

EFFECTO SINÉRGICO DE LÍPIDOS FUNCIONALES SOBRE LA ACUMULACIÓN DE COLESTEROL HEPÁTICO EN UN MODELO NUTRICIONAL DE ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

Roura, Camila

*Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL
Director/a: Sain, Juliana
Codirector/a: Bernal, Claudio Adrián*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: dieta rica en grasas, esteatosis, lípidos funcionales

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es una de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) más comunes y con muy alta prevalencia a nivel mundial (Younossi, 2018). La misma está caracterizada principalmente por una exacerbada acumulación de triglicéridos hepáticos en ausencia de consumo de alcohol. Esta patología puede progresar a una esteatohepatitis no alcohólica (NASH) con acumulación de especies lipotóxicas como el colesterol libre, generando inflamación, estrés oxidativo y fibrosis, en un contexto de insulino-resistencia (Hansen, 2017).

La composición de la dieta y los posibles usos de alimentos funcionales y nutracéuticos pueden jugar un rol fundamental en la progresión de este tipo de patologías, pudiendo atenuar o empeorar parámetros que contribuyan a su desarrollo y evolución. En este sentido, las dietas ricas en aceites con alto contenido de ácidos grasos saturados (como la grasa animal) o elevada relación n-6/n-3 (como el aceite de maíz o girasol) han mostrado inducir esteatosis hepática, ganancia de peso e insulino-resistencia (Pavlisova, 2016). Otros aceites, como el de lino (fuente rica de ácidos grasos de la familia n-3), han mostrado un efecto hipolipemiante (Cicero, 2017), hipotensor (Al-Bishri, 2013) y atenuador de la esteatosis hepática (Hanke, 2013). Por otro lado, los aceites vegetales contienen de manera natural otros componentes liposolubles bioactivos como los tocoferoles (TF) y fitoesteroles (FE). Los TF son nutrientes liposolubles que, entre otros, actúan como antioxidantes naturales cuando reaccionan con los radicales libres solubles en los lípidos de las membranas celulares (Herrera, 2001). Los FE son esteroides de origen vegetal con una gran variedad de efectos fisiológicos; dentro de ellos, su acción más conocida es la reducción de la absorción del colesterol a nivel intestinal (Li, 2022). Estos compuestos demostraron tener efectos benéficos y/o preventivos sobre el desarrollo de ECNT, como la NAFLD, por lo que se los puede considerar como "lípidos funcionales". Sin embargo, estos lípidos se pierden durante el proceso de refinación de los aceites vegetales, quedando retenidos en un destilado de desodorización (DD), que constituye un subproducto de la industria aceitera con gran potencial valor nutricional.

Título del proyecto: Efecto sinérgico de lípidos funcionales sobre la acumulación de colesterol hepático en un modelo nutricional de enfermedad de hígado graso no alcohólico. Instrumento: PICT 2020-022066
Año convocatoria: 2020.
Organismo financiador: ANPCyT.
Director/a: Juliana Sain



OBJETIVOS

Estudiar los mecanismos involucrados en la prevención de la acumulación de colesterol hepático en dietas ricas en grasa conteniendo aceite de lino y/o suplementadas con DD rico en TF y FE en ratas Wistar.

METODOLOGÍA

Se emplearon ratas Wistar machos jóvenes (100 g peso inicial) que fueron aleatoriamente divididas en 7 grupos (n=6/grupo) los cuales recibieron *ad libitum* agua de bebida y alguna de las dietas experimentales durante 60 días. Los animales del grupo control (S7) recibieron la dieta recomendada por el *American Institute of Nutrition* para roedores en crecimiento –AIN-93G- la cual contiene aceite de soja como fuente de lípidos al nivel del 7% (p/p). Los restantes 6 grupos recibieron dietas conteniendo altos niveles de lípidos (30%, p/p) provenientes de 3 fuentes: Soja, Maíz y Lino, con o sin la presencia de destilados de desodorización purificados (DD), ricos en FE y TF; conformando así los siguientes grupos dietarios: S30 (dieta conteniendo 30% de aceite de soja obtenida por sustitución de 27 g% de almidón de la dieta S7 por igual cantidad de aceite de soja); M30, L30 (obtenidas por sustitución de 27 g% de almidón de la dieta S7 por igual cantidad de aceite de maíz o lino, respectivamente, alcanzando 30 % de lípidos con 3% de aceite de soja); S30DD, M30DD y L30DD (obtenidas por suplementación con 1% -p/p- de DD purificado a las dietas S30, M30 y L30, respectivamente, equilibrando el nivel lipídico para alcanzar 30%). Luego de los 60 días de tratamiento dietario, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla ketamina-acepromacina (100 - 1 mg/ Kg) para la toma de muestras de hígado y realización de las experiencias que se detallarán a continuación. En tejido hepático se cuantificaron los niveles de triglicéridos utilizando una técnica colorimétrica y fracciones de colesterol (libre y esterificado) a través de una técnica enzimática modificada. Luego se evaluaron los niveles de mRNA de enzimas y transportadores claves en el metabolismo del colesterol hepático por RT-PCR. Los resultados fueron expresados como promedios \pm SEM. La comparación entre S7 y S30 se realizó utilizando test T de Student. Se realizó un Análisis de Variancia (ANOVA 2x3, donde las variables independientes son el tipo de aceite dietario y la presencia o no de DD purificado), seguido de la prueba de Tukey para las comparaciones de los grupos a altos niveles de grasa. La significancia estadística se fijó a un $p < 0,05$ y se indica con * en S30 vs. S7 y con diferente letra entre los grupos al 30% de grasa. El tratamiento de los animales y la metodología planteada fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética y Seguridad de la Investigación de la FCB (CE2021-32-C).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Triglicéridos y colesterol en hígado

