

Efecto protector de la alimentación mediterránea sobre la citotoxicidad inducida por la grasa saturada en células endoteliales humanas

C. Bellido, P. Pérez-Martínez, C. Marín, P. Gómez, R. Moreno, J.A. Moreno, J. Delgado-Lista, J. López-Miranda y F. Pérez-Jiménez

Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. España.

Introducción. En la actualidad hay evidencias claras de que las lipoproteínas posprandiales ricas en triglicéridos son un factor independiente para el desarrollo de la enfermedad arteriosclerótica. Por ello, resulta interesante estudiar el efecto agudo de la ingesta de distintos tipos de grasa sobre el endotelio vascular.

Objetivo. Estudiar si las lipoproteínas posprandiales grandes, ricas en triglicéridos obtenidas tras la ingesta aguda de 3 comidas ricas en grasa de diferente origen (manteca, aceite de oliva o nueces) inducen una citotoxicidad *in vitro* diferente sobre las células endoteliales humanas.

Pacientes y métodos. Se seleccionó a 8 voluntarios normolipémicos y homocigóticos para el alelo E3 de la Apo E que recibieron una comida rica en grasa (1 g/kg de peso corporal, 60.000 U de vitamina A y 7 mg de colesterol/kg de peso), que contenía un 60% de calorías como grasa, un 15% como proteínas y un 25% como hidratos de carbono. Se llevaron a cabo extracciones en el tiempo 0 y cada hora hasta las 11 h. Las partículas grandes ($S_f > 400$) ricas en triglicéridos fueron aisladas inmediatamente tras

la obtención de plasma. Se establecieron cultivos de células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical y se determinó el grado de citotoxicidad mediante el ensayo colorimétrico de cuantificación de células muertas, basado en la medida de actividad de la lactato dehidrogenasa.

Resultados. La citotoxicidad, medida como actividad de LDH, inducida por las lipoproteínas grandes, ricas en triglicéridos obtenidas tras la ingesta de la comida rica en mantequilla ($30,35 \pm 3,07$ U/l) fue superior a la producida por la comida rica en aceite de oliva virgen ($23,08 \pm 3,81$ U/l; $p < 0,049$) y la dieta rica en nueces ($21,63 \pm 3,18$ U/l; $p < 0,012$). No se observaron diferencias significativas en la citotoxicidad producida entre la comida rica en aceite y la rica en nueces ($p < 0,763$).

Conclusiones. Nuestros datos sugieren que la ingesta de una comida grasa rica en aceite de oliva o en nueces induce una menor citotoxicidad en células endoteliales en cultivo. Este mecanismo es protector frente a la enfermedad arteriosclerótica.

Palabras clave:
Lipemia posprandial. Células endoteliales. Ingesta rica en grasas.

Este trabajo ha recibido financiación del MCYT (SAF 01/0366 a J.L.-M., SAF01/2466-C05 04 a F.P.-J.), del Ministerio de Sanidad (FIS 01/0449 a J.L.-M.) y de la Consejería de Salud, Junta de Andalucía (65/02 a J.L.-M.).

Mención Especial en el XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis, Marbella, 17 de mayo de 2003.

Correspondencia: Dr. P. Pérez-Jiménez.
Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis. Hospital Universitario Reina Sofía.
Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba. España.
Correo electrónico: fperezjimenez@uco.es

Recibido el 23 de febrero de 2004 y aceptado el 18 de noviembre de 2004.

PROTECTIVE EFFECT OF A MEDITERRANEAN-TYPE DIET ON THE SATURATED FAT-INDUCED HUMAN ENDOTHELIAL CULTURED CELLS CYTOTOXICITY

Introduction. Evidence points to elevated levels of postprandial triglyceride-rich lipoproteins as a risk factor in the development of the atherosclerotic disease. Then, it would be interesting to study the acute effect of three different meals on the vascular endothelium.

Objective. To analyze the different effects of the postprandial triglyceride-rich lipoproteins obtained during three meals on endothelial cells cytotoxicity.

