

Alimentos funcionales

El ácido linoleico conjugado disminuye la hipercolesterolemia pero aumenta el riesgo de litiasis biliar

V. Navarro, M.^a T. Macarulla, M.^a Chávarri, A. Fernández-Quintela, V. M. Rodríguez y M.^a Puy Portillo

Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Vitoria. España.

Resumen

El término *ácido linoleico conjugado* (ALC) designa una serie de isómeros del ácido linoleico, presentes en la carne y productos lácteos de rumiantes, que presentan sus dos dobles enlaces en posición conjugada. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos de un isómero del ALC, el *trans-10, cis-12*, sobre la colesterolemia y el riesgo de litiasis biliar en un modelo animal de hipercolesterolemia inducida por dieta. Para ello se utilizaron dos grupos de hámsters alimentados con una dieta hipercolesterolemia suplementada al 0,5% con ácido linoleico o con el isómero *trans-10, cis-12* del ALC, respectivamente. Se midió diariamente su ingesta de alimento y peso corporal y, tras 6 semanas, se obtuvieron muestras de suero y bilis, y se diseccionaron y pesaron sus hígados y bazos. Se determinó la colesterolemia, el contenido hepático y esplénico de colesterol, y la concentración biliar de colesterol, fosfolípidos y sales biliares; se calculó el índice litogénico biliar y se evaluó la presencia de cálculos biliares. El ALC no modificó la ingesta energética, el peso corporal final, ni el tamaño y contenido de colesterol del bazo, pero sí produjo una disminución significativa del colesterol sérico total (-18%) a expensas de la fracción c-LDL (-66%), y también redujo significativamente el contenido hepático de colesterol libre (-26%), sin cambios en el colesterol esterificado. Además, el ALC produjo un incremento del 32% de la concentración biliar de colesterol, un aumento del 28% del índice litogénico y una mayor incidencia de litiasis biliar. Por tanto, el presente estudio demuestra que el isómero *trans-10, cis-12* del ALC es hipocolesterolemia debido, al menos en parte, a que aumenta la secreción de colesterol a bilis. En contrapartida, este efecto aumenta el riesgo de litiasis biliar.

(*Nutr Hosp* 2005, 20:223-228)

Palabras clave: *Ácido linoleico conjugado. Hipercolesterolemia. Litiasis biliar. Hámster.*

Correspondencia: Dra. M.^a del Puy Portillo
Área de Nutrición y Bromatología
Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco
P.^o de la Universidad, 7
01006 Vitoria (España)
E-mail: knppobam@vc.ehu.es
Recibido: 19-II-2004.
Aceptado: 22-VI-2004.

CONJUGATED LINOLEIC ACID LOWERS HYPERCHOLESTEROLEMIA BUT INCREASES THE RISK FOR BILIARY LITHIASIS

Abstract

The term *conjugated linoleic acid* (CLA) refers to a series of linoleic acid isomers present in meat and dairy products from ruminants that have their double bonds in a conjugated position. The aim of the present work was to study the effects of a CLA isomer, *trans-10, cis-12*, on cholesterolemia and biliary lithiasis risk in an animal model of diet-induced hypercholesterolemia. For that, two groups of hamsters were fed with a hypercholesterolemic diet supplemented with 0.5% linoleic acid or with the *trans-10, cis-12* CLA isomer, respectively. Daily food intake and weight were determined and, 6 weeks later, serum and bile samples were obtained, and livers and spleens were dissected and weighted. Cholesterolemia, hepatic and splenic cholesterol content, and biliary cholesterol phospholipid and bile acid concentrations were determined; Biliary Lithogenic Index was calculated, and presence of gallstones was assessed. CLA did not modify energetic intake or final body weight, spleen size or spleen cholesterol content, but it did significantly reduce total serum cholesterol (-18%) at the expense of c-LDL (-66%), and it also significantly reduced hepatic content of free cholesterol (-26%), without changes in esterified cholesterol. Besides, CLA produced a 32% increase in biliary cholesterol concentration, a 28% increase in Lithogenic Index, and a higher incidence of biliary lithiasis. Therefore, the present study shows that the CLA *trans-10, cis-12* isomer is hypercholesterolemic since it increases, at least in part, cholesterol secretion to the bile. As a consequence, this effect increases the risk for biliary lithiasis.

