

## Efecto hipercolesterolémico de la cantaxantina y la astaxantina en ratas

*Enrique Murillo*

Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Panamá

**RESUMEN.** Tres grupos de ratas de la raza Wistar (130-140 g) fueron alimentadas durante 30 días con dietas sintéticas que contenían 0.1% de  $\beta$ -caroteno, cantaxantina y astaxantina respectivamente. Otro grupo alimentado con la dieta sintética, sin carotenoide, fue utilizado como control. Los resultados demostraron que el  $\beta$ -caroteno no induce cambios en el colesterol plasmático ( $49,7 \pm 3,6$  mg/dl), mientras que la cantaxantina y la astaxantina promueven el aumento del colesterol ( $92,1 \pm 3,6$  y  $66,1 \pm 5,1$  mg/dl). Este aumento se refleja principalmente en la fracción HDL de las lipoproteínas. La cantaxantina tiene mayor afinidad que la astaxantina por el hígado, principal sitio de catabolismo de las lipoproteínas. Debido a que el  $\beta$ -caroteno no induce cambios en el colesterol plasmático, sugerimos que el efecto hipercolesterolémico de estas xantofilas no se relaciona con mecanismos reportados para los carotenoides en mamíferos.

**SUMMARY.** Hypercholesterolemic effects of canthaxanthin and astaxanthin in rats. Three groups of male Wistar rats (130-140 g) were fed 30 days with a synthetic diets containing 0,1% of  $\beta$ -carotene, canthaxanthin and astaxanthin respectively. Another group was fed with a synthetic diet without carotenoids. The results shows that the  $\beta$ -carotene does not induce change in plasma cholesterol ( $49, 7 \pm 3,6$  mg/dl), but canthaxanthin and astaxanthin induce a significant increase in cholesterol concentration ( $92,1 \pm 3,6$  and  $66,1 \pm 5,1$  mg/dl). This increase is noted mainly in the HDL fraction of the lipoproteins. Canthaxanthin has more affinity than astaxanthin for the liver, principal site of lipoproteins catabolism. The hipercholesterolemic effect of these xanthophylls is not related to reported mechanisms of carotenoids in mamalian, because  $\beta$ -carotene does not induce changes in plasma cholesterol.

### INTRODUCCION

Tradicionalmente sólo los carotenoides precursores de la vitamina A han sido considerados importantes en la alimentación de los mamíferos. Sin embargo, recientemente todo el grupo de los carotenoides ha despertado el interés de numerosos investigadores, debido a que estos compuestos han demostrado gran eficiencia en prevenir la proliferación de radicales libres, generados en sistemas biológicos (1,2). Además estudios epidemiológicos y de laboratorio sugieren que los carotenoides pueden ayudar en la prevención del cáncer (3,4) y en general de patologías cuyo origen se asocia con los radicales libres (5,6).

Amen y Lachance (7) encontraron que el  $\beta$ -caroteno disminuye el colesterol sérico, en ratas, sin presentar infor-

mación sobre la biodisponibilidad de los carotenoides utilizados. Sin embargo, recientemente se han publicado diversos estudios epidemiológicos sugiriendo que existe una correlación positiva entre la concentración plasmática de colesterol y la de carotenoides. En la mayoría de estos estudios se ha encontrado que la concentración de carotenoides correlaciona principalmente con el colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (8,9,10). Aunque Goodman (11) señala que los individuos con altos niveles de colesterol y lipoproteínas de baja densidad (LDL), tienden a tener altos niveles de carotenoides, debido a que estos compuestos son transportados por las LDL. Adams y colaboradores (10) postulan que la conocida relación entre bajos niveles plasmáticos de colesterol y aumento en el riesgo de cáncer, se debe indirectamente a

una disminución en los niveles de carotenoides. No conocemos otros estudios controlados, con humanos o animales, tratando de establecer la existencia de una relación causa efecto entre los carotenoides de la dieta y el colesterol plasmático.

