

Efecto de una dieta alta en grasas en el proceso de formación de cálculos biliares de colesterol

REGINALD DEL POZO^{1,a}, LORENA MARDONES^{1,b},
MARCELO VILLAGRÁN^{1,b}, KATIA MUÑOZ^{1,c}, SUSANA ROA^{1,d},
FRANCISCA ROZAS^{1,d}, VALESKA ORMAZÁBAL^{2,b}, MIRNA MUÑOZ^{1,e}

Effect of a high-fat diet on cholesterol gallstone formation

Background: It is known that some nutrients play an important role in the development of cholelithiasis. Cholesterol is carried by micelles and vesicles in the bile. During the first stage of gallstone formation, cholesterol crystals derive from thermodynamically unstable vesicles. **Aim:** To determine the effect of a high fat diet on blood lipids and bile composition, and its implication in the formation of gallstones. **Material and Methods:** Two groups of 15 BALB/c mice each, coming from the same litter, were treated with a control or with a high-fat diet (64% fat and 0.14% cholesterol). After two months, the animals were sacrificed, blood and bile samples were obtained. Serum glucose and the corresponding lipid profiles were measured. In bile samples, cholesterol and phospholipid levels were analyzed, and cholesterol transporters (vesicles and micelles) were separated by gel filtration chromatography. **Results:** Treated animals showed an 87% increase in serum total cholesterol ($p < 0.01$), a 97% increase in HDL-cholesterol ($p < 0.05$) and a 140% increase in LDL-cholesterol ($p < 0.05$). No changes in serum triglycerides or glucose were observed. In bile, a 13% increase in biliary cholesterol ($p < 0.05$) was observed but no change in biliary phospholipids. Also, an increase in biliary vesicular transporters and an increase of cholesterol/phospholipid ratio in vesicular transporters were observed. **Conclusions:** A high fat diet may contribute to the formation of gallstones in our experimental model.

(Rev Med Chile 2017; 145: 1099-1105)

Key words: Cholelithiasis; Dietary Fats; Lipid Metabolism.

La litiasis biliar es considerada una patología metabólica multifactorial, siendo la dieta un factor importante en el desarrollo de esta patología. Al respecto, existen antecedentes que sugieren que una dieta alta en grasas es un probable factor predisponente para el desarrollo de litiasis biliar. Sin embargo, aun no se ha dilucidado el impacto que ejercen dietas altas en grasas en los lípidos biliares, debido a diferencias en el metabolismo lipídico inherentes al huésped, en el momento de la intervención dietética. Se han realizado

estudios metabólicos en sujetos con perfil lipídico en el rango normal e hiperlipidémicos, con y sin cálculos vesiculares, pero sin lograr obtener un patrón consistente^{1,2}. Inicialmente se postuló, que la adición de grasas en dietas destinadas a reducir el peso corporal, podrían disminuir la incidencia de colelitiasis, al potenciar la contractibilidad de la vesícula biliar³. Sin embargo, se han reportado resultados contradictorios, indicando que la elevada contractibilidad vesicular por alta ingesta de grasas, no es suficiente explicación para la coleli-

¹Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad Católica de la Santísima Concepción. Concepción, Chile.

²Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Farmacología, Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

^aDr. rer. biol. hum.

^bDr. Ciencias Biológicas.

^cQuímico Analista.

^dTesista Nutrición y Dietética.

^eMagíster en Bioquímica Clínica e Inmunología.

La presente investigación fue parcialmente sustentada con fondos de la Dirección de Investigación de la Universidad Católica de la Santísima Concepción (Proyecto DIN 11/2014).

Los autores no declaran conflicto de interés.

Recibido el 31 de marzo de 2017, aceptado el 29 de agosto de 2017.