La esteatosis hepática está caracterizada por una acumulación exacerbada de triglicéridos en los hepatocitos. Los animales alimentados con dieta S30 mostraron un aumento estadísticamente significativo de los triglicéridos hepáticos, con respecto al grupo control (Figura 1 A). Este incremento podría asociarse con la elevada oferta de lípidos de la dieta al 30% de grasa. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo reportado por múltiples autores, donde el tratamiento de animales de experimentación, con distintas dietas *high fat* (HF), produce un incremento de los triglicéridos hepáticos, respecto al grupo control. Por otro lado, aquellos animales que consumieron aceite de lino con y sin DD mostraron una disminución significativa de los

triglicéridos en comparación con los grupos que consumieron otros aceites, demostrando un efecto preventivo del aceite de lino sobre la esteatosis hepática.

Se ha demostrado que el colesterol libre acumulado a nivel hepático es un factor crítico en el desarrollo de NASH, por lo que el hígado recurre a diversos mecanismos para mantener la homeostasis. En la figura 1B se muestran los niveles de colesterol total y las fracciones de colesterol libre y esterificado a nivel hepático.

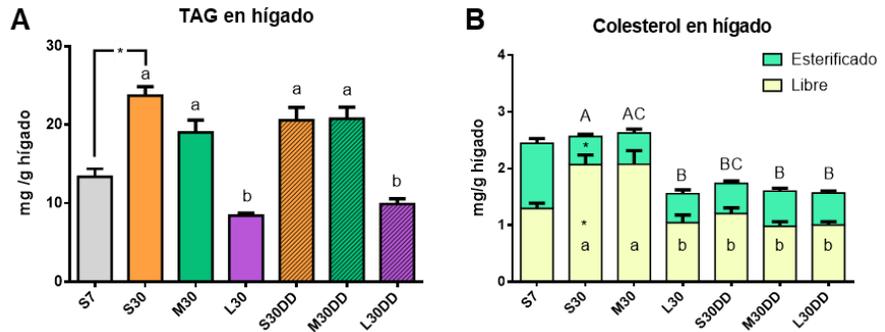


Figura 1: Triglicéridos (TAG) y colesterol en hígado

Con letras mayúsculas sobre las barras se indican diferencias significativas en el colesterol total; letras minúsculas dentro de las barras indican diferencias en las fracciones. Si bien el consumo de una dieta rica en grasa no incrementó de manera significativa el contenido de colesterol total (S30 vs. S7), se observó un aumento significativo de los niveles de colesterol libre y una disminución de los niveles de colesterol esterificado. Esto demuestra que la dieta rica en grasa altera la relación colesterol libre/esterificado, creando un ambiente propenso para la progresión de una simple esteatosis a un estadio más severo de la enfermedad de NAFLD. Entre los grupos alimentados con dietas ricas en grasa el consumo de aceite de lino redujo de manera significativa los niveles de colesterol total a expensas de una reducción del colesterol libre. Esto demuestra que, además del efecto benéfico sobre los triglicéridos hepáticos, el aceite de lino también previene la acumulación de colesterol total. Por otro lado, el agregado de DD indujo una reducción del colesterol total en S30DD y M30DD en comparación a S30 y M30, respectivamente, denotando un efecto benéfico por el agregado de TF y FE a las dietas.

Parámetros relacionados con la homeostasis del colesterol

En los mecanismos de regulación de la homeostasis del colesterol se destacan 5 procesos: biosíntesis, esterificación, captación, excreción y síntesis de ácidos biliares. El exceso de colesterol hepático es excretado a través de la bilis como tal o como sales biliares, mediado por los transportadores ABC (ATP-binding cassette): ABCG5 y ABCG8. La síntesis de ácidos biliares está regulada por las enzimas de la familia citocromo p450, CYP27A1 principalmente. Los resultados indican que el aceite de lino incrementó la expresión de ABCG5 y ABCG8 (Figura 2 A y B) y de CYP27A1 (Figura 2 E). La suplementación con DD revirtió este efecto en L30DD. Por otro lado, tanto la expresión de ABCG8, como de CYP27A1, aumentó de manera significativa en M30DD vs M30. La HMG-CoA reductasa es la enzima limitante en la síntesis de colesterol y su expresión está regulada por el factor de transcripción SREBP-2. En relación con los resultados, la expresión de HMGCR (Figura 2 C) aumentó de manera significativa en L30 vs S30. El agregado de DD revirtió este efecto. Estos resultados no se correlacionaron con la expresión de SREBP2 (Figura 2 F). La esterificación se encuentra regulada principalmente por ACAT2, la cual mantiene el balance entre el colesterol libre y ésteres de colesterol. Los niveles de mRNA de ACAT2 aumentaron de manera significativa en L30 vs S30 (Figura 2 D) y esto se vio revertido por el agregado de DD. De manera inversa, el agregado de DD indujo un aumento significativo en M30DD vs M30.