El propósito de este estudio fue determinar si el  $\beta$ -caroteno, la astaxantina y la cantaxantina administrados en una formulación de alta biodisponibilidad, tienen efectos sobre los niveles de colesterol plasmático, en ratas.

## MATERIALES Y METODOS

### Animales y dietas

En el presente estudio utilizamos veinticuatro ratas macho de la raza Wistar, pesando 125-135 g, que fueron alimentadas desde el destete con la dieta estándar de nuestro laboratorio, preparada con la composición recomendada por Kanapka (12). Los animales fueron divididos en cuatro grupos de 6 ratas cada uno y se colocaron en jaulas individuales con libre acceso a la comida y el agua.

Durante 30 días los cuatro grupos fueron alimentados con las dietas basal sintética (B),  $\beta$ -caroteno 0.1% (C), cantaxantina 0.1% (Cx) y astaxantina 0.1% (Ax), respectivamente. La dieta basal sintética fue preparada con la composición que aparece en la Tabla 1. Mientras las dietas C, Cx y Ax se prepararon adicionando, por cada 99 g de dieta basal, 1.0g de mezcla al 10% del carotenoide respectivo, obtenidos en forma hidrosoluble de Hoffman - La Roche. Estos carotenoides se encuentran dispersos en una matriz de almidón, gelatina, sacarosa, aceite vegetal, dl- $\alpha$ -tocoferol y palmitato de ascorbilo.

TABLA 1  
COMPOSICION DE LA DIETA BASAL

Ingredientes	g/100 g
Caseína	20,0
DL-metionina	0,3
Almidón	52,9
Azúcar	15,0
Celulosa	1,0
Aceite vegetal	3,0
Aceite de pescado <sup>b</sup>	3,0
Mezcla de minerales <sup>a</sup>	3,5
Mezcla de vitaminas <sup>a</sup>	1,0
Hidrocloreto de colina	0,3
	100,0

<sup>a</sup> Mezcla AIN -76, basadas en los requerimientos de minerales y vitaminas para ratas del National Research Council (13).

<sup>b</sup> Aporta los ácidos grasos de la familia  $\omega$ 3, deficientes en el aceite vegetal utilizado.

Al finalizar el período experimental (30 días) los animales fueron sometidos a un ayuno de 16 horas, luego se anestesiaron ligeramente con éter y se extrajeron aproximadamente 10 ml de sangre de la aorta abdominal. Además, de cada rata fueron extraídos el hígado, los pulmones, los riñones y una muestra de tejido adiposo del epidídimo.

### Métodos analíticos

El plasma fue separado por centrifugación a 1500 x g durante 20 minutos, utilizando la sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético como anticoagulante (1mg/ml de sangre). Se determinó el colesterol total plasmático (Ct) por el método enzimático colorimétrico CHOD-PAP, obtenido comercialmente como Kit de Merck Darmstadt, Boehringer Mannheim. El colesterol ligado a las HDL (HDL-C) se determinó en el sobrenadante del plasma, después de separar las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y LDL por precipitación selectiva con fosfotungsteno/Mg Cl<sub>2</sub> (14). El colesterol en las VLDL + LDL se determinó calculando la diferencia entre Ct y HDL-C.

Para la determinación del colesterol en hígado, primero se prepararon homogenizados con agua destilada (1:10). Los lípidos fueron extraídos del homogenizado con una mezcla cloroformo: metanol (2:1), de acuerdo con el procedimiento descrito por Folch y colaboradores (15). Una alícuota de la capa clorofórmica fue evaporada y en el residuo se determinó el colesterol por el método enzimático.