Correspondencia a:
Reginald del Pozo
Departamento Ciencias Básicas
Facultad de Medicina
Universidad Católica de la Santísima Concepción
Alonso de Ribera 2850.
Concepción, Chile.
rpozo@ucsc.cl

tiasis generada por una rápida reducción de peso⁴. Se ha logrado establecer, que una dieta excesiva en colesterol, es un factor predisponente a hiperlipidemia, y puede inducir una sobresaturación de la bilis y formación de cálculos vesiculares. Sin embargo, el tipo de dieta grasa, y específicamente ciertos ácidos grasos, pueden también influenciar la colelitiasis⁵⁻⁸. Ensayos realizados en un modelo animal de conejos con hipercolesterolemia, señalan que la ingesta de una dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados, logran normalizar los porcentajes de lípidos biliares, reduciendo el índice litogénico; por el contrario, una dieta alta en ácidos grasos ω -3-poliinsaturados incrementaron el índice litogénico⁹. En hámsteres se ha informado, que la incorporación de ácidos grasos saturados a la dieta incrementan los efectos litogénicos^{10,11}. En consecuencia, los antecedentes bibliográficos parecen indicar que el grado de saturación de ácidos grasos dietéticos afecta el metabolismo de diferentes lípidos biliares, alterando su secreción y contenido biliar, pero aun no existe certeza cómo y cuándo ocurren estos cambios.

La primera etapa en el proceso de formación de cálculos vesiculares de colesterol, es la presencia de una bilis sobresaturada con colesterol, seguida de la formación de cristales de colesterol, los cuales posteriormente se agregan y crecen para constituir finalmente el cálculo macroscópico. El proceso de cristalización se genera cuando se excede la capacidad de los transportadores micelares de solubilizar el colesterol biliar, formándose transportadores vesiculares, que son termodinámicamente inestables, derivando en la producción de cristales de colesterol¹²⁻¹⁴.

Con el fin de definir la influencia de lípidos dietéticos sobre la predisposición al desarrollo de colelitiasis, estudiamos el efecto de una dieta alta en grasas en la composición lipídica de los transportadores vesiculares y micelares de colesterol biliar en ratones BALB/c.

Material y Método

Diseño metodológico

El diseño utilizado en este estudio fue de tipo cuantitativo experimental prospectivo.

Animales

Como modelo experimental se utilizaron 30 ratones albinos machos de cepa BALB/c, por su fá-

cil manejo, presentar un genoma muy similar al de los humanos, y principalmente por poseer vesícula biliar¹⁵. Los animales fueron adquiridos del Instituto de Salud Pública (ISP), de 5 semanas de edad, con un peso promedio de 20 g. Se distribuyeron aleatoriamente en jaulas metabólicas (5 ratones/jaula), en 2 grupos: un grupo control (n = 15), y otro tratado con dieta rica en grasas (n = 15). Los animales fueron mantenidos en el bioterio de nuestra Facultad, con control de la temperatura a 20 °C y ciclos de 12 h luz/oscuridad. Recibieron agua y alimentos de una composición definida *ad libitum*, con monitoreo de los pesos corporales e ingesta de alimento, al menos, 2 veces por semana. Luego de 8 semanas los ratones de ambos grupos fueron sacrificados, previo ayuno de 12 h, obteniéndose muestras sanguíneas y biliares. Los animales fueron mantenidos conforme a normas internacionales dadas por la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio", publicada por el *National Institute of Health*¹⁶.

Dieta

Se utilizó como alimento base (grupo control) un pellet comercial marca Champion®, compuesto por 20,0% de proteína, 9,2% de grasa, 54,6% de hidratos de carbono, y 6,2% de fibra (Tabla 1). Los ingredientes que componen este pellet son: maíz, harina de trigo, harina de soya, afrechillo de trigo, harina de pescado, harina de carne, harina de alfalfa, vitaminas y minerales (vitaminas A, C, D, E, K, B₁, B₆, B₁₂, niacina, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, fosfato bicálcico, carbonato de calcio, manganeso, cobalto, cobre, zinc, yodo, hierro, magnesio, potasio). A la dieta alta en grasa, por 100 g de alimento base, se adicionó: 91 g de manteca de cerdo (marca Palmin®) y 117 g de mantequilla (marca Calo®) (Tabla 1).

Análisis de lípidos plasmáticos

Los lípidos plasmáticos (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicéridos) fueron cuantificados mediante métodos enzimáticos, utilizando reactivos Labtest¹⁷.