Patients and methods. Eight healthy apoE 3/3 male volunteers were given a vitamin A fat-loading test (1 g of fat/kg body weight, 60,000 IU of vitamin A and 7 mg of cholesterol/kg body weight) consisting of 60% fat, 15% protein and 25% carbohydrates. Blood samples were taken at time 0 and every hour until the 11th hour. The large triglyceride-rich proteins ($S_f > 400$) were isolated from 4 ml of plasma. Human umbilical vein endothelial cells were grown and the cytotoxic effect of the large triglyceride rich proteins were measured by the colorometric assay with the quantification of dead cells and cell lysis based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH).

Results. The triglyceride rich lipoproteins from a butter-rich meal induced a higher cytotoxicity (30.35 ± 3.07 IU/L) than the particles from an olive oil-rich (23.08 ± 3.81 IU/L; $p < 0.049$) or a walnut-enrich meal (21.63 ± 3.18 IU/L; $p < 0.012$). No significant difference was found between olive oil and walnuts meals ($p < 0.763$).

Conclusions. Our data suggest that the consumption of an olive oil-enriched or a walnuts-enriched meal induced a lower cytotoxicity on endothelial cells, as a protection from atherosclerotic disease.

Key words:

Postprandial lipemia. Endothelial cells. Oil-enriched diet.

Introducción

El estado posprandial es la situación metabólica habitual en la que se encuentra el ser humano a lo largo del día, debido a que el aclaramiento de las partículas ricas en triglicéridos de origen intestinal se prolonga durante 8-12 h. Este período se caracteriza por un aumento de los triglicéridos totales y de las lipoproteínas ricas en triglicéridos de origen intestinal y hepático. Estudios previos sugieren que las partículas remanentes posprandiales tienen un valor predictivo para el desarrollo de la enfermedad coronaria^{1,2}. Sin embargo, su metabolismo muestra una gran variabilidad individual como consecuencia de varios factores, entre los que la alimentación tiene una gran importancia. El estado posprandial ha despertado gran interés desde que se descubrió que las lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRT) estaban involucradas en el desarrollo de la arteriosclerosis, por lo que muchos investiga-

dores han centrado sus estudios en el análisis del metabolismo lipoproteico, en respuesta a una alimentación grasa estandarizada.

Estudios previos han analizado la toxicidad de las LRT previamente oxidadas sobre cultivos celulares en personas sanas³. Además, Chung et al⁴, en pacientes hipertrigliceridémicos, observaron que los remanentes de las LRT eran citotóxicos sobre los macrófagos debido, en parte, a la alta concentración de ácidos grasos no esterificados que contenían. En la misma línea, Hennig et al⁵ constataron que el suero procedente de pacientes hipertrigliceridémicos alteraba la permeabilidad de la barrera endotelial. Otros estudios han observado una disminución en la viabilidad celular tras la incubación de células musculares con remanentes de quilomicrones⁶.

Ante estas evidencias, decidimos estudiar el efecto de las lipoproteínas ricas en triglicéridos grandes posprandiales obtenidas tras la ingesta aguda de 3 comidas (rica en aceite de oliva virgen, rica en mantequilla y rica en nueces) sobre las células endoteliales humanas.

Pacientes y métodos

Población

Se seleccionó a 8 voluntarios varones sanos, estudiantes de la Universidad de Córdoba, a los que se realizó una historia clínica y una exploración física completa. Ninguno presentó enfermedad crónica u obesidad, y tampoco tomaba medicación o vitaminas que pudieran afectar a los valores de lípidos. Todos fueron instruidos para que mantuvieran constantes sus hábitos de vida mientras se realizaba el estudio, que fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía.