(*Nutr Hosp* 2005, 20:223-228)

Key words: *Conjugated linoleic acid. Hypercholesterolemia. Biliary lithiasis. Hamster.*

Introducción

El término *ácido linoleico conjugado* (ALC) hace referencia a una serie de isómeros del ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12-octodecadienoico) que poseen sus dobles enlaces en posición conjugada (principalmente 9, 11 ó 10, 12), y pueden presentarse en configuración *cis* o *trans*. Estos ácidos grasos presentes en la carne y productos lácteos de rumiantes han demostrado poseer gran variedad de efectos beneficiosos, tanto en modelos animales como en el ser humano, en algunos tipos de cáncer, obesidad, diabetes, inflamación, inmunodeficiencia, patología cardiovascular, etc.¹⁻³. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo utilizando mezclas de diferentes isómeros; sin embargo, la utilización de isómeros concretos presenta gran interés puesto que se ha demostrado que algunos de los efectos de ALC son isómeros-específicos⁴.

Con relación a sus efectos sobre el sistema cardiovascular, en varios trabajos de investigación realizados con diferentes especies animales, se ha observado que su inclusión en la dieta previene la aparición de depósitos de colesterol en la aorta debido a que mejora el perfil lipídico plasmático, ya que disminuye la colesterolemia y la trigliceridemia^{2,5-7}. No obstante, son escasos los estudios destinados a analizar los mecanismos de acción involucrados en dichos efectos. Entre ellos se encuentran el de Tomas Yeung y cols.⁸ llevado a cabo con hámsters a los que se les incluía en la dieta una mezcla de isómeros del ALC. Estos autores observaron que el ALC disminuía la actividad del enzima acilcoenzima A: colesterol aciltransferasa (ACAT) intestinal, necesario para la absorción del colesterol, lo que provocaba una mayor excreción fecal del mismo. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de otros mecanismos implicados.

Por ello, el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar los efectos de uno de los principales isómeros del ácido linoleico conjugado, el *trans*-10, *cis*-12, sobre la colesterolemia y la secreción biliar de colesterol y, por tanto, el riesgo de aparición de litiasis biliar, en un modelo animal de hipercolesterolemia inducida por dieta.

Material y métodos

Animales, dietas y diseño experimental

Para este estudio se utilizaron 24 hámsters macho Syrian Golden (Harlan Ibérica, Barcelona), de 9 semanas de edad y 105 ± 1 g de peso corporal, que fueron manejados de acuerdo con el protocolo de la Comisión ética para la Experimentación Animal de la Universidad del País Vasco. Los animales fueron estabulados individualmente en jaulas metabólicas bajo condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C) y humedad (50%), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas.

Tras un período de adaptación de 6 días, se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos ($n = 8$), y se alimentaron *ad libitum* durante 6 semanas con diferentes dietas. Un grupo se alimentó con una dieta estándar de laboratorio (grupo control, C) con el fin de obtener los valores basales de los parámetros a determinar, y los otros dos con una dieta hipercolesterolemia: rica en grasa de palma (10%), sacarosa (40,4%) y colesterol (0,1%), suplementada al 0,5% con ácido linoleico aportado en forma de aceite de girasol (grupo HC),

o con el isómero *trans*-10, *cis*-12 del ácido linoleico conjugado (grupo HC + ALC), respectivamente. El aporte energético de las dietas fue de 300 kcal/100 g de dieta C, 417 kcal/100 g de dieta HC y 416 kcal/100 g de dieta HC + ALC.

Se midió diariamente el peso corporal de los hámsters y su ingesta de dieta. Al finalizar el período experimental, tras un ayuno de 12 horas, los animales se desangraron por punción cardíaca bajo anestesia etérea, se extrajeron sus vesículas biliares tras la ligadura del colédoco, y se diseccionaron y pesaron sus hígados y bazos.

Tanto los sueros sanguíneos (obtenidos por centrifugación a 1.000 g durante 10 minutos a 4 °C), como las bilis, los hígados y los bazos se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

Análisis del suero sanguíneo

Las concentraciones séricas de colesterol total, colesterol-HDL y colesterol-LDL se determinaron mediante kits comerciales (Spinreact, Barcelona), y la de colesterol-VLDL se calculó por diferencia.

Análisis del contenido de colesterol del hígado y del bazo

Los lípidos de hígado y bazo se extrajeron con cloroformo-metanol (2:1) mediante el método de Folch y cols.⁹, y el extracto lipídico se resuspendió en isopropanol. El contenido de colesterol total, libre y esterificado se determinó utilizando los métodos descritos con anterioridad¹⁰.

