\%$), mientras que en los otros lotes son los triglicéridos los mayoritarios (alrededor del 37%).

Estos resultados indican que las V.L.D.L. del Lote C+O responde a un perfil típico de β -V.L.D.L., mientras que las de los lotes S y C+AS tienen características intermedias entre V.L.D.L. normales y β -V.L.D.L. (ver también Experiencia A).

El estudio comparativo de las V.L.D.L. de los lotes S y C+AS señala una composición porcentual de lípidos muy similar, pero el contenido en cantidades absolutas es del orden de 3 veces más bajo en el Lote S; esto sugiere un papel diferencial del tipo de proteína (proteína de sardina vs caseína) que condicionaría la presencia en plasma de 3 veces menos partículas V.L.D.L. en el Lote S.

Muramatsu y Sugiyama (1990) señalaron, como hemos comentado en la revisión bibliográfica, un posible efecto de la metionina en el metabolismo del colesterol y en el ensamblaje y secreción de las V.L.D.L. por las células hepáticas. Dado el contenido de metionina en la caseína y en la proteína de pescado (Eklund y Sjöblom, 1980), y el suplemento de metionina a las dietas conteniendo caseína, es muy posible que el contenido de este aminoácido azufrado sea muy superior en las dietas del Lote C+AS que en las del Lote S, lo cual repercutiría en niveles más elevados de fosfatidilcolina, que sería requerido para la síntesis y secreción de las partículas V.L.D.L., este efecto sería además complementado por un contenido menor de glicina de la dieta C+AS que la dieta S (Muramatsu y Sugiyama, 1990). Los posibles mecanismos metabólicos implicados se detallan en el apartado 1.3. de la revisión bibliográfica.

Los diferentes resultados obtenidos en el Lote C+AS respecto al Lote S podrían también ser explicados teniendo en cuenta las consideraciones de Beynen (1990) quien sugirió que la proteína de caseína incrementa la absorción de colesterol y posiblemente de bilis de buey respecto a otras proteínas. Esto llevaría a un incremento del colesterol hepático, originando una mayor secreción de lipoproteínas V.L.D.L. y una menor eliminación de colesterol y ácidos biliares por las heces.

También es posible que el menor contenido de cistina de la dietas de caseína respecto a la de proteína de pescado produzca una menor eliminación de ácidos biliares y, por tanto, un enriquecimiento de colesterol hepático mediante el mecanismo propuesto por Danielsson y col. (1984) y Hassan y col. (1984), en el que una menor cantidad de cistina se incorporaría hacia glutatión reducido produciéndose una menor activación de la colesterol 7- α -hidroxilasa.

Cuando se comparan los lote S y C+AS con el lote C+O se

observa que la presencia de PUFAS n-3 en las dietas de ratas hipercolesterolémicas origina la tendencia a la normalización de las V.L.D.L., las cuales contienen más triglicéridos y menos ésteres de colesterol.

5.3.8.2.EFECTOS SOBRE LAS L.D.L.

La composición lipídica de las L.D.L. aparece en las tablas 41 y 42 y en las gráficas 48 y 50.

El transporte de lípidos en las L.D.L. de rata es menor que en la otras fracciones (Mahley y Holcombe, 1977; Dolphin, 1981; Sánchez-Muniz y col., 1986; Cuesta y col., 1987a), debiéndose señalar que las L.D.L. del Lote C+AS contiene más colesterol y fosfolípidos que las de los otros grupos. Las L.D.L. del Lote C+O es la que transporta menos cantidad de triglicéridos.

Respecto a la composición porcentual de las L.D.L., la similitud aparece entre los lotes C+O y C+AS; mientras que en el Lote S hay un menor contenido de colesterol total, sobre todo esterificado, y mayor de triglicéridos. El porcentaje de fosfolípidos en las L.D.L. es muy similar en los 3 grupos.

Estos datos sugieren que dada la similitud entre las partículas L.D.L. de los dos lotes que reciben caseína y la mayor cantidad de lípidos transportados por las L.D.L. del Lote C+O, el número de partículas L.D.L. circulantes en este último lote debe ser mayor. En este caso el número de partículas estaría modulado por el tipo de grasa de ambas dietas.

El mayor contenido de ésteres de colesterol de los grupos C+AS y C+O que de el Lote S podría interpretarse por la producción hepática directa de L.D.L. ricas en ésteres de colesterol como mecanismo de defensa de la hipercolesterolemia. Este proceso ha sido descrito en el hombre (Lozano, 1985).

Sánchez-Muniz y col. (1986) al comparar los efectos sobre la lipoproteinemia en ratas Wistar de la ingesta de dietas conteniendo grasa vegetal cruda (con un 43,66% de ácido palmítico) frente a dietas con esta misma grasa pero después de ser usada en 30 frituras sucesivas de patatas, observaron que los niveles de fosfolípidos vehiculizados por las L.D.L eran mayores en las ratas que consumían la dieta con la grasa tratada térmicamente, lo que parecería indicar una posible modificación en la relación de la parte polar/no polar de las partículas L.D.L. y, por tanto, de su tamaño. En cambio, si la fuente grasa empleada era aceite de oliva no observaron diferencias significativas en el contenido de estas L.D.L. al comparar el aceite crudo frente al sometido a fritura (Cuesta y col., 1987a).

Cuesta y col. (1987b) observaron al comparar en ratas Wistar los efectos de dietas conteniendo aceite de oliva con otras conteniendo una grasa vegetal (con un 43,66% de ácido palmítico), un incremento significativo de la fosfolipemia en todas las fracciones lipoproteicas, sobre todo en la L.D.L. donde encontra-

ron un incremento del 157,14%.

5.3.8.3.EFECTOS SOBRE LAS H.D.L.

Respecto a las H.D.L., el lote que presenta el mayor transporte de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos es el Lote S (tablas 41 y 42 y gráficas 48 y 51). Sin embargo, la composición lipídica de las H.D.L. séricas es muy parecida en los tres grupos de ratas, destacando en todos ellos la gran proporción de fosfolípidos. Hay que señalar que el Lote C+O presenta un contenido ligeramente menor, aunque no significativo, en colesterol total e, igualmente, un mayor contenido de fosfolípidos.

Dada la similitud de la composición lipídica de las H.D.L. de los 3 lotes y el diferente transporte absoluto de los lípidos por dichas H.D.L. es muy probable que el Lote S presente el mayor número de partículas H.D.L., mientras que el Lote C+O el menor. Esto implicaría que el transporte retrógrado de colesterol en las ratas de este último lote debe realizarse en menor cuantía que en los animales que reciben aceite de sardinas fritas en aceite de oliva.

Como es sabido, dos sistemas principales controlan el intercambio de colesterol, especialmente de colesterol esterificado, entre las lipoproteínas plasmáticas: 1.) Enzima LCAT (Lecitin-Colesterol-Acíl Transferasa). 2.) Proteína Transferidora de lípidos (LPT, Lipid Transfer Protein).

En la rata los niveles de LPT son muy bajos con lo que la LCAT debe jugar un papel principal esterificando el colesterol libre y regulando la captación de colesterol libre generado por las células o durante el catabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos.

Roach y col. (1987) indicaron que la captación de H.D.L. por el hígado, posiblemente a través de receptor, está incrementada con la alimentación con aceite de pescado. Abbey y col. (1990), citado por Nestel (1990), sin embargo, indicaron que la actividad plasmática LCAT está disminuida en individuos que consumen aceite de pescado, pero la significación biológica de esta reducción es desconocida, ya que no hay evidencia en la disminución del cociente colesterol esterificado/colesterol libre. En esta Experiencia C los cocientes colesterol esterificado/colesterol libre se mantienen en plasma y H.D.L. lo que sugiere suficiente actividad LCAT aún en las ratas que consumen aceite de sardinas fritas. Estas H.D.L. ricas en colesterol y su captación por el hígado asegurarían un mecanismo para el mantenimiento de la homeostasis del colesterol, conduciendo a una normalización del metabolismo lipoproteico más rápido que en las ratas que no ingieren tal aceite.

5.3.8.4.DISTRIBUCION DE LOS LIPIDOS EN LAS DIFERENTES LIPOPROTEINAS.

La distribución porcentual de los lípidos en las lipoproteínas también muestra diferencias muy claras entre los tres lotes experimentales (tabla 43, gráficas 52-56).

El colesterol, tanto libre, esterificado como total, aparece mayoritariamente en las H.D.L. de los lote S y C+AS, aunque en este último existe un gran contenido de colesterol en las V.L.D.L. con respecto al Lote S. En las ratas alimentadas con la dieta C+O el colesterol se localiza principalmente en las V.L.D.L..

Los triglicéridos se distribuyen en mayor proporción en las H.D.L. de los lotes S y C+O ($61,36 \pm 2,12\%$ y $51,61 \pm 3,73\%$), mientras que para los animales que ingieren la dieta C+AS este lípido aparece sobre todo en las V.L.D.L. ($50,55 \pm 3,73\%$).

Por último, los fosfolípidos se localizan mayoritariamente en las H.D.L. de los tres grupos de ratas, pero en proporciones significativamente diferentes. Así, en el Lote S un $92,96 \pm 0,63\%$ de los fosfolípidos aparece en las H.D.L., mientras que en los otros lotes disminuye esta proporción aumentando, sobre todo, en las V.L.D.L., que en el Lote C+O es del $23,67 \pm 2,55\%$.

La distribución de los diferentes lípidos en las distintas lipoproteínas séricas que acabamos de comentar, indica que en el Lote S las H.D.L. es el transportador lipídico por excelencia, lo que sugiere la normalización de su perfil lipoproteico (Dolphin, 1981; Sánchez-Muniz y col., 1986; Cuesta y col., 1987a).

En el Lote C+AS coexisten como transportadores lipídicos las H.D.L. y en ligera menor cuantía las V.L.D.L., las cuales serían ricas en triglicéridos y pobres en ésteres de colesterol, es decir, practicamente normales.

Por último, en el Lote C+O el número de partículas H.D.L. está reducido como hemos comentado, siendo un transportador muy importante de colesterol esterificado las V.L.D.L., es decir, este lote sigue presentando un perfil lipoproteico de animal hipercolesterolémico (Experiencia A).

Muchas son las teorías propuestas en la bibliografía para explicar el efecto diferencial del aceite y de la proteína de pescado sobre la lipoproteinemia. Así, mientras el efecto del aceite de pescado parece más claro, el de su proteína es más discutido.

Numerosos autores explican los efectos hipolipemiantes del aceite de pescado por una secreción limitada de V.L.D.L. (Kinse-lla y col., 1990b). Esta limitación puede ser debida, o bien a una inhibición de las síntesis hepática de ácidos grasos y triglicéridos (Iritani y col., 1980; Nestel y col., 1984; Wong y col., 1984; Connor y Bristow, 1985; Connor, 1986; Nestel y col., 1986;

Wong y Nestel, 1987; Wong y Marsh, 1988), o a una producción disminuida de apo B (Nestel y col., 1984; Nestel y col., 1986). Esta secreción limitada de lipoproteínas V.L.D.L. por las ratas que consumen PUFAS de la familia n-3 explicaría, al menos en parte, los resultados obtenidos en esta Experiencia C.

Por otro lado, la proteína también tiene efectos sobre el metabolismo lipoproteico. Así, la proteína de pescado al compararla con la caseína disminuye los niveles de colesterol en las V.L.D.L. (Eklund y Sjöblöm, 1986; Bergerson y Jacques, 1989; Lovati y col., 1990) y en las L.D.L. (Bergerson y Jacques, 1989; Beynen; 1990) , incrementandolos en las H.D.L. (Bergerson y Jacques, 1989; Lovati y col., 1990; Beynen, 1990).

Para explicar este efecto de la proteína, Lovati y col. (1990) propusieron 2 hipótesis. La primera, ya que en humanos y conejos existe un mecanismo activo para transferir lípidos del "nucleo" de una lipoproteína a otra (Barter y Lally, 1978), el incremento de la concentración de H.D.L.-colesterol se debería a una inhibición del intercambio de colesterol desde las H.D.L. hacia las L.D.L. En nuestro caso, al no existir esta capacidad de transferencia en ratas no sería una explicación razonable. La segunda hipótesis propone que la proteína de pescado estimularía la lipoprotein-lipasa y esto explicaría la reducción de la concentración de V.L.D.L.-colesterol y el incremento de la H.D.L.-colesterol (Nikkilä, 1978).