Estudio de lipemia posprandial

Todos los participantes, durante las 4 semanas previas al estudio, tomaron una dieta típica occidental rica en grasa saturada (un 38% de grasa con un 16% ácidos grasos saturados [SAT], un 16% de ácidos grasos monoinsaturados (MONO) y un 6% de ácidos grasos poliinsaturados (POLI); un 15% de proteínas, y un 47% de hidratos de carbono) como período de homogeneización dietética. Posteriormente fueron sometidos a 3 estudios de lipemia posprandial con la misma cantidad de grasa (1 g de grasa/kg, 7 mg de colesterol/kg y 40 equivalentes/kg de peso corporal de retinol), pero distinta composición grasa. Después de 12 h de ayuno, se les administró una comida grasa con la distribución calórica siguiente: un 60% de grasa, un 15% de proteínas y un 25% de hidratos de carbono. Las 3 comidas fueron: a) comida rica en grasa monoinsaturada, cuya fuente era el aceite de oliva virgen (un 22% de SAT, un 38% de MONO, un 4% de SAT y un 0,7% de ácido α -linolénico); b) comida rica en grasa saturada compuesta principalmente por mantequilla (un 35% SAT, un 22% MONO, un 4% de POLI y un 0,7% ácido α -linolénico), y c) comida rica en grasa poliinsaturada, basada en la ingesta de nueces (un 20% de SAT, un 24% de MONO, un 16% de POLI y un 4% de ácido α -linoleico). La administración de cada comida se realizó de acuerdo con un diseño de cuadrados latinos y con una semana

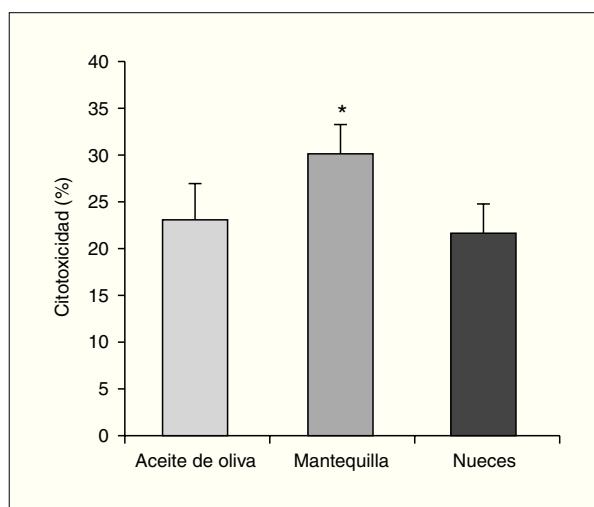


Figura 1. Porcentaje de citotoxicidad producida por las lipoproteínas ricas en triglicéridos posprandiales sobre células endoteliales humanas de cordón umbilical ($n = 8$). * $p < 0,05$ mantequilla frente a oliva y nueces. Media ± error estándar.

entre cada período. En el estado basal y cada hora hasta la hora 6 y a las 8.30 y 11.00 h, se les extrajo muestras de sangre venosa en tubos conteniendo 1 mg/ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Determinaciones bioquímicas

Inmediatamente después de la extracción sanguínea se procedió a la separación del plasma mediante centrifugación (2.500 rpm a 4 °C durante 15 min). Las partículas ricas en triglicéridos grandes (LRT grandes y lipoproteínas de muy baja densidad [VLDL] grandes, $S_f > 400$) se aislaron a partir de 4 ml de plasma recién obtenido, al que se le superponían, en capa, 0,15 mol/l de NaCl, 1 mmol/l de EDTA (pH, 7,4; densidad < 1,006 kg/l)⁷ y, posteriormente, ultracentrifugadas (20.000 rpm a 4 °C durante 30 min) en un rotor tipo Beckman 50, (Beckman Instrument, Fullerton, Estados Unidos). Las LRT grandes se recogieron en la capa superficial mediante aspiración y fueron congeladas a -80 °C.