Análisis de la bilis

Las concentraciones biliares de colesterol y de fosfolípidos se determinaron utilizando kits comerciales (Spinreact, Barcelona), y la de sales biliares utilizando el método de Turley y Dietsch¹¹. El índice litogénico se calculó con la fórmula de Thomas y Hofmann¹², y la presencia de cálculos biliares se detectó visualmente.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA-I y el test *post-hoc* de Newman-Keuls (SPSS 8.0; SPSS Inc., Chicago IL, USA), considerándose diferencias significativas a $p < 0,05$. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de la media.

Resultados

Incremento de peso corporal e ingesta de energía

No se encontraron diferencias significativas en el incremento del peso corporal de los animales de los tres grupos experimentales (entre 12 y 15 g), ni en la ingesta energética (entre 23 y 25 kcal/d).

Colesterol sérico

Como era de esperar, los animales alimentados con las dietas hipercolesterolemiantes (grupos HC y HC + ALC)

presentaron concentraciones séricas de colesterol total muy superiores a las del grupo control ($p < 0,001$). Sin embargo, los animales del grupo que ingirió ALC tenían una concentración de colesterol total un 18% inferior a los del grupo HC ($p < 0,01$). Este descenso fue debido a una drástica disminución de la concentración de colesterol-LDL (incluso por debajo de los niveles basales), ya que ni la concentración de colesterol-HDL ni la de colesterol-VLDL se vieron afectadas (fig. 1).

Peso y composición del hígado

Las dietas hipercolesterolemiantes produjeron un aumento significativo del peso del hígado con respecto al de los animales control ($p < 0,001$), que fue más acusado cuando la dieta contenía ALC ($3,29 \pm 0,18$ g en el grupo C; $4,62 \pm 0,16$ g en el grupo HC y $5,10 \pm 0,11$ g en el grupo HC + ALC). Ambas dietas hipercolesterolemiantes también indujeron un incremento en el contenido hepático de colesterol, tanto libre como esterificado ($p < 0,001$). Sin embargo, los animales que ingirieron ALC mostraron contenidos significativamente inferiores de colesterol total y libre que los del grupo HC ($p < 0,001$), sin variación significativa en el colesterol esterificado (fig. 2).

Peso y composición del bazo

En los hámsters de los grupos HC y HC + ALC se observó que el peso del bazo era significativamente superior al de los animales del grupo C ($p < 0,05$) y, además, este órgano presentaba un incremento de su contenido total de colesterol ($p < 0,05$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en estos parámetros entre los dos grupos alimentados con dietas hipercolesterolemiantes (tabla I).

Parámetros biliares

Los animales alimentados con las dietas hipercolesterolemiantes presentaron una concentración biliar de colesterol y de fosfolípidos elevadas y de sales biliares disminuida con respecto a los del grupo control ($p < 0,001$). Además, la inclusión en la dieta hipercolesterolemiantes del isómero *t*-10, *c*-12 del ALC produjo un incremento significativo de la concentración biliar de colesterol con respecto a la del grupo que recibió ácido linoleico ($+32\%$, $p < 0,05$), pero no modificó las concentraciones de fosfolípidos ni de sales biliares. Estas alteraciones condujeron a un índice litogénico significativamente más elevado en los grupos HC y HC + ALC con respecto al grupo control, efecto especialmente acusado en el grupo que recibió ALC. Este hecho se relaciona con la aparición de cálculos biliares observada en los animales de ambos grupos alimentados con dietas hipercolesterolemiantes, que fue del 100% en los animales del grupo HC + ALC, y del 38% en los animales del grupo HC (tabla II).

Discusión

Los resultados del presente trabajo demuestran que, en hámsters con hipercolesterolemia, la inclusión en la dieta del isómero *t*-10, *c*-12 del ALC provoca una reducción de la concentración sérica de colesterol total sin afectar la de c-HDL. Este efecto hipocolesterolemiantes ya había sido observado en estudios previos llevados a cabo con hámsters y otras especies animales, incluida la humana, con mezclas de isómeros el ALC^{5-7,13}.