Esta segunda hipótesis apoya nuestros resultados, en los que se produce la reducción de la concentración de colesterol transportado en las V.L.D.L. y del número de estas lipoproteínas y el incremento de la concentración de H.D.L.-colesterol y del número de partículas H.D.L. en el Lote S respecto al Lote C+AS.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con la finalidad de valorar la eficacia de un tratamiento contra la hipercolesterolemia inducida experimentalmente por la dieta se procede al siguiente estudio: en una primera etapa y durante un periodo experimental de tres semanas de duración se procede a la administración a ratas de una dieta conteniendo 15% de caseína, 10% de aceite de oliva y como agentes hipercolesterolemiantes 2% de colesterol y 0,5% de bilis de buey frente a otra de semejantes características pero sin colesterol ni bilis de buey. Al final de dicho periodo experimental se procede a estudiar el perfil lipoproteico de los animales y a cuantificar la afectación hepática por el tratamiento hipercolesterolémico.

En una segunda etapa se analizaron los efectos de la retirada de colesterol de la dieta en los animales hipercolesterolémicos, así como la validez de un tratamiento contra la hipercolesterolemia basado en la utilización de dietas conteniendo sardinias fritas en aceite de oliva suplementadas o no con un 2% de colesterol durante un periodo de dos semanas. Después de este periodo experimental se valoran las modificaciones en la colesterolemia, perfil lipoproteico y en la composición grasa hepática analizando además las variaciones de colesterol en tejido adiposo y órgano esplénico y en la excreción fecal de grasa, colesterol y ácidos biliares.

Por último, y también durante un periodo experimental de dos semanas se comparan los efectos en ratas hipercolesterolémicas de dietas conteniendo sardinias fritas en aceite de oliva o caseína adicionada con la grasa extraída de sardinias fritas en dicho aceite frente a una dieta basal conteniendo caseína más aceite de oliva. Después de este periodo basal se valoran las modificaciones en la lipemia, lipoproteinemia y composición de la grasa hepática.

Los resultados obtenidos en las tres etapas del estudio permiten enumerar las siguientes conclusiones:

CONCLUSIONES A LA EXPERIENCIA A

A-1. La aceptabilidad de la dieta hipercolesterolemiantes conteniendo caseína, aceite de oliva y colesterol más bilis de buey es equivalente a la de una dieta basal conteniendo caseína y aceite de oliva.

A-2. El crecimiento en términos de incremento de peso corporal y la eficacia nutritiva de las dietas expresada como coeficiente de eficacia alimentaria y coeficiente de eficacia proteica es equivalente en la dieta hipercolesterolemiantes y en la dieta basal.

A-3. El peso de los hígados, contenido en agua y humedad de los mismos, aspecto morfoestructural hepático, así como el índice relativo hepatosomático de las ratas alimentadas con la dieta hipercolesterolemiantes indican la existencia de hepatomegalia y esteatosis.

A-4. El contenido hepático de colesterol total y colesterol esterificado expresado en mg/g s.s. es del orden de 13 veces y 40 veces respectivamente más elevado en el lote hipercolesterolémico que en el lote basal, siendo menos marcadas las diferencias respecto a triglicéridos y mucho menos en cuanto a fosfolípidos.

A-5. Los hígados de las ratas alimentadas con la dieta hipercolesterolémica presentan mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados y mucho menor de ácidos araquidónico y docosahexaenoico.

A-6. La actividad delta-9-desaturasa establecida por el cociente ácido oleico/ácido esteárico es unas 12 veces más elevada en el lote que recibe colesterol en su dieta.

A-7. Las fracciones lipídicas hepáticas indican en ambos lotes que el ácido oleico aunque mayoritario en las 3 fracciones se incorpora preferentemente a los ésteres de colesterol y a los triglicéridos, el ácido palmítico a los triglicéridos, el palmitoleico a los ésteres de colesterol, mientras que a los fosfolípidos se incorporan preferentemente los ácidos araquidónico, estearico, linoleico y docosahexaenoico.

A-8. Las ratas alimentadas con dieta conteniendo colesterol presentan respecto al lote basal una marcada hipercolesterolemia, con elevación tanto de la fracción libre como esterificada del colesterol, así como hipertrigliceridemia.

A-9. La ingesta de dieta suplementada con colesterol afecta marcadamente la composición de lipoproteínas plasmáticas y la distribución de cada lípido en las diferentes lipoproteínas.

A-10. El incremento de colesterol plasmático observado en el lote alimentado con dieta suplementada de colesterol de debe principalmente al incremento de V.L.D.L. ricas en colesterol esterificado.

A-11. Las L.D.L. del lote hipercolesterolémico son más ricas en colesterol esterificado y más pobres en triglicéridos que las del lote basal.

A-12. Las H.D.L. del lote hipercolesterolémico transportan cantidades menores de colesterol esterificado y libre y de fosfolípidos, con un cociente colesterol libre/colesterol esterificado más elevado que las H.D.L. del lote basal.

CONCLUSIONES A LA EXPERIENCIA B

B-1. La aceptabilidad de dietas conteniendo sardinas fritas en aceite de oliva y adicionadas o no con colesterol es similar a la de dietas conteniendo caseína y aceite de oliva adicionadas o no con el agente hipercolesterolemizante.

B-2. El consumo de ácidos grasos saturados y poliinsaturados de la familia n-3 es significativamente más elevado en los lotes

alimentados con sardinas fritas que en los lotes que reciben en sus dietas caseína más aceite de oliva.

B-3. El crecimiento en términos de incremento de peso corporal y la eficacia nutritiva de las dietas expresada como coeficiente de eficacia alimentaria y coeficiente de eficacia proteica es equivalente en los 5 lotes experimentales.

B-4. El peso de los hígados, índice relativo hepatosomático y la composición porcentual hepática en humedad y grasa es similar en el lote alimentado con sardinas fritas más colesterol que en el que recibe caseína más aceite de oliva suplementado con colesterol.

B-5. La supresión de colesterol de las dietas después del periodo de inducción hipercolesterolemianta supone una tendencia a la normalización del peso hepático y del índice relativo hepatosomático, presentando los hígados del lote alimentado con sardinas el menor contenido graso.

B-6. La ingesta de dietas conteniendo sardinas fritas suplementadas o no de colesterol frente a sus respectivas conteniendo caseína más aceite de oliva no induce diferencias significativas en los lípidos hepáticos.

B-7. Los hígados de las ratas que reciben en sus dietas sardinas fritas presentaron un porcentaje más elevado en eicosapentaenoico, docosahexaenoico y en el total de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 y más bajos en araquidónico y en el total de ácidos grasos poliinsaturados n-6.

B-8. Los ácidos grasos que esterifican el colesterol hepático son preferentemente oleico y palmítico, presentando los lotes de sardinas con o sin suplemento en la dieta de colesterol mayores niveles de PUFA n-3 en dicha fracción hepática.

B-9. En contraste con la dieta hipercolesterolemianta conteniendo caseína, aceite de oliva y colesterol, la dieta con sardinas fritas adicionada de colesterol reduce marcadamente el colesterol plasmático, así como el índice aterogénico colesterol/fosfolípidos.

B-10. El efecto hipocolesterolemianta más marcado lo produce la dieta conteniendo sardinas sin la adición de colesterol, siendo equivalente la bajada de colesterol en el lote alimentado con sardinas fritas más colesterol que en el lote que recibe caseína más aceite de oliva sin la suplementación de dicho esterol.

B-11. Los niveles de H.D.L.-colesterol sugieren que serían necesarios tratamientos con dietas de sardinas más prolongados para llegar a la total normalización del perfil lipoproteico.

B-12. El contenido plasmático de colesterol en los diferentes lotes experimentales parece relacionado con los niveles de este lípido en tejido adiposo y en bazo.

B-13. La excreción total de heces es más elevada en los lotes alimentados con sardinas fritas que en los de caseína, incrementándose con la suplementación dietaria de colesterol la excreción de ácidos biliares, de 3- β -OH esteroides y de grasa total.

B-14. La supresión del suplemento dietario de colesterol tras el periodo de inducción de la hipercolesterolemia supone la normalización en la excreción de grasa y colesterol, pero no de ácidos biliares que se mantiene elevada.

CONCLUSIONES A LA EXPERIENCIA C

C-1. La aceptabilidad por animales hipercolesterolémicos de una dieta conteniendo sardinas fritas en aceite de oliva es equivalente a otras conteniendo caseína como fuente proteica y aceite de oliva o grasa extraída de sardinas fritas como fuente grasa.

C-2. Los lotes que ingieren sardinas fritas y caseína más grasa extraída de sardinas fritas consumen significativamente más ácidos grasos saturados (palmítico) y PUFA n-3 (linoleico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico) y menos ácidos grasos monoinsaturados (oleico) que el lote alimentado con caseína y aceite de oliva.

C-3. La retirada de colesterol y utilización de sardinas fritas disminuye sensiblemente más la esteatosis que la retirada de colesterol y la utilización de dietas conteniendo caseína y grasa de sardinas fritas lo que sugiere un efecto sinérgico de la proteína de sardinas con la grasa de dicho pescado, siendo necesario tratamientos más prolongados para una total normalización hepática.

C-4. Los hígados de las ratas alimentadas con sardinas fritas presentan niveles significativamente menores de colesterol total y esterificado y más elevados de triglicéridos y fosfolípidos que los lotes alimentados con caseína y grasa de sardina frita o con caseína y aceite de oliva.

C-5. El mayor contenido de colesterol hepático en el lote alimentado con caseína y grasa de sardinas respecto al lote que ingiere sardinas fritas supone una mayor inhibición de las actividades delta-6 y delta-5 desaturasas hepáticas provocando un incremento de eicosapentaenoico y disminución de docosahexaenoico y activación de la delta-9-desaturasa con aumento de ácido palmítico y disminución del ácido esteárico en dicho órgano.

C-6. La ingesta de ácidos grasos poliinsaturados n-3 supone un incremento del contenido de eicosapentaenoico y docosahexaenoico en las fracciones hepáticas de triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol. Las diferencias encontradas en algunos ácidos grasos entre el lote alimentado con sardinas fritas respecto al que recibe caseína más grasa de sardinas fritas sugiere un efecto neto de la fuente proteica.

C-7. Si bien la colesterolemia disminuye respecto al periodo pre-experimental (Experiencia A) de forma semejante en los 3 lotes experimentales -alimentados con caseína más oliva, con caseína más grasa de sardinas y con sardinas fritas- el índice aterogénico colesterol/fosfolípidos sugiere una normalización más destacable en el lote alimentado con sardinas fritas.

C-8. El contenido de colesterol y triglicéridos de las lipoproteínas V.L.D.L. de los lotes experimentales indica que el lote que recibe caseína más aceite de oliva presenta V.L.D.L. con características de β -V.L.D.L., mientras que las V.L.D.L. de los lotes alimentados con caseína más grasa de sardinas fritas o con sardinas fritas serían intermedias entre V.L.D.L. normales y β -V.L.D.L.

C-9. Dada la proporción y distribución similar de los diferentes lípidos transportados en las V.L.D.L. y las menores concentraciones plasmáticas de los mismos encontradas en estas lipoproteínas, la ingesta de sardinas fritas condiciona la presencia de aproximadamente tres veces menos partículas V.L.D.L. que en el lote que recibe caseína más grasa extraída de sardinas fritas, lo que sugiere un papel modulador del tipo de proteína, posiblemente relacionado con la diferente composición aminoacídica de ambas fuentes proteicas.

C-10. Las L.D.L. del lote alimentado con sardinas fritas presentan un menor contenido de colesterol total y esterificado y mayor de triglicéridos que las L.D.L. de los otros lotes experimentales. El mayor contenido de fosfolípidos en las L.D.L. aparece en los animales alimentados con caseína y grasa extraída de sardinas fritas.

C-11. Las H.D.L. de los tres lotes experimentales se caracterizan por contener una elevada proporción de fosfolípidos, destacando que el lote alimentado con sardinas fritas presenta el mayor número de partículas H.D.L., mientras que el lote alimentado con caseína más aceite de oliva el menor.

C-12. La distribución de los diferentes lípidos en las distintas lipoproteínas séricas indica una mayor normalización del metabolismo y perfil lipoproteico en el lote alimentado con sardinas fritas que en los lotes que reciben caseína y grasa extraída de sardinas fritas o caseína y aceite de oliva.