Separación de transportadores de colesterol biliar: vesículas y micelas

Debido al reducido volumen de bilis en ratones (aprox. 100 μ l/ratón), realizamos las determinaciones en una mezcla de bilis proveniente de 5 ratones idénticamente tratados. Para ello los trans-

Tabla 1. Composición de dietas experimentales

Contenido	Dieta control (g/100 g)	Dieta alta en grasa (g/100 g)
Energía (kcal/100 g)	387	674
Proteínas	20,0	6,8
Hidratos de carbono disponibles	54,6	18,1
Grasa total:	9,2	63,7
Grasa saturada	1,0	34,1
Grasa monoinsaturada	2,9	21,5
Grasa poliinsaturada	5,3	6,6
Colesterol	0	0,125
Sodio	0	0,005
Fibra	6,2	2,0

portadores vesiculares fueron separados de los transportadores micelares mediante cromatografía de filtración en gel¹⁸. Las bilis nativas fueron centrifugadas a 11.200 g x 10 min, y del sobrenadante se aplicaron 20 µl sobre una columna (30 x 1,5 cm) conteniendo Bio-Gel A-5m (rango operación: 10 a 5.000 kDa). Las fracciones cromatográficas (0,3 ml/fracción; flujo: 0,5 ml/min) se obtuvieron luego de eluir con buffer Tris-HCl 20 mM (pH: 8,0), NaCl 140 mM, azida sódica 3 mM, conteniendo colato de sodio 5 mM para prevenir la disrupción de los transportadores micelares.

Análisis de lípidos biliares

El colesterol en las bilis, y en las fracciones cromatográficas, se cuantificó utilizando un método químico¹⁹ y un método enzimático¹⁷, respectivamente. Los fosfolípidos en bilis y fracciones cromatográficas fueron determinados mediante el análisis de fósforo inorgánico²⁰.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como valores promedio ± DS. Se utilizó el test t-Student, para variables independientes con distribución normal, para establecer los niveles de significancia estadística entre los distintos grupos analizados. Valores de p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos (GraphPad software 2017).

Reactivos

Se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO) los siguientes reactivos: colato de sodio, colesterol, fosfatidilcolina, azul de dextrano. El Bio-Gel A-5m se adquirió de Bio-Rad.

Resultados

Al cabo de 8 semanas de consumir una dieta alta en grasas, los ratones registraron una significativa disminución en el peso corporal de 15% comparados con los controles (Figura 1), sin

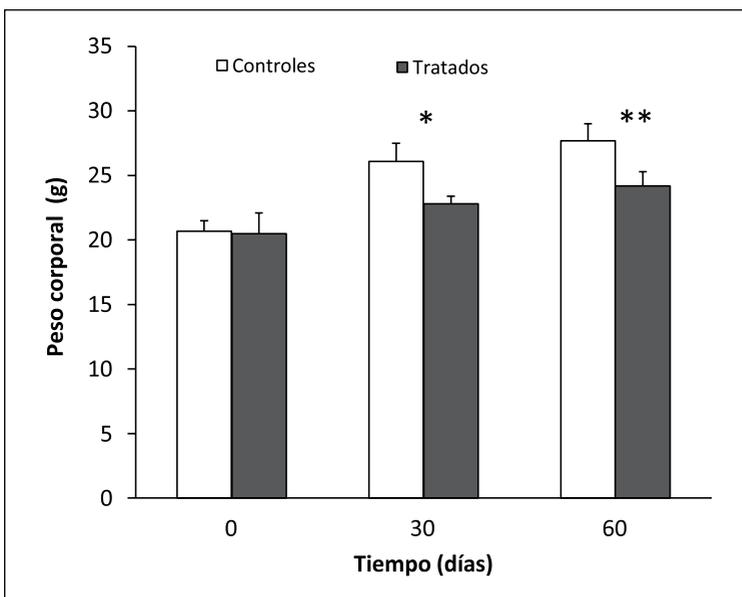


Figura 1. Pesos de ratones controles (n = 15) y ratones tratados (n = 15) con dieta alta en grasas durante el período experimental. (promedio ± DS) *p < 0,001; **p < 0,0001.

cambio evidente en la ingesta diaria de alimento (controles: $3,3 \pm 1,8$ g vs tratados: $4,3 \pm 2,4$ g).

Los lípidos plasmáticos mostraron diferente comportamiento luego de 2 meses de ingesta de una dieta rica en grasas (Figura 2). Se observó un significativo incremento de 87% en los niveles plasmáticos de colesterol total en los ratones que consumieron dieta alta en grasas, debido a un aumento de 140% en las concentraciones de LDL-colesterol, y a un aumento de 97% en los niveles de HDL-colesterol. Sin embargo, en los animales tratados no se visualizaron diferencias significativas en las concentraciones de triglicéridos. Tampoco se observaron diferencias signifi-

tivas en los niveles de glicemia (controles: 87 ± 34 mg/dL vs tratados: 79 ± 36 mg/dL).