Cultivos celulares y determinación de la citotoxicidad

Para la realización de los estudios de citotoxicidad, se utilizó la línea celular de células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (*human umbilical vein endothelial cells* [HUVEC]), obtenidas de Clonetics (Biowhittaker, Bélgica). Las células se cultivaron en medio EGM (Clonetics, BioWhittaker Inc., Bélgica) suplementado con 10 µg/ml de factor de crecimiento epitelial humano recombinado (hEGF), 1 mg/ml de hidrocortisona, 50 mg/ml de gentamicina, 50 µg/ml de anfotericina B (Clonetics, BioWhittaker, Bélgica), 3 mg/ml de extracto de cerebro bovino (BBE) y un 2% v/v de suero bovino fetal. Las células endoteliales fueron resembradas en placas de 96 pocillos a una concentración de 20.000 células/pocillo. Una vez que las células alcanzaron la confluencia se incubaron con las LRT grandes, a una concentración final de 600 nmol/ml de triglicéridos³, procedentes de cada uno de los 8 voluntarios estudiados y por duplicado, en medio sin suero de ternera fetal, pero con un 1% de albúmina bovina (BSA) (Sigma, St Louis, Estados Unidos).

Transcurridas 24 h, se recogieron 100 µl/pocillo de sobrenadante del cultivo y se procedió al estudio de la citotoxicidad inducida por las partículas, con el ensayo colorimétrico para la cuantificación de lisis y muerte celular, basado en la medida de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células dañadas y su liberación al sobrenadante (Roche Molecular Biochemicals, Alemania). Para medida de la absorbancia se utilizó un espectrómetro Spectra Fluor (Tecan, Austria), con una longitud de onda de 492 nm y, como referencia, 600 nm.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo con el programa SPSS versión 8.0 (SPSS Inc, Chicago, Estados Unidos), utilizando un análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas. Las diferencias se consideraron significativas cuando la $p < 0,05$. Los datos se encuentran expresados en media ± error estándar.

Resultados

Al analizar la toxicidad de las LRT grandes obtenidas tras la ingesta de las 3 comidas grasas sobre la línea celular endotelial humana de vena de cordón umbilical, se observó que las lipoproteínas procedentes de la comida rica en mantequilla indujeron una mayor citotoxicidad ($30,35 \pm 3,07$) frente a la que produjeron las LRT grandes obtenidas tras la ingesta de la comida rica en aceite de oliva ($23,08 \pm 3,81$; $p < 0,049$) o la de la comida rica en nueces ($21,63 \pm 3,18$; $p < 0,012$) (fig. 1). No se encontraron diferencias significativas en la citotoxicidad producida tras la comida rica en aceite de oliva y la ingesta de nueces ($p < 0,763$).

Discusión

Nuestros resultados demuestran que las LRT grandes, obtenidas tras la ingesta aguda de una comida con distinta composición grasa, inducen una diferente citotoxicidad sobre las células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC). Cuando se incubaron dichas células con las partículas obtenidas tras la ingesta de mantequilla, la citotoxicidad fue significativamente superior a la obtenida con la ingesta de la comida rica en aceite de oliva y la rica en nueces. En un estudio previo de lipemia posprandial, Mabile et al.³ investigaron el efecto citotóxico de las lipoproteínas ricas en triglicéridos oxidadas tras la ingesta de 3 dietas con diferente contenido graso (dieta rica en SAT, en MONO o en POLI), sobre células endoteliales y mononucleares humanas. La citotoxicidad obtenida tras la ingesta de MONO fue significativamente inferior a la que produjo la dieta rica en SAT, pero las LRT grandes procedentes de la dieta rica en POLI indujeron una mayor citotoxicidad. En nuestro estudio encontramos también una menor citotoxicidad en relación con la ingesta de aceite de oliva virgen y, a diferen-

cia del estudio previo, también observamos una menor citotoxicidad tras la ingesta aguda de nueces. Este hecho podría explicarse, en parte, por el empleo de partículas nativas, lo que reproduce mejor lo que sucede *in vivo*, ya que en el trabajo citado oxidaban previamente las LRT grandes. En un estudio reciente realizado sobre esta misma población, en el que se analizaba la activación posprandial de NF-κB, se observó que los triglicéridos totales y los triglicéridos en las LRT grandes aumentaban significativamente en la hora 3 ($p < 0,001$), pero no se encontraron diferencias entre las concentraciones de dichas partículas en las 3 comidas⁸, y se pudo relacionar la citotoxicidad producida por dichas partículas a su composición lipídica y no a su concentración.