CONCLUSION GENERAL

La inclusión de sardinas fritas en la dieta resulta ser un tratamiento eficaz para la prevención y curación de hipercolesterolemia inducida por la ingesta de colesterol, si bien se necesitaría tratamientos más prolongados para la normalización total del metabolismo lipoproteico.

Los resultados obtenidos con el consumo de sardinas fritas en aceite de oliva respecto a los de caseína más grasa extraída de sardinas fritas en aceite de oliva sugieren un efecto potenciador de la proteína de pescado sobre la acción beneficiosa de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 en el metabolismo lipoproteico de animales hipercolesterolémicos.

7. BIBLIOGRAFIA.

-ADAM, O. (1987) Polyenoic fatty acids metabolism and effects on prostaglandin biosynthesis in adults and aged persons. En: "Proceeding of the AOCS short course on polyunsaturated fatty acids and eicosanoids". Lands W.E.W. ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL: pp. 215-219.

-AITKEN, A. y CONNEEL, J.J. (1979) Fish. En: "Effects of heating of foodstuffs". Priestley, R.J. Ed. Applied Science publishers. London pp. 219-254.

-ALIM, H. y MORTON, I.D. (1974) Oxidation in foodstuffs fried inedible oils. IV int. Congress Food Science and Technology, I, 345-356.

-ALLEN, B.R. (1991) Fish oil in combination with other therapies in the treatment of psoriasis. World Rev. Nutr. Diet. 66, 436-445.

-ALPERS, D.H.; LOCK, D.R.; LANCASTER, N.; POKSAY, K y SCHONFELD, G. (1985) Distribution of apolipoprotein A-I and B among intestinal lipoproteins. J. Lip. Res. 26, 1-10.

-ANDERSON, R.G.W.; GOLDSTEIN, J.L. y BROWN, M.S. (1976) Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2434.

-ANDERSON, L.; DIBBLE, M.V.; TURKKI, P.R.; MITCHELL, H.S. y RYNBERGEN, H.J. (1987) Utilización de nutrientes: digestión, absorción y metabolismo. En: "Nutrición y dieta de Cooper". 17ª Edición. J.B. Lippincott Co. Interamericana. México. pp. 175-212.

-BALASUBRAMANIAN, S.; SIMONS, L.A.; CHANG, S. y HICKIE, J.B. (1985) Reduction in plasma cholesterol by a diet rich in n-3 fatty acids in the rat. J. Lipid. Res. 26, 684-689.

-BANG, H.O. y DYERBERG, J. (1980) Lipid metabolism in Greenland Eskimos. Adv. Nutr. Res. 3, 1-40.

-BARTER, P.J. y LALLY, J.I. (1978) The activity of an esterified cholesterol transferring factor in human and rat serum. Biochem. Biophys. Acta. 531, 233-236.

-BARTH, C.A.; SCHOLZ-AHRENS, K.E.; PFEUFFER, M. y HOTZE, A. (1990) Response of hormones and lipid metabolism to different dietary proteins. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, pp. 110-125.

-BEAMONTE, A. (1988) Estabilidad del triptófano durante los procesos térmicos culinarios de preparación de un pescado graso (Sardina Pilchardus). Influencia del almacenamiento al estado congelado. Tesina de licenciatura. Instituto de Nutrición y Bromatología. C.S.I.C.-U.C.M.

- BEHER, W.T. y BAKER, G.D. (1958) Effect of dietary bile acids on in vivo cholesterol metabolism in the rat. Proc. Soc. Biol. Med. 98, 892.
- BERGERSON, N. y JACQUES, H. (1989) Influence of fish protein as compared to casein and soy protein on serum and liver lipids, and serum lipoprotein cholesterol levels in the rabbit. Atherosclerosis. 78, 113-121.
- BERNADIER, C.D. (1988) Interaction of insulin status and dietary fat on the hepatic phospholipid fatty acid composition of BHT rats. Nutr. Rep. Int. 37, 269-276.
- BEYNEN, A.C. (1988) Dietary monounsaturated fatty acids and liver cholesterol. Artery 15 (3), 170-175.
- BEYNEN, A.C.; ENGELSMAN, G.; SCHOLZ, K.E. y WEST, C.E. (1983) Casein-induced hypercholesterolemia in rabbits: distribution of cholesterol, triglycerides and phospholipids between serum and liver. Ann. Nutr. Metab. 27, 117-124.
- BEYNEN, A.C. y KATAN, M.B. (1985) Why do polyunsaturated fatty acids lower serum cholesterol. Am. J. Clin. Nutr. 42, 560-563.
- BEYNEN, A.C.; VAN DER MEER, R.; WEST, C.E.; SUGANO, M. y KRITCHEVSKY, D. (1986) Possible mechanisms underlying the differential cholesterolemic effects of dietary casein and soy protein. En: "Nutritional effects on cholesterol metabolism". Beynen, A.C. ed. Transmondial, Voorthuizen. pp. 29-45.
- BEYNEN, A.C. (1990) Mode of cholesterolemic action of dietary proteins. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, pp. 153-159.
- BLIGH, E.G. y DYER, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.
- BOCHENEK, W. y RODGERS, J.B. (1978) Effects of saturated and unsaturated fats given with and without dietary cholesterol on hepatic cholesterol synthesis and hepatic lipid metabolism. Biochim. Biophys. Acta. 528, 1-16.
- BONANOME, A. y GRUNDY, S.M. (1988) Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. N. Engl. J. Med. 318, 1244-1248.
- BORTZ, W.M. (1973) On the control of cholesterol synthesis. Metabolism. 22, 1507.
- BRADLEY, W.A.; HWANG, S.L.C.; KARLIN, J.B.; LIN, A.H.; PRASAD, S.C.; GOTTO, A.M. Jr y GIANTURCO, S.H. (1984) Low density lipoprotein receptor binding determinants switch from apolipoprotein E to apoprotein B during conversion of hypertriglyceridemic very low density lipoproteins to low density lipoproteins. J.

Biol. Chem. 259, 14728-14735.

-BRECKENRIDGE, W.C.; LITTLE, J.A.; STEINER, G.; CHOW, A. y POAPST, M. (1978) Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. N. Engl. J. Med. 298, 1265.

-BRONGEEST-SCHOUTE, H.C.; VAN GENT, C.M.; LUTEN, J.B. y RUITER, A. (1981) The effect of various intakes of omega 3 fatty acids on the blood lipid composition in healthy human subjects. Am. J. Clin. Nutr. 34, 1752-1757.

-BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L.; FREDRICKSON, D.S. (1983) Familial type 3 hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia). En: "The metabolic basis of inherited disease". Stanbury, J.B.; Wyngaarden, J.B.; Fredrickson, D.S.; Goldstein, J.L. y Brown, M.S. eds. McGraw-Hill. New York. Chapter 32.

-BROWN, M.S. y GOLDSTEIN, J.L. (1984) How L.D.L. receptors influence cholesterol and atherosclerosis. Sci. Amer. 251, 52-60.

-BRUCKNER, G.G.; LOKESH, B.; GERMANM, B. y KINSELLA, J.E. (1984) Biosynthesis of prostanoids, tissue fatty acid composition and thrombotic parameters in rats fed diets enriched with docosahe-xaenoic or eicosapentaenoic acid. Thromb. Res. 34, 479- 497.

-CANELLA, M. y COOPER, A.D. (1979) High affinity binding of chylomicron remnants to rat liver plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 338.

-CARROLL, K.K. (1982) Hypercholesterolemia and atherosclerosis, effect of dietary protein. Fed. Proc. 41, 2792-2796.

-CAVA, F. (1986) Inducción de hipercolesterolemia en ratas. Su prevención mediante consumo de sardinas fritas en aceite de oliva. Tesina. Facultad de Farmacia. U.C.M.

-CARLSON, L.A. y BALLANTYNE, D. (1976) Changing relative proportion of apolipoprotein C-II and C-III of very low density lipoprotein in hypertriglyceridemia. Atherosclerosis. 23, 563-568.

-CHAJEK, T. y EISENBERG, S. (1978) Very low density lipoprotein metabolism of phospholipids, cholesterol and apolipoprotein C in the isolated perfused rat heart. J. Clin. Invest. 75, 4519.

-CHAPMAN, M.J. y MILLS, G.L. (1977) Characterization of the serum lipoprotein and their apoproteins in hipercholesterolemic guinea pigs. Biochem. J. 167, 9-21.

-CHAO, Y.S.; YANIN, T.T. y ALBERTS, A.W. (1982a) Effects of cholestyramine on low density lipoprotein binding sites and liver membranes from rabbits with endogenous hypercholesterolemia induced by a wheat starch-casein diet. J. Biol. Chem. 257, 3623.

-CHAO, Y.S.; YANIN, T.T. y ALBERTS, A.W. (1982b) Catabolism of low density lipoproteins by perfused rabbit livers: cholestyrami-

ne promotes receptor-dependent hepatic catabolism of low density lipoproteins. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 79, 3983.

-CITTADINI, D.; PIETROPAOLO, C.; DE CRISTOFORO, D. y P'AYJELLO-CARACCILO, M. (1964) In vivo effect of L-Lysine on rat liver arginase. Nature (London), 203, 643-644.

-CODOCEO, R.; HERNANZ, A. y GASALLA, R. (1980) Determinación enzimática de ácidos y sales biliares por cromatografía en capa fina. Rev. Diag. Biol. 29, 345.

-CONNOR, W.E. (1986) Hypolipemic effects of dietary n-3 fatty acids in normal and hyperlipemic humans: effectiveness and mechanisms. En: "Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods". Simopoulos, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E. eds. Academic Press. New York, p. 173.

-CONNOR, W.E. y BRISTOW, J. eds (1985) Coronary heart disease prevention, complications and treatment. Lippincott. Philadelphia.

-COOK, H.W. y SPENCE, M.W. (1987) Interaction of (n-3) and (n-6) fatty acids in desaturation and chain elongation of essential fatty acids in cultured glioma cells. Lipids. 22, 613-619.

-COOPER, A.D. (1976) The regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the isolated perfused rat liver. J. Clin. Invest. 59, 1461.

-CORNWELL, D.G. y PANGANAMALA, R.V. (1981) Atherosclerosis: an intracellular deficiency in essential fatty acids. En: "Essential fatty acids and prostaglandins". Holman R.T., ed. Progress in lipid res. Pergamon Press. vol. 20.

-CROFT, K.D.; BEILIN, L.J.; VANDONGEN, R. y MATHEWS, E. (1984) Dietary modification of fatty acid and prostaglandin synthesis in the rat. Biochem. Biophys. Acta. 795, 196-207.

-CUESTA, C.; SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; RODRIGUEZ, A. y VARELA, G. (1987a) Alteraciones fisicoquímicas de un aceite de oliva empleado en frituras repetidas y su incidencia sobre la lipoproteinemia de ratas. Rev. Esp. Fisiol. 43, 51-56.

-CUESTA, C.; SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; RODRIGUEZ, A. y VARELA, G. (1987b) Effect on lipoproteinemia in rats fed diets containing either olive oil or a solid vegetable fat. Nutr. Rep. Int. 36, 483-489.

-DANIELSSON, H.; KALLES, I. y WIKVALL, K. (1984) Regulation of hydroxylations in biosynthesis of bile acids. J. Biol. Chem. 259, 4258-4262.

-DAVIS, R.A.; HYDE, P.M.; KUAN, J.W.; MALONE-McNEAL, M. y ARCHAMBAULT-SCHEXNAYDER, J. (1983) Bile acid secretion by cultured rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 258, 3661-3667.