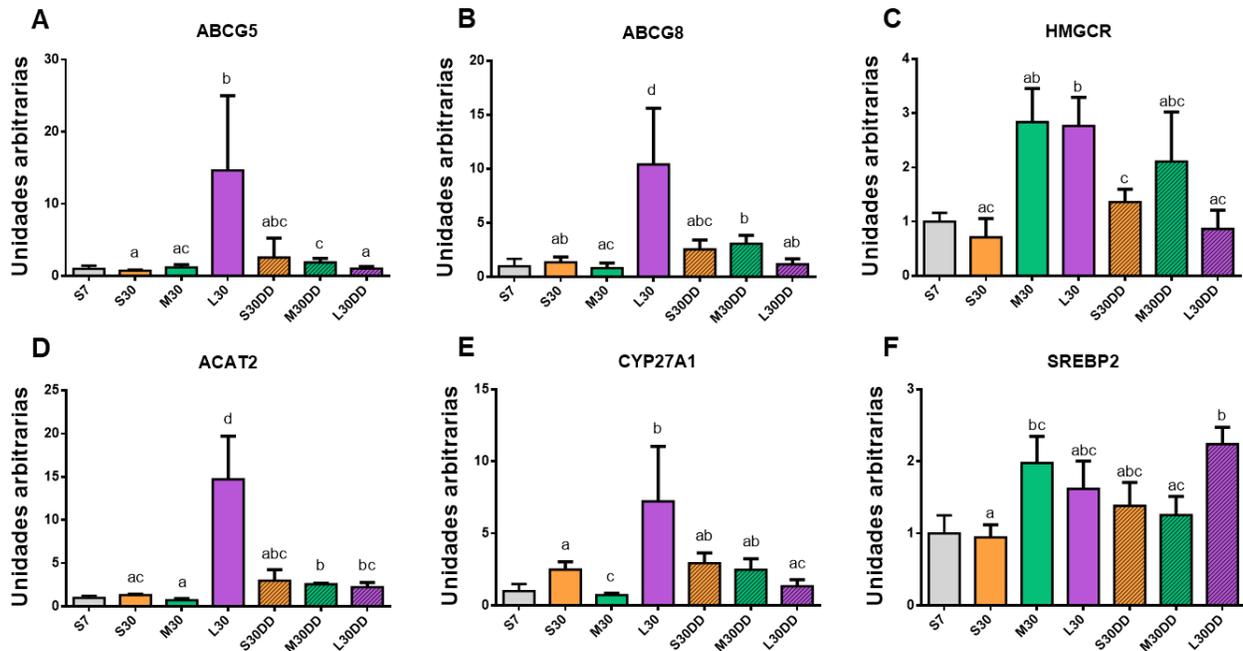


Figura 2: Parámetros relacionados a la homeostasis del colesterol

Estos resultados sugieren que el aceite de lino conduce a una disminución de colesterol hepático favoreciendo su excreción biliar ya sea como colesterol libre o sales biliares y su esterificación. Se requieren más estudios para determinar el efecto de los DD sobre los niveles de colesterol hepático.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Al-Bishri, W. M.**, 2013. Favorable effects of flaxseed supplemented diet on liver and kidney functions in hypertensive Wistar rats. *Journal of oleo science*, 62(9), 709-715.
- Cicero, A., Colletti, A., Bajraktari, G. et al.**, 2017. Lipid lowering nutraceuticals in clinical practice: position paper from an International Lipid Expert Panel. *Archives of Medical Sciences*, 13(5), 965-1005.
- Hanke, D., Zahradka, P., Mohankumar, S.K., Clark, J.L., Taylor, C.G.**, 2013. A diet high in α -linolenic acid and monounsaturated fatty acids attenuates hepatic steatosis and alters hepatic phospholipid fatty acid profile in diet-induced obese rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 89, 391-401.
- Hansen, H.H., Feigh, M., Veidal, S.S., Rigbolt, K.T., Vrang, N., Fosgerau, K.**, 2017. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development, 22(11), 1707-1718.
- Herrera, E., Barbas, C.** 2001. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of physiology and biochemistry*, 57, 43-56.
- Li, X., Xin, Y., Mo, Y., Marozik, P., He, T., Guo, H.** 2022. The bioavailability and biological activities of phytosterols as modulators of cholesterol metabolism. *Molecules*, 27(2), 523.
- Pavlisova, J., Bardova, K., Stankova, B., Tvrzicka, E., Kopecky, J., Rossmeisl, M.**, 2016. Corn oil versus lard: Metabolic effects of omega-3 fatty acids in mice fed obesogenic diets with different fatty acid composition. *Biochimie*, 124, 150-162.