Los carotenoides en el plasma fueron determinados utilizando como base el método de extracción recomendado por la IVACG (16). La absorbancia fue leída en éter de petróleo a 450nm para  $\beta$ -caroteno, 466 nm para cantaxantina y 469 nm para astaxantina, en un Spectronic 21 de Bausch & Lomb. El contenido de carotenoides fue determinado utilizando el valor de  $A_{1cm}^{1\%}$ , en éter de petróleo, para cada carotenoide (17)

El contenido de carotenoides en los tejidos (hígado, pulmón, riñón y tejido adiposo) fue determinado por un procedimiento adaptado de los trabajos de Britton (17) y Krinski y Welandkiwar (18). Se homogenizó 1g de tejido con 5 ml de acetona, bajo luz tenue. El homogenizado se filtró y se repitió la extracción del residuo con acetona fresca, hasta que no fue removido más pigmento. La solución de acetona se evaporó hasta aproximadamente 5 ml bajo una atmósfera de nitrógeno. El extracto de acetona fue mezclado con un volumen igual de éter de petróleo y se adicionó NaCl 8%, en cantidad suficiente para hacer una mezcla acetona agua 50% (v/v). El extracto etéreo se lavó dos veces con NaCl 8% para eliminar la acetona. Los carotenoides fueron cuantificados espectrofo-

tométricamente, en el extracto etéreo, como se indicó para el plasma.

#### Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza para la comparación de las medias y se determinó la diferencia mínima significativa para establecer cuáles medias difieran a un  $P < 0,05$  (19).

### RESULTADOS

El consumo de alimento y aumento de peso de las ratas alimentadas durante 30 días con las dietas descritas previamente, se presenta en la Tabla 2. Se puede observar que no hay diferencias entre los grupos de dieta.

TABLA 2  
CONSUMO DE ALIMENTO Y AUMENTO DE PESO EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS CONTENIENDO  $\beta$ -CAROTENO, CANTAXANTINA Y ASTAXANTINA

Dieta	Consumo de alimento	Aumento de peso
	g/30 días	g/30 días
B	447 $\pm$ 25*	123 + 9
C	485 $\pm$ 30	116 $\pm$ 5
Cx	478 $\pm$ 18	112 $\pm$ 10
Ax	460 $\pm$ 21	118 $\pm$ 7

\* media  $\pm$  error estándar

La Tabla 3 presenta el efecto de las dietas que contienen diferentes carotenoides, sobre la concentración de colesterol plasmático y hepático. Se demuestra que la dieta que contiene  $\beta$ -caroteno no induce cambios en la concentración de colesterol plasmático, comparada con la dieta basal. Sin embargo, las dietas que contienen cantaxantina y astaxantina promueven el aumento en la concentración de colesterol plasmático, siendo mayor el efecto de la cantaxantina. El aumento en el colesterol plasmático, inducido por la cantaxantina de la dieta, se da en las fracciones HDL y LDL + VLDL de las lipoproteínas. La astaxantina sólo causa aumento en el colesterol ligado a las HDL. Los carotenoides estudiados no afectan el contenido de colesterol hepático.

La Tabla 4 presenta el contenido de carotenoides del plasma y la acumulación de estos en diferentes tejidos. No hay diferencias en la concentración de carotenoides del plasma entre los grupos de dietas. La cantaxantina y el  $\beta$ -caroteno se acumula principalmente en el hígado. Mientras que la astaxantina se acumula preferencialmente en el tejido adiposo.

### DISCUSION

Los resultados de este estudio demuestran que la cantaxantina y las astaxantina pueden inducir aumentos en el colesterol plasmático de ratas, mientras que el  $\beta$ -caroteno no tiene efecto. Además el potencial hipercolesterolémico de la cantaxantina es superior al de la astaxantina.

La correlación positiva entre los niveles de colesterol y de carotenoides séricos, demostrada en estudios epidemiológicos, frecuentemente ha sido explicada por la capacidad que tienen las lipoproteínas de transportar a los carotenoides (8,9,11). Sin embargo, estos resultados sugieren que la existencia de una relación causa efecto, ya que algunos carotenoides de la dieta podrían inducir aumentos en la concentración de colesterol plasmático.

Amen y Lachance (7) fallaron en detectar el efecto hipercolesterolémico de la cantaxantina, probablemente debido a la baja biodisponibilidad de la preparación del carotenoide utilizada. En ese estudio los animales excretaron grandes cantidades de cantaxantina en los heces. Nosotros utilizamos preparaciones hidrosolubles de carotenoides (tipo CWS) de alta biodisponibilidad, lo cual se demuestra por las altas concentraciones encontradas en el hígado.