- DE SCRIVVER, R. y PRIVETT, O.S. (1982) Effects of dietary long-chain on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in the rat. J. Nutr. 112, 619-626.
- DE WAEL, J.; RAAYMAKERS, C.E. y ENDEMAN, H.J. (1977) Simplified quantitative determination of total fecal bile acids. Clin. Chim. Acta. 79, 465-470.
- DEYKIN, D. y GOODMAN, D.S. (1962) The hydrolysis of long chain fatty acid esters of cholesterol with rat liver enzymes. J. Bio. Chem. 237, 3649.
- DOLPHIN, P.J. (1981) Serum and hepatic nascent lipoproteins in normal and hypercholesterolemic rats. J. Lipid: Res. 22, 971-989.
- DOMENECH, J.M. (1982) Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores. 4ª edición. Barcelona. pp. 394-397.
- DURAND, G.; PASCAL, G.; LEGRAND, Ph. et GOUNELLE DE PONTANEL, H. (1985) Effets compares d'huiles vegetales et d'huiles de poisson sur la cholesterolemie des rat. Relations entre la composition en acides gras des lipides de la ration, celle de lipides seriques et la cholesterolemie. Med. et Nut. XXI, 391-406.
- DYERBERG, J. (1986) Linolenate derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. Nutr. Rev. 44, 125-134.
- EDMOND, J. y POPJAK, G. (1974) Transfer of carbon atoms from mevalonate fatty acids. J. Biol. Chem. 249, 66.
- EDWARDS, P.A. (1973) Effect of adrenalectomy and hypophyrectomy on the circadian rhythm of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in rat liver. J. Biol. Chem. 248, 2912.
- EHNHOLM, C.; HUTTUNEN, J.K.; PIETINEN, P.; LEINO, V. y MUTANEN, M. (1984) Effect of a diet low in saturated fatty acids on plasma lipids, lipoproteins and H.D.L. subfractions. Arteriosclerosis. 4, 265-269.
- EISENBERG, S. y LEVY, R.I. (1976) Lipoprotein metabolism. Adv. Lipid. Res. 13, 1-80.
- EKLUND, A. y SJÖBLOM, L. (1980) Effects of the source of dietary protein on serum lower density lipoprotein (VLDL+LDL) and tocopherol levels in female rats. J. Nutr. 110, 2321-2335.
- EKLUND, A. y SJÖBLOM, L. (1986) Effect of dietary proteins on hepatic and plasma lipids, and some properties of mayor plasma lipoprotein fractions during dietary-induced hypercholesterolemia in male rats. Biochim. Biophys. Acta. 887, 127-134.
- ELLIOT, W.H. y HYDE, P.M. (1971) Metabolic pathways of bile acid synthesis. Am. J. Med. 51, 568.

- ERICKSON, S. y COOPER, A.D. (1980) Acyl-coenzyme A cholesterol acyltransferase in human liver. In vitro detection and some characteristics of the enzyme. Metabolism. 29, 991.
- ERICKSON, S.K.; SHEWSBURY, M.A.; BROOKS, C. y col. (1980) Rat liver acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase. Its regulation in vivo and some of its properties in vitro. J. Lipid. Res. 21, 930.
- FARBER, E. (1967) Ethionine fatty liver. Adv. Lipid. Res. 5, 119.
- FIELD, C.J.; ANGEL, A. y CLANDININ, M.T. (1985) Relationship of diet to the fatty acid composition of human adipose tissue structural and stored lipids. Am. J. Clin. Nutr. 42, 1206-1220.
- FIELD, F.J.; ALBRIGHT, E.J. y MATHUR, S.N. (1987) Effect of dietary n-3 fatty acids on HMG-CoA reductase and ACAT activities in liver and intestine of the rabbit. J. Lipid. Res. 28, 50-58.
- FIELDING, C.J. (1976) Lipoproteinlipase: evidence for high -and low- affinity enzyme sites. Biochemistry 15, 879.
- FIELDING, P.E.; SHORE, V.G. y FIELDING, C.J. (1977) Lipoprotein lipase, isolation and characterization of a second enzyme species from postheparin plasma. Biochemistry. 16, 1896.
- FIELDING, C.J. y HAVEL, R.J. (1977) Lipoprotein lipase: properties of the enzyme in solution. Arch. Pathol. Lab. Med. 101, 225-229.
- FINLEY, P.R.; SCHIFMAN, R.B.; WILLIAMS, J. y LICHTIL, D.D. (1978) Use of Mg²⁺ dextran-sulfate in its enzymatic measurements. Clin. Chem. 24, 931-933.
- FLATEN, H.; HOSTMARK, A.T.; KIERULF, P.; LYSTAD, E; TRYGG, K.; BJERKEDAD, T. y OSLAND, A. (1990) Fish-oil concentrate: effects on variables related to cardiovascular disease. Am. J. Clin. Nutr. 52, 300-306.
- FLOREN, C.H. y NILSSON, A. (1977) Effects of fatty acid unsaturation on chylomicron metabolism in normal and hepatectomized rats. Eur. J. Biochem. 77, 23-30.
- FOLCH, J.; LEES, M. y SLOANE-STANLEY, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of the total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 266, 497-509.
- GALLI, C.; AGRADI, E. y PETRONI, A. (1981) Differential effects of dietary fatty acids on the acumulation of arachidonic acid and its metabolic conversion in platelets and vascular tissue. Lipids. 16, 165-170.
- GARG, M.L.; SMSWELL, A.M. y SABINE, J.R. (1986) Influence of dietary cholesterol on desaturase enzymes of rat liver microsomes. Prog. Lipid Res. 25, 639-644.

- GARG, M.L.; THOMSON, A.B.R. y CLANDININ, H.T. (1988a) Effect of dietary cholesterol and/or w-3 fatty acids on lipid composition and delta 5-desaturase activity of rat liver microsomes. J. Nutr. 118, 661-668.
- GARG, M.L.; SEBOKOVA, E.; THOMSON, A.B.R. y CLANDININ, H.T. (1988b) Delta 5-desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or w-3 fatty acids. Biochem. J. 249, 351-356.
- GARG, A.; BONANOME, A.; GRUNDY, S.M.; ZHANG, Z.J. y UNGER, R.H. (1988c) Comparison of a high-carbohydrate diet with a high-monounsaturated fat diet in patients with non-insulindependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 319, 829-864.
- GAVIGAN, S.J.P. y KNIGHT, B.L. (1981) Catabolism of low density lipoprotein by fibroblasts cultured in medium supplemented with saturated or unsaturated free fatty acids. Biochem. Biophys. Acta. 665, 632-635.
- GERMAN, B.; BRUCKNER, G. y KINSELLA, J.E. (1986) Effects of increasing dietary fish oil on tissue lipids and prostaglandin synthesis in the rat. Nutr. Res. 5, 1393-1398.
- GIANTURCO, S.M.; GOTTO, A.M. Jr, HWANG, S.L.C.; KARLIN, J.B.; LIN, A.H.Y.; PRASAD, S.C. y BRADLEY, W.A. (1983) Apolipoprotein E mediates uptake of sf 100-400 hypertriglyceridemic very low density lipoproteins by the low density lipoprotein receptor pathway in normal human fibroblasts. J. Biol. Chem. 258, 4526-4533.
- GOH, E.H. y HEIMBERG, M. (1977) Effects of free fatty acids on activity of hepatic microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and on secretion of triglyceride and cholesterol by liver. J. Biol. Chem. 252, 2822.
- GOMEZ, A. (1988) Metabolismo de las lipoproteinas. En: "Lipoproteinas plasmáticas". Boehringer Mannheim, S. A. Barcelona. 47-58.
- GOODMAN, D.S.; DEYKIN, D. y SHIRATORI, T. (1964) The formation of cholesterol esters with rat liver enzymes. J. Biol. Chem. 239, 1335.
- GOULD, R.G.; BELL, V.L. y LILLY, E.H. (1959) Stimulation of cholesterol biosynthesis from acetate in rat liver and adrenals by whole body x-irradiation. Am. J. Physiol. 196, 1231.
- GRANDE, F. (1989) "Introduccion". En "Dietary fats and cardiovascular disease. A colloquium". Comission of the European Communities. Sevilla. 30 de mayo. pp. 1.
- GREEN, P.H.R.; GLICKMAN, R.M.; SAUDEK, C.D.; BLUM, C.B. y TALL, A.P. (1979) Human intestinal lipoprotein-studies in chyluric subjects. J. Clin. Invest. 64, 233.

- GREEN, M.H. y GREEN, J.B. (1983) Effects of dietary fat saturation and triglyceride and cholesterol load on lipid absorption in the rat. Atherosclerosis. 46, 181-194.
- GREEN, M.H.; MASSARO, E.R. y GREEN J.B. (1984) Multicompartamental analysis of the effects of dietary fat saturation and cholesterol on absorptive lipoprotein metabolism in the rat. Am. J. Clin. Nutr. 40, 82-94.
- GRUNDY, S.M. (1986) Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. N. Engl. J. Med. 314, 745-748.
- GRUNDY, S.M. (1987) Monounsaturated fatty acids, plasma cholesterol and coronary heart disease. Am. J. Clin. Nutr. 45, 1168-1175.
- GRUNDY, S.M. y DENKE, M.A. (1990) Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. J. Lipid. Res. 31, 1149-1172.
- GRUNDY, S.M.; FLORENTIN, L.; NIX, D. y WHELAN, M.F. (1988) Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for reducing raises levels of plasma cholesterol in man. Ann. J. Clin. Nutr. 47, 965-969.
- GRUNDY, S.M. y VEGA, G.L. (1988) Plasma cholesterol responsiveness to saturated fatty acids. Ann. J. Clin. Nutr. 47, 822-824.
- GUO, L.S.; HAMILTON, R.L.; OSTWALD, R. y HAVEL, R.J. (1982) Secretion of nascent lipoproteins and apolipoproteins by livers of normal and cholesterol-fed guinea pigs. J. Lipid. Res. 23, 543-555.
- HA, Y.C.; CALVERT, G.D.; McINTOSH, C.H. y BARTER, P.J. (1981) A physiologic role for the esterified cholesterol transfer protein: in vivo studies in rabbits and pigs. Metabolism. 30, 380.
- HAMAZAKI, T.; HIRAI, A.; TERANO, T.; SAJIKI, J.; KONDO, S.; FUJITA, T.; TAMURA, Y. y KUMAGAI, A. (1982) Effects of orally administered ethylester of eicosapentaenoic acid on PGI₂-like substance production by rat aorta. Prostaglandins. 23 (4), 557-567.
- HAMILTON, R.J. (1986) Thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. En "Analysis of oils and fats". Hamilton R.J. y Rossell J.B. eds. Elsevier Applied Science Publishers LTD. Essex. pp. 243-267.
- HAMPRECHT, B.; ROSCHER, R.; WALTINGER, G. y col. (1971) Influence of bile acids on the activity of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. 2. Effect of cholic acid in lymph fistula rats. Em. J. Biochem. 18, 15.
- HARRIS, W.S.; CONNOR, W.E. y McMURRY, M.P. (1983) The comparative reduction of the plasma lipids and lipoproteins by dietary

polyunsaturated fats: Salmon oil versus vegetable oils. Metabolism. 32, 179-184.

-HARRIS, W.S.; CONNOR, W.E.; INKELES, S.B. y ILLINGWORTH, D.R. (1984) Dietary omega-3 fatty acids prevent carbohydrate induced hypertriglyceridemia. Metabolism. 33, 1016-1019.

-HARWOOD, H.J. y GEYER, R.P. (1975) Properties and fatty acid composition of fats and oils. En: Lipids, Carbohydrates, Steroids. 3rd ed. Fasmas G.D. (ed.). CRC PRESS. Cleveland (Ohio).

-HASSAN, A.S.; HACKLEY, J.J. y JEFFERY, E. (1984) Role of glutathione in the regulation of hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase, the rate-limiting enzyme of bile acid biosynthesis. Steroids. 44, 373-380.

-HAVEEL, R.J.; KANE, J.P. y KASHYAP, M.L. (1973) Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. J. Clin. Invest. 52, 32-38.

-HERNANDEZ, I. (1989) Tecnología de la fritura: evaluación de la termoxidación de un aceite de oliva empleado en frituras de patatas. Tesina de licenciatura. Facultad de Farmacia. U.C.M.

-HEROLD, P.M. y KINSELLA, J.E. (1986) Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of finding from animal and human feeding trials. Am. J. Clin. Nutr. 43, 566-598.

-HIGGINS, J.A. y FIELDSEND, J.K. (1987) Phosphatidylcholine synthesis for incorporation into membrane or for secretion as plasma lipoproteins by Golgi membranes of rat liver. J. Lipid. Res. 28, 268-278.

-HIGON, E. (1985) Consumo de aceites y oleonilidas. Influencia sobre la composición del tejido adiposo de rata. Tesina. Facultad de Farmacia. U.C.M.

-HIGON, E.; SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; CAVA, F. y VIEJO, J. (1987) Sardinias fritas en aceite de girasol y oliva en la prevención de hipercolesterolemia experimental. III Reunión Latina de Investigación Vascular. Alcalá de Henares, 29 de noviembre-2 de diciembre.

-HORNSTRA, G. (1989) Influence of dietary fish oils on arterial thrombosis and atherosclerosis in animals model and in man. J. Intern. Med. 225, 53-60.