Estudios *in vitro* han analizado este efecto protector del aceite de oliva intentando establecer si es el ácido oleico o los polifenoles los que inducen el efecto beneficioso. Hennig et al⁵ analizaron el efecto de la incubación de células vasculares con ácidos grasos de 18 carbonos con diferente saturación: ácido esteárico (18:0), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6) y linolénico (18:3n-3). Las células incubadas con ácido oleico no redujeron los valores de glutatió, cuya disminución está asociada a un aumento del estrés oxidativo, mientras que el ácido esteárico y el linoleico lo disminuyeron, y el ácido linolénico no afectó sus valores intracelulares. Mabile et al³ ya observaron que los quilomicrones procedentes de una dieta rica en MONO, cuya fuente principal era el aceite de oliva, tenían menos capacidad para oxidarse que los procedentes de una dieta rica en POLI y, por tanto, la citotoxicidad sobre células en cultivo era menor. Estos datos están en concordancia con los obtenidos en nuestro estudio, ya que la comida rica en aceite de oliva, con un alto contenido en ácido oleico y MONO, produjo una menor citotoxicidad. No obstante, sería interesante estudiar si este efecto favorable se mantiene cuando la ingesta se realiza de forma crónica.

En conclusión, la ingesta aguda de una comida rica en aceite de oliva virgen y rica en nueces ejerce un papel protector sobre el endotelio, al inducir una menor citotoxicidad que la comida rica en mantequilla, lo que sugiere un menor daño endotelial.

Agradecimientos

Agradecemos a la Sociedad Española de Arteriosclerosis la mención especial otorgada a este estudio en el XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (Marbella, 17 de mayo de 2003).

También queremos expresar nuestro agradecimiento a Canoliva (Antonio Cano e Hijos, S.A., Luque, Córdoba), que generosamente ha donado el aceite de oliva virgen; a los voluntarios que han participado en el estudio, y a los Dres. Miguel Arias y M. del Mar Lucena, por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

Bibliografía

1. Patsch JR, Miesenbock G, Hopferwieser T, Muhlberger V, Knapp E, Dunn JK, et al. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler Vasc Biol.* 1992;12:1336-45.
2. Kugiyama K, Doi H, Takazoe K, Kawano H, Soejima H, Mizuno Y, et al. Remnant lipoprotein levels in fasting serum predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1999; 99:2858-60.
3. Mabile L, Salvayre R, Bonnafé MJ, Nègre-Salvayre A. Oxidizability and subsequent cytotoxicity of chylomicrons to monocytic U937 and endothelial cells are dependent on dietary fatty acid composition. *Free Radic Biol Med.* 1995;19:599-607.
4. Chung BH, Tallis GA, Simon Cho BH, Segrest JP, Henkin Y. Lipoprotein-induced partitioning of free fatty acids. *J Lipid Res.* 1995; 36:1956-70.
5. Hennig B, Chung BH, Watkins BA, Alvarado A. Disruption of endothelial barrier function by lipolytic remnants of triglyceride-rich lipoproteins. *Atherosclerosis.* 1992;95:235-47.
6. Yu KCW, Mamo JCL. Killing of arterial smooth muscle cells by chylomicron remnants. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220:68-71.
7. Losow WJ, Lindgren FT, Murchio JC, Stevens GR, Jensen LC. Particle size and protein content of six fractions of the Sf 20 plasma lipoproteins isolated by density gradient centrifugation. *J Lipid Res.* 1969;10:68-76.
8. Bellido C, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, Pérez-Martínez P, Muriana FJ, Martín-Ventura JL, et al. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappa B in peripheral blood mononuclear cells from healthy male volunteers *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1487-91.