Dado que el bazo participa activamente en el aclaramiento plasmático de los lípidos al endocitar con preferencia las lipoproteínas anómalas, como son las lipoproteínas excesivamente cargadas con lípidos y, en consecuencia, desempeña un papel importante en el mantenimiento de las concen-

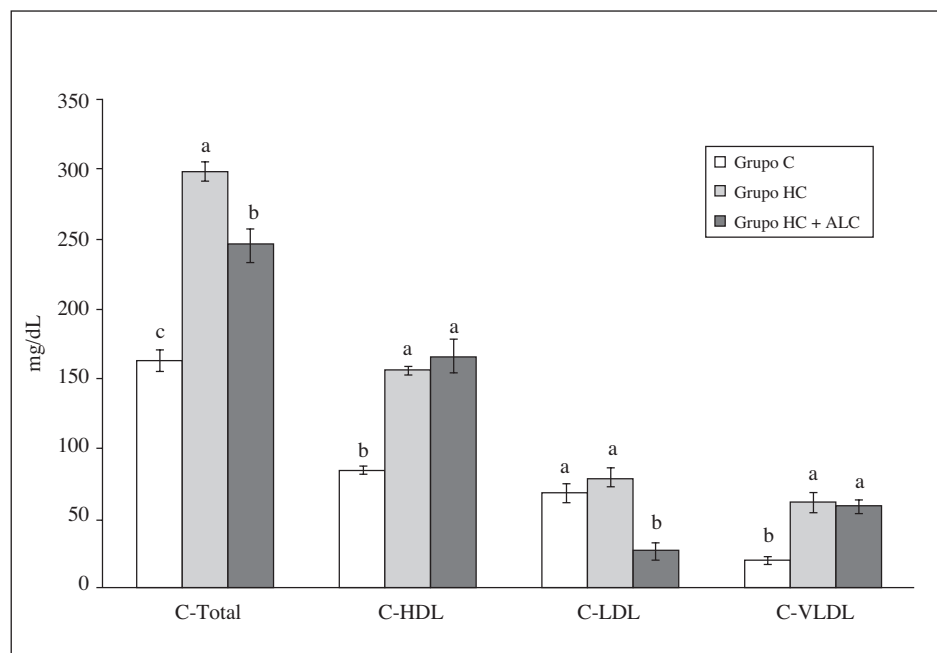


Fig. 1.—Concentraciones séricas de colesterol total y sus fracciones de los hámsters alimentados durante 6 semanas con las dietas experimentales. Los resultados están presentados como la media \pm el error estándar de la media. Los valores de cada parámetro señalados con letras diferentes fueron significativamente distintos ($p < 0,05$). Grupo C: control, alimentado con una dieta estándar de laboratorio; Grupo HC: alimentado con una dieta hipercolesterolemiantes; Grupo HC + ALC: alimentado con una dieta hipercolesterolemiantes suplementada al 0,5% con ácido linoleico conjugado.