-HOSTMARK, A.T.; SPYDEVOLD, O.L y EILERTSEN, E. (1980) Plasma lipid concentration and liver output of lipoproteins in rats fed coconut fat or sunflower oil. Artery, 367-383.

-HOSTMARK, A.T.; SPYDEVOLD, O. y LYSTAD, E. (1982) Plasma high density lipoprotein subgroup distribution in rats fed diets with varying amounts of sucrose and sunflower oil. Lipids. 17, 489-

-HUANG, Y.S.; NASSAR, B.A. y HORROBIN, D.F. (1986) Change of plasma lipids and long-chain n-3 and n-6 fatty acids in plasma, liver, heart and kidney phospholipids of rats fed variable levels of fish oil with or without cholesterol supplementation. Biochim. Biophys. Acta. 879, 22-27.

-HUANG, Y.S. y HORROBIN, D.F. (1987) Effect of dietary cholesterol and polyunsaturated fat on plasma and liver lipids in guinea pig. Ann. Nutr. Metab. 31, 18-28.

-HUANG, Y.S.; MITCHELL, J.; McADOO, K. y HORROBIN, D.F. (1987) Effect of lysine supplementation to wheat gluten on plasma and liver cholesterol and fatty acids in growing rats. Biochem. Arch. 3, 285-293.

-HUANG, Y.S.; WATANABE, Y.; HORROBIN, D.F. y SIMMONS, V. (1990) The effects of dietary protein and cholesterol on tissue cholesterol contents and n-6 fatty acid composition in rats and mice fed a gamma-linolenate-rich diet. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, pp. 11-26.

-HUBBARD, R.W. y SANCHEZ, A. (1990) Dietary protein control of serum cholesterol by insulin and glucagon. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, 139-147.

-HUFF, M.W.; HAMILTON, R.M.G. y CARROLL, K.K. (1977) Plasma cholesterol levels in rabbits fed low fat, cholesterol-free, semipurified diets: effects of dietary proteins, protein hydrolysates and amino acid mixtures. Atherosclerosis. 28, 187.

-HUFF, M.W. y CARROLL, K.K. (1980a) Effects of dietary protein on turnover, oxidation and absorption of cholesterol and on steroid excretion in rabbits. J. Lipid: Res. 21, 546-558.

-HUFF, M.W. y CARROLL, K.K. (1980b) Effect of dietary protein and amino acid mixtures on plasma cholesterol levels in rabbits. J. Nutr. 110, 1676-1685.

-HUFF, M.W.; ROBERTS, D.C.K. y CARROLL, K.K. (1982) Long-term effects of semipurified diets containing casein or soy protein isolate on atherosclerosis and plasma lipoproteins in rabbits. Atherosclerosis. 41, 327.

-HUI, D.Y.; INNERARITY, T.L. y MAHLEY, R.W. (1981) Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolically distinct apo-E and apo-B,E receptors. J. Biol. Chem. 256, 5646-5655.

-HWANG, D.H.; BOUDREAU, M. y CHANMUGAM, P. (1988) Dietary linolenic acid and longer-chain n-3 fatty acid: comparison of effects on arachidonic acid metabolism in rats. J. Nutr. 118, 427-437.

- ILLINGWORTH, D.R.; HARRIS, W.S. y CONNOR, W.E. (1984) Inhibition of low density lipoprotein synthesis by dietary omega-3 fatty acids in humans. Arteriosclerosis. 4, 270-275.
- IMAIZUMI, K.; MAWATARI, K.; MURATA, M.; IKEDA, I. y SUGANO, M. (1983) The contrasting effects of dietary phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine on serum lipoproteins and liver lipids in rat. J. Nutr. 113, 2403-2411.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA (ed) (1985) Encuesta de presupuestos familiares, 1980-1981. Estudios sobre la nutrición INE. Artes gráficas. Madrid, 155-209.
- IRITANI, N.; INOGUCHI, K.; ENDO, M.; FUKUDA, E. y MORITA, M. (1980) Eicosapentaenoic acid inhibits cholesterol esterification in cultured parenchymal cells and isolated microsomes from rat liver. J. Biol. Chem. 203, 8126-8132.
- IRITANI, N. y FUJIKAWA, S. (1982) Competitive incorporation of dietary w-3 and w-6 polyunsaturated fatty acids into the tissue phospholipids in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 29, 11-21.
- IRITANI, N. y NORITA, R. (1984) Changes of arachidonic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids of phospholipid classes in liver, plasma, and platelets during dietary fat manipulation. Biochem Biophys. Acta. 793, 441-447.
- JACQUES, H.; DESHAIES, Y. y SAVOIE, L. (1986) Relationship between dietary proteins, their in vitro digestion products, and serum cholesterol in rats. Atherosclerosis. 61, 89-98.
- JACQUES, H.; DESHAIES, Y. y SAVOIE, L. (1988) Relationship between dietary tyrosine and plasma cholesterol in the rat. Can. J. Physiol. Pharmacol. 66, 1023-1027.
- JANERO, D.R.; SUITA-MANGANO, P.; MILLER, K.W. y LANE, M.D. (1984) Synthesis, processing and secretion of hepatic very low density lipoproteins. J. Cell. Biochem. 24, 131-151.
- JOHNSON, M.R.; MATHUR, S.N.; COFFMAN, C. y SPECTOR, A.A. (1983) Dietary fat saturation and hepatic acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity. Effect on n-3 polyunsaturated and long-chain saturated fat. Arteriosclerosis. 3, 242-248.
- JOHNSON, F.L.; ST. CLAIR, F.W. y RUDEL, L.L. (1983) Studies of the production of low density lipoproteins by perfused livers from nonhuman primates. Effects of dietary cholesterol. J. Clin. Invest. 72, 221-236.
- KANE, J.P.; HARDMAN, D.A. y PAULUS, H.E. (1980) Heterogeneity of apolipoproteins B; isolation of a new species from human chylomicrons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 2465-2469.
- KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.P.; GORDON, T. y McNAMARA, P.M. (1971) Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham Study. Ann. of internal Med. 74,

1-12.

-KASHYAP, M.L.; BARNHART, R.L.; SRWASTAVA, L.S.; PERISUTTI, G.; ALLEN, C.; HOGG, E.; GLUECK, C.J. y JACKSON, R.L. (1983) Alimentary lipemia, plasma high-density lipoproteins and apolipoproteins C-II and C-III in healthy subjects. Am. J. Clin. Nutr. 37, 233-243.

-KATAN, M.B.; VROOMEN, L.H.M. y HERMUS, R.J.J. (1982) Reduction of casein-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in rabbits and rats by dietary glycine, arginine and alanine. Atherosclerosis. 43, 381.

-KEKKI, M. (1980) Lipoprotein lipase action determining plasma high density lipoprotein cholesterol in adult normolipemics. Atherosclerosis. 37, 3-50.

-KEYS, A.; ANDERSON, J.T. y GRANDE, F. (1957) Prediction of serum cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. Lancet. 2, 959-966.

-KIMURA, N. (1983) Changing patterns of coronary heart disease, stroke and nutrient intake in Japan. Prev. Med. 12, 222-229.

-KIMURA, N.; CHIANG, M.T. y FUJIMOTO, H. (1990) Effects of eicosapentaenoic acid and soybean protein on plasma cholesterol, blood pressure and platelet aggregation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, pp. 26-35.

-KINSELLA, J.E. (1987) The effects of dietary n-3 PUFAS of fish oil on serum lipids, eicosanoids and thrombotic events: observations from animal feeding trials. En: "Seafoods and fish oils in human health and disease". MARCEL DEKKER, INC. New York. pp. 107-164.

-KINSELLA, J.E.; LOKESH, B.; CROSET, M.; BLACK, M. y SURELTE, M. (1990a) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids: effects on membrane enzyme activities and macrophage eicosanoid synthesis. En: "Health effects of fish and fish oils". Chandra, R. ed. St John' New foudland Press. St John.

-KINSELLA, J.E.; LOKESH, B. y STONE, R.A. (1990b) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. Am. J. Clin. Nutr. 52, 1-28.

-KISSEBAH, A.H.; ALFARSI, S. y EVANS, D.J. (1984) Low density lipoprotein metabolism of apolipoprotein B in familial combined hyperlipidemia. Arteriosclerosis. 4, 614-624.

-KLEIN, R.L. y RUDEL, L.L. (1983) Effect of dietary cholesterol level on the composition of thoracic duct lymph lipoproteins isolated from non-human primates. J. Lipid. Res. 24, 357-367.

-KOBATAKE, Y.; HIRAHARA, F.; INNAMI, S. y NISHIDE, E. (1983)

Dietary effect of w-3 type polyunsaturated fatty acids in serum and liver lipid levels in rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 29, 11-21.

-KOVANEN, P.T.; BROWN, M.S.; BARN, S.K.; BILHEIMEN, D.W. y GOLDSTEIN, J.L. (1981) Saturation and suppression of hepatic lipoprotein receptors: a mechanism for the hypercholesterolemia of cholesterol-fer rabbits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 1396-1400.

-KREMER, J.M y ROBINSON, D.W. (1991) Studies of dietary supplementation with n-3 fatty acids in patients with rheumatoid arthritis. World Rev. Nutr. Diet. 66, 367-382.

-KRAUS, R.M.; HERBERT, P.N.; LEVY, R.I. y FREDICKSON, D.S. (1973) Further observations of the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. Circ. Res. 33, 403-411.

-KRIS-ETHERTON, P.M., y COOPER, A.D. (1980) Studies on the etiology of the hyperlipemia in rats fed on atherogenic diet. J. Lipid. Res. 21, 435-442.

-KRIS-ETHERTON, P.M.; HO, C.Y. y FOSMIRE, M.A. (1984) The effect of dietary fat saturation on plasma and hepatic lipoproteins in the rat. J. Nutr. 114, 1675-1682.

-KRITCHEVSKY, D. (1979) Vegetable protein and atherosclerosis. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 56, 135.

-KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S.A.; CZARNECKI, S.K. y KLURFELD, D.M. (1982) Atherogenicity of animal and vegetable protein- influence of the lysine to arginine ratio. Atherosclerosis. 41, 429.

-KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S.A.; KIM, H.K.; MOSES, D.E. y STORY, J.A. (1975) Experimental atherosclerosis in rabbits fed cholesterol-free diets. Part 4. Investigation into the source of cholesterolemia. Exp. Molec. Pathol. 22, 11-19.

-KURATA, N. y PRIVETT, O.S. (1980) Effect of dietary fatty acid composition on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in rat liver microsomes. Lipids. 15 (7), 512-518.

-LAKSHMAN, M.R.; CHIRTEL, S.J. y CHAMBERS, L.L. (1988) Roles of w-3 fatty acids and chronic ethanol in the regulation of plasma and liver lipids and plasma apoproteins A and E in rats. J. Nutr. 118, 1299-1303.

-LANDS, W.E.M. (1986) Fish and human health. Academic Press, INC. Orlando.

-LANDS, W.E.M. (1987) Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL.

-LAROSA, J.C.; LEVY, J.I.; HERBERT, P.N.; LUX, S.E. y FREDRICKSON, D.S. (1970) A specific apoprotein activates for lipoprotein lipase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 57-62.

-LEFEVRE, M. y SCHNEEMAN, B.O. (1984) High density lipoprotein composition in rats fed casein or soy protein isolate. J. Nutr. 114, 768-777.

-LIN, D.S. y CONNOR, W.E. (1990) Are the n-3 fatty acids from dietary fish oil deposited in the triglyceride stores of adipose tissue?. Am. J. Clin. Nutr. 51, 535-539.

-LOCK, D.R.; VARHOL, A.; GRIMES, S.; PATSCH, W. y SCHONFELD, G. (1983) Apo A-I/Apo A-II ratios in plasma of vegetarians. Metabolism. 32, 1142-1145.

-LOPEZ-ESPINOZA, I.; HOWARD-WILLIAMS, J.; MANN, J.I.; CARTER, R.D. y HOCKDAY, T.D.R. (1984) Fatty acid composition of platelet phospholipids in non-insulin-dependent diabetics randomized for dietary advice. Br. J. Nutr. 52, 41-47.

-LOSCALZO, J.; FREDMAN, J.; RUDD, R.M.; BARSKYVASSERMAN, I. y VAUGHAN, D.E. (1987) Unsaturated fatty acids enhance low density lipoprotein uptake and degradation by peripheral blood mononuclear cells. Arteriosclerosis. 7, 450-455.