Los lípidos biliares del grupo tratado mostraron un significativo incremento de 13% en las concentraciones de colesterol, sin alteración en las concentraciones de fosfolípidos (Tabla 2). Además, el grupo tratado presentó un significativo aumento en las concentraciones de colesterol y fosfolípidos en los transportadores vesiculares, sin variaciones significativas en las concentraciones de fosfolípidos en transportadores micelares (Tabla 2). Más aun, se duplicó la razón colesterol/fosfolípidos de los transportadores vesiculares en los animales tratados con una dieta alta en grasas (Tabla 3).

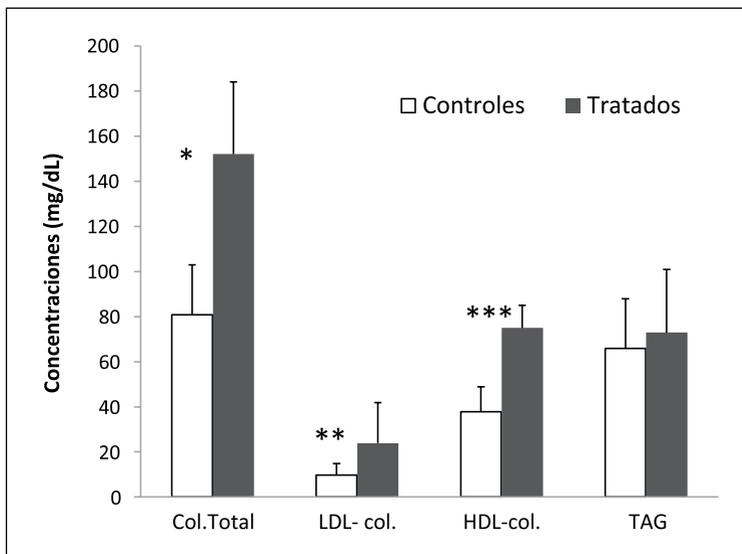


Figura 2. Concentraciones de lípidos en plasma de ratones controles y ratones tratados con dieta alta en grasas durante 60 días (promedio \pm DS). * $p < 0,0001$; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,05$. Abreviaturas: Col. Total: colesterol total. LDL-col.: LDL-colesterol. HDL-col.: HDL-colesterol. TAG: triglicéridos.

Tabla 2. Concentraciones de lípidos biliares y lípidos en transportadores vesiculares (TV) y transportadores micelares (TM) presentes en bilis de ratones controles y ratones tratados con una dieta alta en grasas durante 60 días (promedio \pm DS)

Ratones	Colesterol biliar (mM)	Fosfolípidos biliares (mM)	Colesterol en TV (mM)	Fosfolípidos en TV (mM)	Colesterol en TM (mM)	Fosfolípidos en TM (mM)
Controles	$4,0 \pm 0,5$	$39 \pm 12,0$	0,4	$4,2 \pm 2,0$	3,7	$29,1 \pm 2,0$
Tratados con dieta alta en grasas	$4,5 \pm 0,4^*$	44 ± 15	1,4	$7,2 \pm 2,8^{**}$	2,2	$28,2 \pm 2,8$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Tabla 3. Porcentaje de colesterol y razón colesterol/fosfolípidos (Col/Fos) en transportadores vesiculares y micelares presentes en bilis de ratones controles y tratados con una dieta alta en grasas durante 60 días

Ratones	Transportadores vesiculares*		Transportadores micelares*	
	% Colesterol	Razón Col/Fos	% Colesterol	Razón Col/Fos
Control	10,5	0,10	89,5	0,13
Tratados con dieta alta en grasas	38,8	0,20	59,7	0,08

*Valores corresponden a recopilación de bilis de 5 ratones.

Discusión

Nuestros resultados indican que una dieta rica en grasas puede jugar un importante rol en los primeros estadios de la colelitiasis.