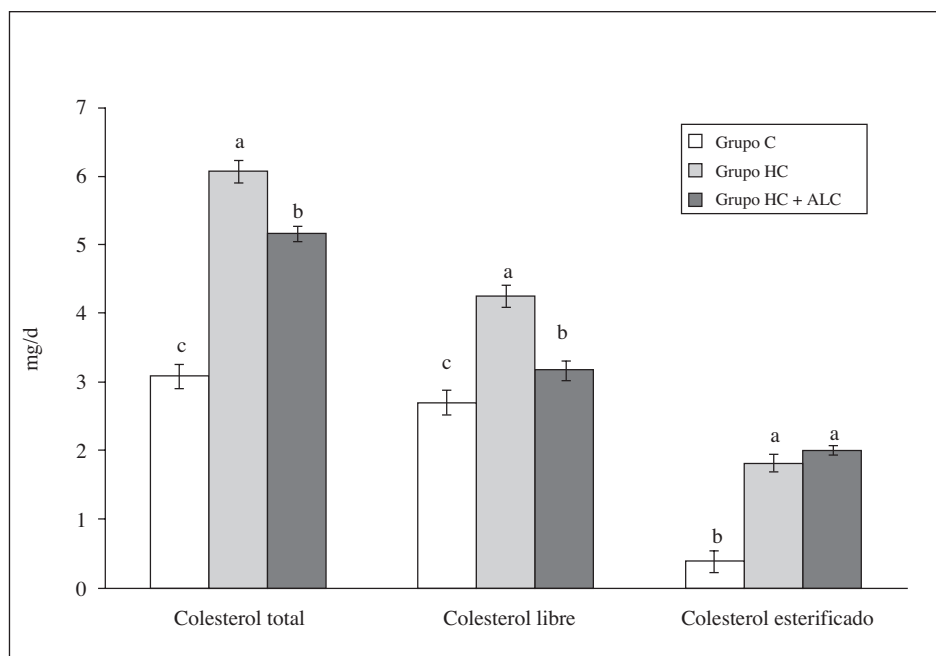


Fig. 2.—Contenido de colesterol del hígado de los hámsters alimentados durante 6 semanas con las dietas experimentales. Los resultados están presentados como la media \pm el error estándar de la media. Los valores de cada parámetro señalados con letras diferentes fueron significativamente distintos ($p < 0,05$). Grupo C: control, alimentado con una dieta estándar de laboratorio; Grupo HC: alimentado con una dieta hipercolesterolemian-te; Grupo HC + ALC: ali-mentado con una dieta hi-percolesterolemian-te suplementada al 0,5% con ácido linoleico conjugado.

Tabla I
Peso y contenido de colesterol del bazo de los hámsters alimentados durante 6 semanas con las dietas experimentales

	Grupo C	Grupo HC	Grupo HC + ALC
Peso (mg)	77,3 \pm 2,1 ^b	95,8 \pm 7,2 ^a	96,1 \pm 6,1 ^a
Colesterol (mg/g)	3,42 \pm 0,10	3,39 \pm 0,13	3,36 \pm 0,12
Colesterol (μ g/bazo)	268 \pm 11 ^b	323 \pm 22 ^a	325 \pm 25 ^a

Los resultados están presentados como la media \pm el error estándar de la media. Los valores de cada parámetro señalados con letras diferentes fueron significativamente distintos ($p < 0,05$).

Grupo C: control, alimentado con una dieta estándar de laboratorio; Grupo HC: alimentado con una dieta hipercolesterolemian-te; Grupo HC + ALC: ali-mentado con una dieta hipercolesterolemian-te suplementada al 0,5% con ácido linoleico conjugado.

traciones plasmáticas de colesterol¹⁴, se podría pensar en su posible implicación en el mecanismo de acción del ALC. No obstante, en el presente estudio el incremento del tamaño y del contenido de colesterol del bazo fue similar en los grupos HC y HC + ALC, lo que lleva a descartar esta hipótesis.

El hígado es el órgano clave en la regulación del metabolismo del colesterol, pues es el responsable de gran parte de su síntesis endógena, de la mayor parte de su aclaramiento plasmático, de su almacenamiento como colesterol esterificado, y de su eliminación vía bilis-heces, tanto en su forma intacta como transformado en sales biliares¹⁵.

En el presente trabajo, como era de esperar, los hígados de los hámsters de los dos grupos alimentados con dietas hipercolesterolemian-tes (HC y HA + ALC) presentaron un

Tabla II
Parámetros biliares de los hámsters alimentados durante 6 semanas con las dietas experimentales

	Grupo C	Grupo HC	Grupo HC + ALC
Colesterol (mmol/L)	1,76 \pm 0,19 ^c	3,34 \pm 0,19 ^b	4,41 \pm 0,37 ^a
Fosfolípidos (mmol/L)	8,85 \pm 0,90 ^b	13,55 \pm 0,48 ^a	14,21 \pm 0,67 ^a
Ácidos biliares (mmol/L)	72,08 \pm 1,30 ^b	60,64 \pm 1,68 ^b	59,03 \pm 1,49 ^b
Índice litogénico	0,26 \pm 0,03 ^c	0,46 \pm 0,03 ^b	0,59 \pm 0,04 ^a
Incidencia de litiasis biliar	0/8	3/8	8/8

Los resultados están presentados como la media \pm el error estándar de la media.

Los valores de cada parámetro señalados con letras diferentes fueron significativamente distintos ($p < 0,05$).

Grupo C: control, alimentado con una dieta estándar de laboratorio; Grupo HC: ali-mentado con una dieta hipercolesterolemian-te; Grupo HC + ALC: ali-mentado con una dieta hipercolesterolemian-te suplementada al 0,5% con ácido linoleico conjugado.

gran aumento del peso fresco y de su contenido de colesterol, tanto libre como esterificado, con respecto a los del grupo control (C). Sin embargo, la dieta que contenía ALC produjo un aumento significativamente menor de dicho contenido a costa de una reducción de la fracción libre.

Está demostrado que la fracción de colesterol libre en el hígado regula los receptores para las LDL^{16,17}. Por ello, la menor cantidad de colesterol libre hepático observada en el grupo alimentado con ALC podría estar relacionada con un mayor aclaramiento del colesterol-LDL y, por tanto, con la menor concentración sérica de colesterol-LDL observada en estos animales. En este sentido, un trabajo reciente de Yu-Poth y cols.¹⁸, llevado a cabo en células hepática aisladas, ha demostrado que el ALC provoca un aumento en el número de receptores para las LDL, y que este efecto se

produce tanto a nivel de transcripción como a nivel de traducción.