-LOVATI, M.R.; MANZONI, C.; CANAVERI, A.; SIRTORI, M., VACCARINO, V.; MARCHI, M.; GADDI, G. y SIRTORI, C.R. (1987) Soybean protein diet increases low density lipoprotein receptor activity in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients. J. Clin. Invest. 80, 1498.

-LOVATI, M.R.; WEST, C.E.; SIRTORI, C.R. y BEYNEN, A.C. (1990) Dietary animal proteins and cholesterol metabolism in rabbits. Br. J. Nutr. 64, 473-485.

-LOZANO, C. (1985) Hiperlipemias. En: " Enfermedades del metabolismo". Colección Pregrado. 2ª edición. Madrid. pp. 139-168.

-MAHLEY, R.W. (1982) Atherogenic hyperlipoproteinemia. the cellular and molecular biology of plasma lipoproteins altered by dietary fat and cholesterol. Med. Clin. North. Am. 66, 375-402.

-MAHLEY, R.W. y HOLCOMBE, K.S. (1977) Alterations of the plasma lipoproteins and apoproteins following cholesterol feeding in the rat. J. Lipid. Res. 18, 314-324.

-MAHLEY, R.W.; WEISGRABER, K.M. y INNERARITY, T. (1974) Canine lipoproteins and atherosclerosis II. Characterization of the plasma lipoproteins associated with atherogenic and non-atherogenic hyperlipemia. Circ. Res. 35, 722.

-MAI, J.; SHIMP, J.; WEIHRAUCH, J. y KINSELLA, J. (1978) Lipids of fish fillets: changes following cooking by different methods. J. Food Science. 43, 1669.

-MATTSON, F.H. y GRUNDY, S.M. (1985) Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. J. Lipid. Res.

26, 194-202.

-McCANCE y WIDDOWSON'S (1978) The composition of foods. Paul A.A. y Southgate D.A.T. eds. 4ª ed. Elsevier/North-Holland Boomedical Press. London. p. 17.

-MEDINA SAN NICOLAS, R. (1986) Cambios y posibles interacciones entre las grasas de fritura y del interior del alimento, durante el proceso de frituras repetidas de un pescado azul. Tesina. Facultad de Farmacia. U.C.M.

-MENSINK, R.P.; DE GROOT, M.J.M.; VAN DEN BROEKE, L.T.; SERVRIJ-NEN-NOBELS, J.P.; DEMACKER, P.N.M. y KATAN, M.B. (1989) Effects of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on serum lipoproteins and apoproteins in healthy men and women. Metabolism. 38, 172-178.

-MENSINK, R.P. y KATAN, M.B. (1987) Effect of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on high-density lipoproteins in healthy men and women. Lancet. 1, 122-125.

-METCALFE, L.V.; SCHMITZ, A.A. y PELKA, J.R. (1966) Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem. 38, 514-515.

-MILLER, G.E. y MILLER, N.E. (1975) Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. Lancet. 1, 16-19.

-MONTES, A.; HUMPHREY, J.; KNOPP, R. y TOLBERT, M. (1978) Lipid metabolism in Pregnancy. VI. Lipoprotein composition and hepatic lipids in the fed pregnant rat. Endocrinology. 103, 1031-1037.

-MOREIRAS-VARELA, O.; RUIZ-ROSO, B. y VARELA, G. (1988) Effects of frying on the nutritive value of food. En "Frying of food. Principles, changes, new approaches". Ellis Horwood, Chichester, England, pp. 93-102.

-MORISAKI, N.; SHINOMIYA, M.; MATSUOKA, N.; SAITO, Y. y KUMAGAI, A. (1983) In vivo effects of cis-5, 8, 11, 14, 17- 20:5 (n-3) and cis-4, 7, 10, 13, 16, 19- 22:6 (n-3) on serum lipoproteins, platelet aggregation and lipid metabolism in the aorta of rats. Tohoku J. Exp. Med. 141, 397-405.

-MORTON, I.D. (ed.) (1977) Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing. Ed. Applied Science Publishers Lmtd. London.

-MOSBACH, E.H. (1972) Hepatic synthesis of bile acids. Arch. Intern. Med. 130, 478.

-MURAMATSU, K. y SUGIYAWA, K. (1990) Relationship between amino acid composition of dietary protein and plasma cholesterol level in rats. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, pp. 97-109.

- MYANT, N.B. y MITROPOULOS, K.A. (1977) Cholesterol 7-alfa-hidroxiylase. J. Lipid. Res. 18, 135.
- NAGATA, Y.; TANAKA, K. y SUGANO, M. (1981) Further studies on the hypocholesterolaemic effect of soya-bean protein in rats. Br. J. Nutr. 45, 233-241.
- NAGAOKA, S.; MASAKI, H.; AOYAWA, Y. y YOSHIDA, A. (1986) Effect of excess dietary tyrosine or certain xenobiotics on the cholesterologenesis in rats. J. Nutr. 116, 726-732.
- NAIM, M.; MORLEY, R.; KARE, H. y INGLE, E.D. (1977) Sensory factors which affect the acceptance of raw and heated deffated soybeans by rat. J. Nutr. 109, 1653-1658.
- NAWAR, W.W. (1984) Chemical changes in lipids produced by thermal processing. J. Chem. Education 61, 4, 229-302.
- NESTEL, P.J.; REARDON, M. y BILLIGTON, T. (1979) In vivo transfer of cholesteryl ester from high density lipoproteins to very low density lipoproteins in man. Biochem. Biophys. Acta. 573, 403.
- NESTEL, P.J. (1986) Fish oil attenuates the cholesterol induced rise in lipoprotein cholesterol. Am. J. Clin. Nutr. 43, 752-757.
- NESTEL, P.J. (1987) Polyunsaturated fatty acids (n-3, n-6). Am. J. Clin. Nutr. 45, 1161-1167.
- NESTEL, P.J. (1990) Effect of n-3 fatty acids on lipid metabolism. Annu. Rev. Nutr. 10, 149-167.
- NESTEL, P.J. (1991) Review: fish oil and cardiac function. World Rev. Nutr. Diet. 66, 268-277.
- NESTEL, P.J.; CONNOR, W.E.; REARDON, M.F.; CONNOR, S.; WONG, S. y BOSTON, R. (1984) Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. J. Clin. Invest. 74, 82-89.
- NESTEL, P.J.; WONG, S. y TOPPING, D.L. (1986) Dietary long chain polyenoic fatty acids suppression of triglyceride formation in rat liver. En: "Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods". Simopoulos, A.P.; Kifer, R.R. y Martin, R.E. eds. Academic Press. New York, pp. 211-218.
- NERVI, F.O. y DIETSCHY, J.M. (1978) The mechanisms of and the interrelationship between bile acid and chylomicron-mediated regulation of hepatic cholesterol synthesis in the liver of the rat. J. Clin. Invest. 61, 895.
- NICHOLS, A.V; GONG, E.L. y BLANCHE, P.L. (1981) Interconversion of high density lipoproteins during incubation of human plasma. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 391.
- NICOLASI, R.J. y HAYES, K.C. (1980) Composition of plasma and

nascent very low density lipoprotein from perfused livers of hypercholesterolemic squirrel monkeys. Lipids. 15, 549-554.

-NICOLASI, R.J.; STTUCHI, A.F.; KOWALA, M.C.; HENNESSY, L.K.; HEGSTED, D.M. y SHAEFER, E.J. (1990) Effect of dietary fat saturation and cholesterol on LDL composition and metabolism. Arteriosclerosis. 10, 119-129.

-NIKKILÄ, E.A. (1978) Metabolic regulation of plasma high density lipoproteins concentration. Eur. J. Clin. Invest. 8, 111-113.

-NOEL, S.P.; WONG, L.; DOLPHIN, P.J.; DORY, L. y RUBENSTEIN, D. (1979) Secretion of cholesterol-rich lipoproteins by perfused livers of hypercholesterolemic rats. J. Clin. Invest. 64, 674-683.

-NORUM, K.R.; BERG, T.; HELGERUD, P. y DREVON, C.A. (1983) Transport of cholesterol. Physiol. Rev. 63, 1343-1419.

-NOSSEN, J.; RUSTAN, A.C.; GLOPPESTAD, S.H.; MALBAKKEN, S. y DREVON, C.A. (1986) Eicosapentaenic acids inhibits synthesis and secretion of triacylglycerols by cultured rat hepatocytes. Biochim. Biophys. Acta. 879, 56-65.

-OCHI, K.; YOHIMOTO, T. y YANAMOTO, S. (1983) Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes: activation by adenosine 5'-triphosphate. J. Biol. Chem. 258, 5754-5758.

-OH, S.H. y MONACO, P.A. (1985) Effect of dietary cholesterol and degree of fat insaturation on plasma lipids levels, lipoprotein composition, and fecal steroid excretion in normal young adult men. Am. J. Clin. Nutr. 42, 399-413.

-OLSEN, P.; MEYER, O.; BILLE, N. y WÜRTZEN, G. (1986) Carcinogenicity study on butylated hydroxytoluene (B.H.T.) in Wistar rats exposed in utero. Fd Chem. Toxic. 24, 1-12.

-ORAM, J.F.; ALBERTS, J.J.; CHEUNG, M.C. y BIERMAN, E.L. (1981) The effects of subfractions of high density lipoproteins on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. Regulation of low density lipoprotein receptor activity. J. Biol. Chem. 256, 8348.

-OYA, M. MATA, P., ALVAREZ-SALA, D.A. y RUBIO, M.J. (1989) Efecto sobre las lipoproteínas plasmáticas en dietas ricas en aceite de oliva o ricas en aceite de girasol. En "Dietary fats and cardiovascular disease. A colloquium". Comission of the European Communities. Sevilla. 30 de mayo. pp. 6-8.

-PAGANI, R. (1978) Bioquímica de desarrollo en insectos. Recambio de clases de lípidos en el diptero Ceratitis Capitata. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. U.C.M.

-PARKS, J.S. y BULLOCK, B.C. (1987) Effect of fish oil versus lard diets on the chemical and physical properties of low density lipoproteins of nonhuman primates. J. Lipid. Res. 28, 173-182.

- PARKS, J.S. y RUDELL, L.L. (1982) Different kinetic fates of apolipoproteins A-I and A-II from lymph chylomicra of nonhuman primates. Effect of saturated versus polyunsaturated dietary fat. J. Lipid. Res. 23, 410-421.
- PARKS, J.S.; WILSON, M.D.; JOHNSON, F.L. y RUDELL, L.L. (1989) Fish oil decreases hepatic cholesteryl ester secretion but not apo-B secretion in African green monkeys. J. Lipid. Res. 30, 1535-1544.
- PATSH, R.J.; GOTTO, A.M. Jr; OLIVECRONA, T. y EISENBERG, S. (1978) Formation of high density lipoprotein 2 like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4519.
- PHILLIPSON, B.E.; ROTHROCK, D.W.; CONNOR, W.E.; HARRIS, W.S. y ILLINGWORTH, D.R. (1985) Reduction of plasma lipids, lipoproteins and apoproteins by dietary fish oils in patients with hypertriglyceridemia. N. Engl. J. Med. 312(19), 1210-1219.
- POKORNY, J. (1980) Effects of substrates of change of fats and oil during frying. Rev. Ital. delle sostanze grasse. Vol. LVII, 222-225.
- POTTEAU, B.; LHUISIER, M.; LE CLERC, J.; CUSTOF, F. y MEZONNET, B. (1978) Recherches sur le composition et les effets physiologiques de l'huile de soja chauffée et les différents fractions obtenus a partir de cette huile. Rev. Franç. Corps. Gras. 17, 234-245.
- QUAZI, S.; YOKOGOSHI, H. y YOSHIDA, A. (1983) Effect of dietary fiber on hypercholesterolemia induced by dietary PCB or cholesterol in rats. J. Nutr. 133, 1109-1118.
- QUAZI, S.; TAKAHATA, M.; HORIO, F. y YOSHIDA, A. (1984) Hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaril coenzyme A reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities in rats fed PCB. Nutr. Rep. Int. 30, 617-627.
- RAJARAM, D.V.; WHITE, G.H. y BARTER, P.J. (1980) Partial purification and characterization of a triacylglycerol-transfer protein from rabbit serum. Biochem. Biophys. Acta. 617, 383.
- RIFICI, V.A. y EDER, H.A. (1984) A hepatocyte receptor for high-density lipoproteins specific for apoprotein AI. J. Biol. Chem. 259, 13814-13818.
- RIFKIND, B.M. (1983) Nutrient high-density lipoprotein relationships: an overview. Prog. Biochem. Pharmacol. 19, 89-109.
- ROACH, P.D.; KAMBOURIS, A.M.; TRIMBLE, R.P.; TOPPING, D.L. y NESTEL, P.J. (1987) The effects of dietary fish oil on hepatic high density and low density lipoprotein receptor activities in the rat. FEBS lett. 222, 159-162.
- ROBERTS, D.C.K.; STALMACH, M.E.; KHALIL, M.W.; HUTCHINSON, J.C.

y CARROLL, K.K. (1981) Effects of dietary protein on composition and turnover of apoproteins in plasma lipoproteins of rabbits. Can. J. Biochem. 59, 642-647.