La afinidad de la cantaxantina por el tejido hepático fue muy superior a la demostrada por la astaxantina, la cual se acumula preferiblemente en el tejido adiposo. Esto podría explicar, al menos en parte, las diferencias observadas entre las xantofilas, ya que el hígado es el órgano más importante en relación con el metabolismo del colesterol.

La información obtenida plantea un novedoso modelo de hipercolesterolémia, debido a que en ratas es difícil inducir aumentos del colesterol plasmático, a través de la dieta. En la rata el colesterol es transportado principalmente por HDL y aún aquellas dietas ricas en colesterol no disminuyen la capacidad de captación de las LDL por los receptores hepáticos (20). Brown y colaboradores (21) han demostrado que en estos animales, sólo se puede provocar hipercolesterolémia disminuyendo los receptores hepáticos de las LDL. Así, es probable que el efecto hipercolesterolémico de la cantaxantina y la astaxantina sea mediado por una disminución del número de receptores hepáticos a las LDL o a una disminución en su capacidad de captar estas lipoproteínas.

Debemos ser cautelosos al evaluar el aumento del colesterol plasmático inducido por las xantofilas, en términos del riesgo de desarrollar aterosclerosis. Investigaciones recientes sugieren que las sustancias que son antioxidantes biológicos, tales como los carotenoides, pueden prevenir la formación de ateromas por diversos mecanismos (22, 5). Además, el riesgo de desarrollar aterosclerosis en humanos, correlaciona positivamente con el colesterol ligado a

las LDL (23), mientras que en los animales estudiados las xantofilas inducen principalmente aumentos en el colesterol ligado a las HDL. Sería interesante conocer el efecto de la cantaxantina en conejos, ya que en estos animales el colesterol plasmático se distribuye, en las diferentes fracciones de lipoproteínas, de manera similar que en los humanos y es excelente modelo para estudiar aterosclerosis experimental (24).

TABLA 3  
COLESTEROL EN EL PLASMA E HIGADO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS CONTENIENDO  $\beta$ - CAROTENO, CANTAXANTINA Y ASTAXANTINA

Dietas	Colesterol total	Plasma HDL Colesterol	LDL+VLDL Colesterol	Hígado Colesterol total
	mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/g
B	51,7 $\pm$ 1,9 <sup>*a</sup>	42,4 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	12,5 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	6,7 $\pm$ 0,5
C	49,7 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	39,9 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	9,8 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	6,5 $\pm$ 0,8
Cx	92,1 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>	69,5 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup>	25,5 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>	6,9 $\pm$ 0,5
Ax	66,1 $\pm$ 5,1 <sup>c</sup>	57,0 $\pm$ 4,4 <sup>c</sup>	9,6 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	6,9 $\pm$ 0,7

\* Media  $\pm$  error estándar

Medias con letras diferentes, en las columnas, son estadísticamente diferentes (P < 0,05)

TABLA 4  
CAROTENOIDES EN EL PLASMA Y TEJIDOS DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS QUE CONTIENEN  $\beta$ - CAROTENO, CANTAXANTINA Y ASTAXANTINA

Dietas	Plasma ng/ml	Hígado $\mu$ g/g	Riñón $\mu$ g/g	Pulmón $\mu$ g/g	Tejido adiposo $\mu$ g/g
B	116 $\pm$ 24 <sup>*</sup>	1,1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,87 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,86 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
C	101 $\pm$ 20	47,8 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	1,37 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	0,92 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
Cx	125 $\pm$ 26	259,5 $\pm$ 24,5 <sup>c</sup>	3,2 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	2,75 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	6,59 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>
Ax	95 $\pm$ 22	7,2 $\pm$ 1,4 <sup>d</sup>	3,33 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>	2,21 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	10,65 $\pm$ 0,89 <sup>c</sup>

\* Media  $\pm$  error estándar

Medias con letras diferentes, en las columnas, son estadísticamente diferentes (P < 0,05)