En este estudio, un grupo de ratones fue sometido a la ingesta de una dieta alta en grasas (64%, conteniendo 54% de grasas saturadas, 34% de grasas monoinsaturadas y 10% de grasas poliinsaturadas), y baja en colesterol (0,14%; 0,18 mg/kcal), por un lapso de 2 meses. Durante este período, los animales tratados mostraron una significativa reducción en el peso corporal comparados con el grupo control, sin constatar diferencias significativas en la ingesta diaria entre ambos grupos. A pesar que estudios epidemiológicos han reportado una asociación positiva entre ingesta de grasas y obesidad²¹, recientes ensayos clínicos prospectivos, aleatorios realizados en individuos, sugieren lo contrario²². Estos últimos estudios han mostrado una pérdida mayor de peso corporal en sujetos que consumieron dietas altas en grasas (conteniendo 40% a 68% en grasas), en comparación con una ingesta de dietas bajas en grasas (conteniendo ≤ 30% en grasas), por un período de 6 meses²³⁻²⁸. Recientemente, una revisión de varios artículos, que compararon el peso corporal en individuos que consumieron dietas altas y bajas en grasas a largo plazo (1 a 6 años), no mostró diferencias significativas, pero al incluir sólo dietas hipocalóricas se observó una mayor disminución en el peso corporal de los grupos con dietas altas en grasas²⁹.

El efecto de una dieta rica en grasas sobre los niveles de lipoproteínas varía considerablemente, conforme al tipo de grasa consumida. En general, se ha informado que los ácidos grasos saturados incrementan tanto el colesterol plasmático total como el LDL-colesterol^{29,30}. En contraste, los ácidos grasos poliinsaturados, y en menor grado los

monoinsaturados, disminuyen el colesterol total y LDL-colesterol³¹. Nuestros estudios concuerdan con estos resultados, al presentar un aumento significativo tanto en el colesterol plasmático total como LDL-colesterol, en los animales que consumieron dietas altas en grasas saturadas. Se ha sugerido, que el incremento en el colesterol plasmático en los individuos sometidos a alta ingesta de grasas, ocurre principalmente en aquellos que presentan resistencia a la insulina, ya que presentan menor absorción intestinal de colesterol³². Por otro lado, se ha reportado que los niveles de HDL-colesterol se ven incrementados en dietas a largo plazo altas en grasas saturadas o insaturadas, mientras que dietas bajas en grasas, decrecen significativamente los niveles de HDL-colesterol²⁹. Este efecto se ratifica en nuestro estudio, que muestra un significativo aumento del HDL-colesterol de un 97% en el grupo tratado. Ello se podría explicar porque, en respuesta a una dieta alta en grasas, se genera una probable disminución en la captación hepática de HDL por una regulación negativa del receptor de HDL (Scavenger Receptor B1 -SRB1), dificultando el transporte reverso de colesterol³³. Adicionalmente, dietas bajas en grasas a largo plazo han mostrado un incremento en los niveles plasmáticos de triglicéridos²⁹. Los triglicéridos circulantes pueden provenir de la absorción intestinal de grasas en forma de quilomicrones y remanentes de quilomicrones, que pueden ser altamente aterogénicos³⁴. En nuestro estudio con dieta a corto plazo, no observamos diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos entre el grupo control y el tratado, requiriéndose mayores investigaciones para evaluar el efecto a largo plazo de una dieta alta en grasas sobre la concentración y composición de remanentes lipoproteicos. Por otra parte, nuestros resultados no muestran una diferencia significativa en los

niveles de glicemia entre los animales controles y tratados. Estudios recientes tampoco han mostrado diferencias, en respuesta a la resistencia a la insulina, entre dietas altas y bajas en grasas^{26,35}.