-RODRIGUES, P.O.; FONG, B. y ANGEL, A. (1987) Caracterizaçao dos receptores celulares para as LDL em adipocitos humanos. Atheroma. 6, 10-20.

-RODRIGUEZ, J.L.; CATAPANO, A.; GHISELLI, G.G. y SIRTORI, C.R. (1976) Very low lipoproteins in normal and cholesterol-fed rabbits: lipid and protein composition and metabolism. Part 2. Metabolism of very low density lipoproteins in rabbits. Atherosclerosis. 23, 85-96.

-RODRIGUEZ, A.; CUESTA, C.; SANCHEZ-MUNIZ, F.J. y VARELA, G. (1984) Estudio de las alteraciones grasas producidas por frituras e incidencia de su administración sobre el peso e ingesta. Grasas y Aceites. 35, 22-28.

-ROHEIM, P.S.; SWITZER, S.; GIRARD, A. y col. (1965) The mechanism of inhibition of lipoprotein synthesis by orotic acid. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 416.

-ROSS, A.C. y ZILVERSMIT, D.B. (1977) Chylomicron remnant cholesteryl esters as the major constituent of very low density lipoproteins in plasma of cholesterol-fed rabbits. J. Lipid. Res. 18, 169-181.

-ROY, D.M. y SCHNEEMAN, B.O. (1981) Effects of soy protein, casein and trypsin inhibitor on cholesterol, bile acids and pancreatic enzymes in mice. J. Nutr. 111, 878-885.

-RUBINSTEIN, A.; GIBSON, J.C.; PATERNITI, J.R.; KAKIS, G.; LITTLE, A.; GINSBERG, H.M. y BROWN, W.V. (1985) Effect of heparin-induced lipolysis on the distribution of apolipoprotein E among lipoprotein subclasses. J. Clin. Invest. 75, 710-721.

-RUDEL, L.L.; PARKS, J.S. y BOND, M.G. (1985) LDL heterogeneity and atherosclerosis in nonhuman primates. Ann. NY Acad. Sci. 454, 248-253.

-RUITER, A.; JONGBLOED, W.; VAN GENT, C.M.; DANSE, L.H.J.C. y METZ, S.H.M. (1978) The influence of dietary mackerel oil on the condition of organs and on blood lipid composition in the young growing pig. Amer. J. Clin. Nutr. 31, 2159-2166.

-SAEKI, S. y KIRIYAWA, S. (1990) Some evidences excluding the possibility that rat plasma cholesterol is regulated by the modification of enterohepatic circulation of steroids. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, 71-84.

-SANCHEZ, A.; HORNING, M.C.; SHAVLIK, G.W.; WINGELETH, A.C. y HUBBARD, R.W. (1987) Changes in levels of cholesterol associated with plasma amino acids in humans fed plant proteins. Nutr. Rep. Int. 32, 1047.

- SANCHEZ, A.; HUBBARD, R.W. y HILTON, G.F. (1990) Hypocholesterolemic amino acids and the insulin glucagon ratio. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, pp. 126-138.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J. (1987) Prevención con dieta para una vida longeva. Relevancia del consumo de pescado. Rev. Clin. Esp. 180, 42-47.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; CUESTA, C.; RODRIGUEZ, A. y VARELA, G. (1986) Influencia de la ingesta de una grasa tratada térmicamente sobre la lipemia y lipoproteinemia de ratas. Rev. esp. Fisiol. 42, 105-110.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; MEDINA, R.; HIGON, E. y VIEJO, J.M. (1990) Aceites de oliva y girasol y manteca de cerdo en frituras repetidas de sardinas. Valoración del rendimiento y grado de alteración. Grasas y Aceites. 41, 256-262.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; CUESTA, C.; BASTIDA, S.; VIEJO, J.M. y GARRIDO, C. (1991a) Lipoprotein changes in normo (low) lipemic women after 3 g/day fish oil supplementation. 32nd International Conference on the Biochemistry of Lipids. Granada, 18-21 September.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; HIGON, E.; CAVA, F. y VIEJO, J.M. (1991b) Acceptability of diets containing olive oil fried sardines (*Sardina pilchardus*) in the prevention of dietary hypercholesterolemia in rats. J. Sci. Food. Agric. 56, 155-165.
- SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; VIEJO, J.M. y MEDINA, R. (1991c) Consideraciones sobre el consumo de pescado azul y riesgo cardiovascular con especial referencia a la composición en ácidos grasos de las familias n-9, n-6 y n-3. Nutr. Clín. 11, 30-40.
- SANDERS, T.A.B. y MISTRY, M. (1984) Controlled trials of fish oil supplements on plasma lipid concentrations. Br. J. Clin. Pract. 38 (suppl. 31), 73-78.
- SANDERS, T.A.B. y ROSHANAI, F. (1983) The influence of different types of w-3 polyunsaturated fatty acids on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. Clin. Sci. 64, 91-96.
- SANDERS, T.A.B.; VICKERS, M. y HAINES, A.P. (1981) Effect on blood lipids and haemostasis of a supplement of cod liver oil, rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in healthy young men. Clin. Sci. 61, 317-324.
- SANDERS, T.A.B. (1991) Influence of n-3 fatty acids on blood lipids. World Rev. Nutr. Diet. 66, 358-366.
- SAUTIER, C.; FLAMENT, C. y DOUCET, C. (1990) Effects of animal and vegetable proteins on cholesterolemia and plasma lipoproteins in Wistar and Brown-Norway rats. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds.

Karger, Basel. vol. 16, pp. 44-58.

-SCHMITZ, G.; NIEMANN, R.; BRENHAUSEN, B.; KRAUSE, R. y ASSMAN, G. (1985) Regulation of high density lipoprotein receptors uncultured macrophages, role of acyl CoA:cholesterol acyltransferase. EMBO J. 11, 2773-2779.

-SCHWANDT, P.; JANETSCHKEK, P. y WEISWEILER, P. (1982) High density lipoproteins unaffected by dietary fat modification. Atherosclerosis. 44, 9-17.

-SHEFER, S.; HAUSER, S.; BEKERSKY, I. y col. (1969) Feedback regulation of bile acid biosynthesis in the rat. J. Lipid. Res. 10, 646.

-SHEFER, S.; HAUSER, S.; BEKERSKY, I. y col. (1970) Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat. J. Lipid. Res. 11, 404.

-SHELBURNE, F.; HANKS, J.; MEYERS, W. y QUARFORDT, S. (1980) Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. J. Clin. Invest. 65, 652-658.

-SHEPHERD, J.; PACKARD, C.J.; GRUNDY, S.M.; YESHURUM, D.; GOTTO, A. M. Jr. y TAUNTON, O.D. (1980) Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemicals composition and metabolism of low density lipoproteins in man. J. Lipid. Res. 21, 91-99.

-SHEPHERD, J.; PACKARD, C.J.; PATSCH, J.R.; GOTTO, A. M. Jr. y TAUNTON, O.D. (1978) Effects of dietary polyunsaturated and saturated fat on the properties of high density lipoproteins and the metabolism of apolipoprotein A-I. J. Clin. Invest. 61, 1582-1592.

-SHERRIL, B.C. y DIETSCHY, J.M. (1977) Characterization of the sinusoidal transport process responsible for uptake of chylomicrons by the liver. J. Biol. Chem. 253, 1859-1867.

-SHERRIL, B.C.; INNERARITY, T.L. y MAHLEY, R.W. (1980) Rapid hepatic clearance of the canine lipoproteins containing only the E apoprotein by a high affinity receptor. J. Biol. Chem. 255, 1804-1807.

-SHOUTEN, I.A. y BEYNEN, A.C. (1986) Fish oils, omega-3 fatty acids and serum lipids. En: "Nutritional effects on cholesterol metabolism". Beynen, A.C. ed. Transmondial. Voorhizen, Den Haag (Holanda). pp. 67-79.

-SIMKO, V.; BUCKO, A.; BABALA, J. y ONDRECKA, R. (1964) Chemical and physical changes included in food fats during the process of heating and their effects on the histological picture of guinea-pigs organs. Nutr. Dieta. 6, 91-99.

-SIMOPOULOS, A.P.; KIFER, R.R. y WYKES, A.A. (1991) N-3 fatty acids: research advances and support in the field since june 1985

(worldwide). World Rev. Nutr. Diet. 66, 51-71.

-SIRTORI, C.R.; GALLI, G.; LOVATI, M.R.; CARRARA, P.; BOSISIO, E. y KIENLE, M.G. (1984) Effects of dietary proteins on the regulation of liver lipoprotein receptors in rats. J. Nutr. 114, 1493-1500.

-SKLAN, D., BUDOWSKI, P. y HUZWITZ, S. (1979) Absorption of oleic and taurocholic acids from the intestine of the chick. Interactions and interference by proteins. Biochem. Biophys. Acta. 573, 31-39.

-SLATER, H.R.; PACKARD, C.J.; BICKER, S. y SHEPHERD, J. (1980) Effects of cholestyramine on receptor mediated plasma clearance and tissue uptake of human low density lipoproteins in the rabbit. J. Biol. Chem. 225, 10210.

-SMITH, L.C.; POWNALL, H.J. y GOTTO, A.M. (1978) The plasma lipoproteins: structure and metabolism. Ann. Rev. Biochem. 47, 751-777.

-SOLOMKO, G.I.; TRUNOV, V.I.; SOKOLOVA, A.G.; PRUONIKOVA, L.V.; ANDRIANOVA, O.F.; BAIDALINIVA, L.S. y KUZ'MICHENA, G.M. (1985) Research on protein of small ocean fish. Rybnoe Khozvaistvo, 8, 62-63.

-SORCI-THOMAS, M.; WILSON, M.D.; JOHNSON, F.L. WILLIAMS, D.L. y RUDEL, L.L. (1989) Studies on the expresion of genes encoding apolipoproteins B-100 and B-48 and the low density lipoprotein receptor in nonhuman primates. J. Biol. Chem. 264, 9039-9045.

-SOUTAR, A.K.; GARNER, C.W. y BAKER, H.N. (1975) Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidyl-choline acyl donor on the activity of lecitin:cholesterol acyltransferase. Biochemistry 14, 3057-3064.

-SPADY, D.K. y DIETSCHY, J.M. (1985) Dietary saturated triacylglycerols suppress hepatic low density lipoprotein receptor activity in the hamster. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4526-4530.

-SPADY, D.K. y DIETSCHY, J.M. (1987) Effects of different dietary fatty acids on LDL metabolism in the hamster. En: Abstracts of second colloquium on monounsaturated, natural heart, lung and blood Institute, Bethesda, M.D., USA.

-SPADY, D.K. y DIETSCHY, J.M. (1989) Interaction of aging and dietary fat in the regulation of low density lipoprotein transport in the hamster. J. Lipid. Res. 30, 559-569.

-SPECTOR, A.A.; KADUCE, T.L. y DANE, R.W. (1980) Effect of dietary fat saturation on acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity of rat liver microsomes. J. Lipid. Res. 21, 169-179.

-SPECTOR, A.A.; MATHUR, S.H. y KADUCE, T.L. (1979) Role of

acylcoenzyme A: cholesterol-o-acyltransferase in cholesterol metabolism. Progr. Lipid. Res. 18, 31.

-SPIELMANN, D. (1989) Metabolism of unsaturated fatty acids. Role of n-3 and n-6 fatty acids in clinical nutrition. En: "Perspectives in clinical nutrition". Kinney, J.M.; Borum, P.P. eds. Urban and Schwarzenberg. Baltimore.

-SPRECHER, H. (1991) Enzyme activities affecting tissue lipid fatty acid composition. World Rev. Nutr. Diet. 66, 166-176.

-SPRITZ, N. y MISHKEL, M.A. (1969) Effects of dietary fats on plasma lipids and lipoproteins: an hypothesis for the lipid-lowering effect of unsaturated fatty acids. J. Clin. Invest. 48, 78-86.