## REFERENCIAS

1. Krinsky, N.I. & S.M. Deneke-Interaction of oxygen and oxy-radical with carotenoids. *J. Natl. Cancer Inst.*, 27:205-210, 1982.
2. Burton, G.W. & K.W. Ingold- $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 224:569-573, 1984.
3. Peto, R., R. Doll, J. D. & M.B. Sporn-Can dietary  $\beta$ -carotene materially reduce human cancer rates, *Nature*. 290:201-208, 1981.
4. Mathews-Roth, M.M. & H.I. Krinski-Carotenoids affect development of UV-B induced skin cancer. *Photochem. Photobiol.* 46:507-509, 1987.
5. Marx, J.L. -Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science*. 235:529-531, 1987.
6. Slater, T.F., K.H. Cheeseman, M.J. Davis, K. Proudfoot & W. Xin-Free radical mechanism in relation to tissue injury. *Proce. Nutr. Soc.* 46:1-12, 1987.
7. Amen, R.J. & P.A. Lachance - The effect of  $\beta$  carotene and canthaxanthin on serum cholesterol in the rat. *Nutr. Rep. Inter.* 10:269-277, 1974.
8. Mamerah, C.A. & D. Hassal-Hypocolesterolemia and non-cardiovascular subjects with low plasma cholesterol concentrations. *Br. Med. J.* 286:1603-1606, 1983.
9. Stähelin, H.B., F. Rösel, E. Buess & G. Brubacher-Cancer vitamins and plasma lipids: prospective basal study. *J. Natl. Cancer Inst.* 73:1463-1468, 1984.
10. Adams, L.L., R. E. Laporte, L.O. Watkins, D.D. Savage, M.B. Bates, J.A. D'Antonio & L.H. Kuller-The association of lipoprotein cholesterol with vitamin A. *Cancer*, 56:2593-2597, 1985.
11. Goodman, D.S.-Overview of current knowledge of metabolism of vitamin A & carotenoid. *J. Natl. Cancer Inst.* 73:1375-1379, 1984.
12. Knapka, J.J., K.P. Smith & F.J. Judge-Effect of open and close formula, rations on the performance of three strain laboratory mice. *Lab. Anim. Sc.* 24:480-487, 1974.
13. National Research Council, Nutrient requirements of laboratory animals N° 10, 2nd. ed. Washington, D.C. National Academy Sciences, 1972.
14. Lopes-Verella, M.F., P. Stone, E. Ellis & J.A. Colwell-Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin. Chem.* 23:882-884, 1977.
15. Folch, J., M. Lees & G.H.S. Sloane-Stanley- Simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509, 1957.
16. International Vitamin A Consultive Group. *Biochemical Methodology for the assessment of vitamin A status*. Washington, D.C. The Nutrition Foundation, 1982, p. 56.
17. Krinsky, N.I. & S. Wełankiwar-Assay of carotenoids. *Meth. Enzimol.* 105:1550162, 1984.
18. Britton, G.-General carotenoid methods. *Meth. Enzimol.* 111:113-149, 1985.
19. Snedecor, G.W. & W.G. Cochran-Statistical Methods. 6th. ed. Ames. Iowa University Press, 1969, p. 258-298.
20. Goldstein, J.L. & M.S. Brown - Progress in understanding the LDL receptor & HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulated the plasma cholesterol. *J. Lipid Res.* 25:1450-1461, 1984.
21. Brown, M.S., P.T. Kovanen & J.L. Goldstein-Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*. 212:628-635, 1981.
22. Bond, H.A., A.M. Gown, H.L. Yang, E.P. Bending & M. R. Juchau-Further investigation of the capacity of polynuclear aromatic hydrocarbons to elicit atherosclerotic lesion. *J. Toxicol. Environ. Health.* 7:327-335, 1983.
23. Goldstein, J.L. & M.S. Brown-Low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46:897-930, 1977.
24. Terpsta, A.H., R.J.H. Hermus & C.E. West-The role of dietary protein in cholesterol metabolism. *Wld. Rev. Nutr. Diet.* 42:1-55, 1983.