Como ya se ha mencionado, el hígado es el órgano que regula la eliminación del colesterol del organismo a través de su secreción biliar. Como era de esperar, la alimentación con las dietas ricas en colesterol generó concentraciones de colesterol en bilis superiores a lo normal. Además, los animales que ingirieron ALC presentaron una concentración aún mayor a la observada en los animales del grupo HC, sin modificaciones en la concentración de fosfolípidos ni de ácidos biliares. Este aumento en la secreción biliar de colesterol podría ser una de las causas del menor contenido de colesterol libre en el hígado de estos animales, pues es en la forma libre como el colesterol se segrega a bilis¹⁹. A su vez, la mayor concentración de colesterol biliar provocó en estos animales un mayor índice litogénico, es decir, un mayor grado de saturación y, por tanto, una menor solubilidad del colesterol en la bilis, lo que indujo la formación de cálculos biliares en el 100% de los animales de este grupo.

En conclusión, la ingestión del isómero *trans*-10, *cis*-12 del ácido linoleico conjugado reduce la hipercolesterolemia debido, al menos en parte, a que aumenta la secreción de colesterol a bilis. En contrapartida, este efecto aumenta el riesgo de litiasis biliar.

Agradecimientos

Este trabajo a sido subvencionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyecto BFI2002-00273), el Gobierno Vasco (Proyecto Biogune, Programa Etorrek) y la Universidad del País Vasco (Proyecto 00101.125-E-14788/2002). La grasa de palma utilizada fue donada generosamente por Agra-Unilever Foods España, S. A. (Leioa, España).

Referencias

1. Pariza MW, Park Y, Cook ME: The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 2001, 40:283-298.
2. Roche HM, Noone E, Nugent A, Gibney MJ: Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient? *Nutr Res Rev* 2001, 14:173-187.
3. Belury MA: Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr* 2002, 22:505-531.
4. Evans M, Brown J, McIntosh M: Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 2002, 13:508-516.
5. Lee KN, Kritchevsky D, Paiza MW: Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 1994, 108:19-25.
6. MacDonald HB: Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. *J Am Coll Nutr* 2000, 19:111S-118S.
7. Wilson TA, Nicolosi RJ, Chrysam M, Kritchevsky D: Conjugated linoleic acid reduces aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterolemic hamsters. *Nutr Res* 2000, 20:1795-1805.
8. Tomas Yeung CH, Yang L, Huang Y, Wang J, Chen ZY: Dietary conjugated linoleic acid mixture affects the activity of intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in hamsters. *Br J Nutr* 2000, 84:935-941.
9. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957, 226:497-509.
10. Macarulla MT, Medina C, De Diego MA y cols.: Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. *Br J Nutr* 2001, 85:607-614.
11. Turley SD, Dietschy JM: Re-evaluation of the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *J Lipid Res* 1978, 19:924-928.
12. Thomas PJ, Hofmann AF: A simple calculation of the lithogenic index of bile: expressing biliary lipid composition on rectangular coordinates. *Gastroenterology* 1973, 65:698-700.
13. Mougios V, Matsakas A, Petridou A y cols.: Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J Nutr Biochem* 2001, 12:585-594.
14. Wysocki A, Drozd W, Dolecki M: Splenomegaly and plasma lipids. *Przegl Lek* 1998, 55:365-367.
15. Vlahcevic ZR, Hylemon PB, Chiang JYL: Hepatic cholesterol metabolism. En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz (eds.): *The liver, biology and pathology*. 3.^a edición. Raven Press, Nueva York 1994, 379-389.
16. Goldstein JL, Brown MS: Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *Eur Heart J* 1992, 13:34-36.
17. Lestavel S, Fruchart JC: Lipoprotein receptors. *Cell Mol Biol* 1994, 40:461-481.
18. Yu-Poth S, Yin D, Zahao G, Kris-Etherton PM, Etherton TD: Conjugated linoleic acid upregulates LDL receptor gene expression in HepG2 cells. *J Nutr* 2004, 134:68-71.
19. Hayes KC, Livingston A, Trautwein EA: Dietary impact on biliary lipids and gallstones. *Annu Rev Nutr* 1992, 12:299-326.