-STEIN, Y.; DABACH, Y.; HOLLANDER, G.; HALPERIN, G. y STEIN, O. (1983) Metabolism of H.D.L.-cholesterol ester in the rat, studied with a nonhydrolyzable analog, cholesteryl linoleyl ester. Biochim. Biophys. Acta. 752, 98-105.

-STREZA, D.; KALLAI, M.A. y STEINER, G. (1977) The metabolic heterogeneity of human very low density lipoprotein triglyceride. Metabolism. 26, 1333.

-SUGANO, M.; ISHIWAKI, N.; NAGATA, Y. y IMAIZUMI, K. (1982) Effects of arginine and lysine addition to casein and soya-bean protein on serum lipids, apolipoproteins, insulin and glucagon in rats. Brit. J. Nutr. 48, 211-221.

-SUGANO, M.; ISHIWAKI, N. y NAKASHIMA, K. (1984) Dietary protein-dependent modification of serum cholesterol levels in rats: significance of the arginine/lysine ratio. Annu. Nutr. metab. 28, 192-199.

-SUGANO, M.; ISHIDA, T. y KOKA, K. (1988) Protein-fat interaction on serum cholesterol level, fatty acid desaturation y eicosanoid in rats. J. Nutr. 118, 548-554.

-SUGANO, M.; YAMADA, Y.; GOTO, S. y YOSHIDA, K. (1990) Hypocholesterolemic effect of the undigested fraction of soy protein. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, pp. 85-96.

-SUGIYAWA, K.; SUZUKI, H. y MURAMATSU, K. (1987) Effect of dietary choline on plasma and liver lipid levels in rats fed on a high cholesterol diet. Agric. Biol. Chem. 51, 2603-2605.

-SWANSON, J.E. y KINSELLA, J.E. (1986) Dietary n-3 PUFA: modification of rat cardiac lipid and fatty acid composition. J. Nutr. 116, 514-523.

-SWIFT, L.L.; MANOWITZ, N.R.; DEWEY DUNN, G. y LEQUIRE, V.S. (1980) Isolation and characterization of hepatic Golgi lipoproteins from hypercholesterolemic rats. J. Clin. Invest. 66,

415-425.

-TABAS, J. y TALL, A.R. (1984) Mechanism of the association of HDL₃ with endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. J. Biol. Chem. 259, 13897-13905.

-TALL, A.R.; GREEN, P.H.R.; GLICKMAN, R.M. y RILEY, J.W. (1977) Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apoproteins in the rat. J. Clin. Invest. 64, 977.

-TANAKA, K.; IMAIZUMI, K. y SUGANO, M. (1983) Effects of dietary proteins on the intestinal synthesis and transport of cholesterol and apolipoprotein A-I, in rats. J. Nutr. 133, 1388-1394.

-TERPSTRA, A.H.M. (1985) Isolation of serum chylomicrons prior to density gradient ultracentrifugation of other serum lipoprotein classes. Anal. Biochem. 150, 221-227.

-TERPSTRA, A.H.M.; HERMUS, R.J.J. y WEST, C.E. (1983) Dietary protein and cholesterol in rabbits and rats. En: "Animal and vegetable proteins in lipid metabolism and atherosclerosis". Ed. Alan R. Liss, Inc. New York, pp. 19-49.

-TERPSTRA, A.H.M.; WOODWARD, C y SANCHEZ-MUNIZ, F.J. (1981) Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum. Anal. Biochem. 111, 149-157.

-TOMASSI, G. (1983) Effetti indotti dalla cottura sulle sostanze grasse alimentari e modificazione del loro valore nutritivo. 5. Symposium on il mollo delle sostanze grasse vella alimentazione humana. Regione Toscana C.R.O.E.V.O.T., Firenze, pp. 45-48.

-TURLEY, S.D. y DIETSCHY, J.M. (1981) The contribution of newly synthesized cholesterol to biliary cholesterol in the rat. J. Biol. Chem. 256, 2438-2446.

-VAHOUNY, G.V.; CHALCARZ, W.; SATCHITHANANDAM, S.; ADAMSON, I.; KLURFELD, D. y KRITCHEVSKY, D. (1984) Effect of soy protein and casein intake on intestinal absorption and lymphatic transport of cholesterol and oleic acid. Am. J. Clin. Nutr. 40, 1156-1164.

-VAHOUNY, G.V.; ADAMSON, I.; CHALCARZ, W.; SATCHITHANANDAM, S.; MUESING, R.; KLURFELD, D.; TEPPER, S.A.; SANGHVI, A. y KRITCHEVSKY, D. (1985) Effects of casein and soy protein on hepatic and serum lipids and lipoprotein lipid distributions in the rat. Atherosclerosis. 56, 127-137.

-VANCE, J.E.; NGUYEN, T.M. y VANCE, D.E. (1986) The biosynthesis of phosphatidylcholine by methylation of phosphatidylethanolamine derived from ethanol-amine is not required for lipoprotein secretion by cultured rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Acta. 875, 501-509.

-VANCE, J.E. y VANCE, D.E. (1985) The role of phosphatidylcholine

biosynthesis in the secretion of lipoproteins from hepatocytes. Can. J. Biochem. Cell Biol. 63, 870-881.

-VAN DER MEER, R.; DE VRIES, H.; WEST, C.E. y DE WAARD, H. (1985) Casein-induced hypercholesterolaemia in rabbits is calcium-dependent. Atherosclerosis. 56, 139.

-VAN RAAIJ, J.M.A.; KATAN, M.B.; WEST, C.E. y HAUTVAST, J.G.A.J. (1982) Influence of diets containing casein, soy isolate and soy concentrate on serum cholesterol and lipoproteins in middle-aged volunteers. Am. J. Clin. Nutr. 35, 925.

-VAN TOL, A. (1989) Reverse cholesterol transport. En. "Cholesterol transport systems and their relation to atherosclerosis. Steinmetz, J.; Kaffarnik, H. y Schneider, J. eds. Springer-Verlog, Berlin/Heidelberg. pp. 85-88.

-VARELA, G. (1980) Nutricional aspects of olive oil in the frying process. Actas del III Congreso Internacional sobre el valor biológico del aceite de oliva. Creta. 8-12 Septiembre.

-VARELA, G. (1983) Influence of household handling. Simposium Internacional sobre Handling of food without change of quality. Dream or reality?. BAD SODEN (Alemania). 10 Noviembre. 1-26.

-VARELA, G.; MOREIRAS-VARELA, O. y RUIZ-ROSO, B. (1983) Utilización de algunos aceites en frituras repetidas. Cambios en las grasas y análisis sensorial de los alimentos fritos. Grasas y Aceites. 34, 101-107.

-VEGA, G.L.; GROSZEK, E.; WOLF, R. y GRUNDY, S.M. (1982) Influence of polyunsaturated fats on composition of plasma lipoproteins and apoproteins. J. Lipid. Res. 23, 811-822.

-VESSBY, B.; BOBERG, J.; GUSTAFSSON, I.B.; KARLSTROM, B.; LITHELL, H. et al. (1980) Reduction of high density lipoprotein cholesterol apolipoprotein A-I concentrations by a lipid-lowering diet. Atherosclerosis. 35, 21-27.

-VESSBY, B.; LITHELL, H. y BOBERG, J. (1982) Reduction of low density and high density lipoprotein cholesterol by fat modified diets. Hum. Nutr. Clin. Nutr. 36c, 203-211.

-VIEJO, J.M. y SANCHEZ-MUNIZ, F.J. (1990) PUFA n-3 en la esterificación del colesterol hepático de ratas hipercolesterolémicas. XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas. Madrid, 26-29 Septiembre.

-VON LOSSONCZY, T.O.; RUITER, A.; BRONGEEST-SCHOUTE, H.C.; VAN GENT, C.M. y HERMUS, R.J.J. (1978) The effect of a fish diet on serum lipids in healthy human subjects. Am. J. Clin. Nutr. 31, 1340-1346.

-VON SCHACKY, C.; FISCHER, S. y WEBBER, P.C. (1985) Long term effects of dietary marine n-3 fatty acids upon plasma and celular lipids, platelet function and eicosanoid formation in humans. J.

Clin. Invest. 76, 1626-1631.

-WAARD, H. de (1978) Effects on lipid and glucose metabolism of diet with different types of fat and sugar in male fatty Zucker rats. Tesis doctoral. NIZO Ede (Holanda). pp. 73-83.

-WANG, C.S.; McCONATHY, W.J.; KLOER, H.W. y ALANPOVIC, P. (1985) Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. J. Clin. Invest. 75, 384-390.

-WEBER, J.M. y LEAF, A. (1991) Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. Atherosclerosis risk factor modification by n-3 fatty acids. World Rev. Nutr. Diet. 66, 218-232.

-WOLFE, B.M.; GIOVANNETTI, P.M.; CHENG, D.C.H.; ROBERTS, D.C.K. y CARROLL, K.K. (1981) Hypolipidemic effect of substituting soy-bean protein isolate for all meat and dairy protein in the diets of hypercholesterolemic men. Nutr. Rep. Int. 24, 1187.

-WONG, L. y MARSH, J.B. (1988) Inhibition of apolipoprotein secretion and phosphatidate phosphohydrolase activity by EPA and DHA in perfused rat liver. Metabolism. 37, 1177-1181.

-WONG, S.H. y NESTEL, P.J. (1987) Eicosapentaenoic acid inhibits the secretion of triacylglycerol and apoprotein B and the binding of LDL in Hep G₂ cells. Atherosclerosis. 64, 139-146.

-WONG, S.H.; NESTEL, P.J.; TRIMBLE, R.P.; STORER, G.B.; ILLMAM, R.J. y TOPPING, D.L. (1984) The adaptive effects of dietary fish and safflower oil on lipid and lipoprotein metabolism in perfused rat liver. Biochem. Biophys. Acta. 792, 103-109.

-WONG, L. y RUBINSTEIN, D. (1979) Turnover of apo E in normal and hypercholesterolemic rats. Atherosclerosis. 34, 249-258.

-YAGASAKI, K.; OHSAWA, N. y FUNABIKI, R. (1986) Effects of dietary amino acids on, and role of thyroid hormone in, methionine-induced endogenous hypercholesterolemia. Nutr. Rep. Int. 33, 321.

-YAMASHITA, J.; FUJITA, Y.; KAMIMURA, M. y HAYASHI, S.I. (1990) Different effects of soy protein on cholesterol metabolism in rats and mice. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, pp. 36-43.

-YAMORI, Y.; NARA, Y.; IRITANI, N.; WORKMAN, T. y INAGAMI, T. (1985) Comparison of serum phospholipid fatty acids among fishing and farming Japanese populations and American islanders. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokio) 31, 417.

-YAO, Z. y VANCE, D.E. (1988) The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 263, 2998-3004.

-YOSHIDA, A.; AOYAWA, Y.; ODA, H. y OKUMURA, Y. (1990) Charate-

ristic effect of soy and rice protein on cholesterol metabolism in rats. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, pp. 1-10.

-ZAKIM, D. (1982) Metabolism of glucose and fatty acids by the liver. En : "Hepatology. A textbook of liver disease. Zakim and Boyer, ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia.

-ZEISEL, S.H. (1981) Dietary choline: biochemistry, physiology and pharmacology. Annu. Rev. Nutr. 1, 95-121.

-ZHANG, X. y BEYNEEN, A.C. (1990) Dietary fish proteins and cholesterol metabolism. En: "Dietary proteins, cholesterol metabolism and atherosclerosis". Sugano M. y Beynen A.C. eds. Karger, Basel. vol. 16, pp. 148-152.

-ZILVERSMIT, D.B. (1979) Atherogenesis: a postprandial phenomenon. Circulation. 60, 473-485.

-ZSIGMOND, E.; FONG, B. y ANGEL, A. (1990) Dietary polyunsaturated fatty acids enhance the uptake of high-density lipoprotein cholesterol ester by rat adipocytes. Am. J. Clin. Nutr. 52, 289-299.

Presidencia:
Dr. Bonito del Castillo

Vocales:
Dr. Antonio Linares
Dr. Manuel Linares
Dr. Emilio Heredia

Secretario:
Dr. Juan M. Benítez

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal que a)
marco en expresa, para juzgar esta tesis doctoral
acordó por unanimidad calificar

de Apto. con honores
Madrid, 27 de Abril de 1892

El Secretario del Tribunal

Juan M. Benítez