Los 3 principales factores en la patogénesis de la colelitiasis son la hipomotilidad de la vesícula biliar, la sobresaturación biliar de colesterol y la cristalización de colesterol. En esencia, la sobresaturación biliar con colesterol resulta principalmente de un incremento en la secreción biliar de colesterol, y/o de una disminución en la secreción de ácidos biliares, y en menor extensión de la disminución en la secreción de fosfolípidos. Además de estos cambios relativos en los lípidos biliares, es relevante la etapa siguiente en el proceso de formación de cálculos de colesterol, denominada cristalización, ya que no siempre una bilis sobresaturada con colesterol forma cristales y posteriormente cálculos macroscópicos. El proceso de cristalización de colesterol está gatillado por la presencia de vesículas, que transportan colesterol biliar, pero que son termodinámicamente inestables. Uno de los principales factores de riesgo de la colelitiasis lo constituye un consumo excesivo de calorías en la dieta, donde el colesterol lipoproteico resultante, que eventualmente retorna al hígado, es secretado a la bilis como ácidos biliares o como colesterol libre³⁶. En el presente trabajo estudiamos el rol de la grasa dietética como factor etiológico de la colelitiasis. En nuestro modelo experimental, observamos que una dieta rica en grasas, compuesta principalmente por ácidos grasos saturados, aumentó significativamente la concentración de colesterol biliar, sin modificar la concentración de fosfolípidos biliares. Esta saturación biliar de colesterol provocó un incremento en la concentración de colesterol en los transportadores vesiculares. Mas aun, se observó un aumento en la razón colesterol/fosfolípidos en los transportadores vesiculares en las bilis de animales tratados con dieta alta en grasas. Estos transportadores vesiculares, ricos en colesterol, se pueden agregar y fusionar, favoreciendo la formación de cristales de colesterol^{13,14}. Probablemente los ácidos grasos saturados de la dieta causaron una variación en la composición de los fosfolípidos biliares, lo cuál pudo modificar el equilibrio entre los transportadores vesiculares-micelares en la bilis, alterando la solubilización del colesterol biliar³⁷.

Concluimos, que una dieta alta en ácidos grasos, preferentemente saturados, resulta en un

incremento en los niveles plasmáticos de colesterol total y LDL-colesterol, junto con un aumento en las concentraciones de HDL-colesterol. El aumento concomitante observado en la concentración de colesterol biliar, y particularmente el incremento en la formación de transportadores vesiculares ricos en colesterol, nos indica que la ingesta de una dieta alta en grasas, preferentemente saturadas, podría contribuir a la formación de cálculos vesiculares de colesterol en una etapa temprana. Sin embargo, los mecanismos involucrados deben ser aun dilucidados.

Referencias

1. Dam H, Kruse I. Studies in human bile: II. Influence of two different fats on the composition of human bile. *Scand. J Clin Lab Invest* 1966; 19: 367-78.
2. Kohlmeier M, Schlierf G, Stiehl A. Metabolic changes in healthy men using fat-modified diets. II. Composition of biliary lipids. *Ann Nutr Metab* 1988; 32: 10-4.
3. Vezina WC, Grace DC, Hutton LC, Alfieri MH, Colby PR, et al. Similarity in gallstone formation from 900 kcal/day diets containing 16 g vs 30 g of daily fat. *Digestive Diseases and Sciences* 1998; 43: 554-61.
4. Zapata R, Severin C, Manríquez M, Valdivieso V. Gallbladder motility and lithogenesis in obese patients during diet-induced weight loss. *Digestive Diseases and Sciences* 2000; 45: 421-8.
5. Dam H. Determinants of cholesterol cholelithiasis in man and animals. *American Journal of Medicine* 1971; 51: 596-613.
6. Cohen BI, Mosbach EH, Ayyad N, Miki S, McSherry CK. Dietary fat and fatty acids modulate cholesterol cholelithiasis in the hamster. *Lipids* 1992; 27: 526-32.
7. Trautwein EA, Liang J, Hayes KC. Cholesterol gallstone induction in hamsters reflects strain differences in plasma lipoproteins and bile acids profiles. *Lipids* 1993; 28: 305-12.
8. Trautwein E, Kunath-Rau A, Dietrich J, Drusch S, Erbersdobler H. Effect of dietary fat rich in lauric, myristic, palmitic, oleico or linoleic acid on plasma, hepatic and biliary lipids in cholesterol-fed hamsters. *British Journal of Nutrition* 1997; 77: 605-20.
9. Aguilera C, Ramírez-Tortosa CL, Quiles JL, Yago MD, Martínez-Burgos MA, Martínez-Victoria EM, et al. Monounsaturated and ω -3 but not ω -6 polyunsaturated fatty acids improve hepatic fibrosis in hypercholesterolemic rabbits. *Nutrition* 2005; 21: 363-71.
10. Ayyad N, Cohen BI, Mosbach EH, Miki S. Palmitic acid enhances cholesterol gallstones incidence in Sasco

- hamsters fed cholesterol enriched diets. *Lipids* 1992; 27: 993-8.
11. Jonnalagadda SS, Trautwein EA, Hayes KC. Dietary fats rich in saturated fatty acids enhance gallstone formation relative to monounsaturated fat in cholesterol-fed hamsters. *Lipids* 1995; 30: 415-24.
 12. Pattinson NR. Solubilization of cholesterol in human bile. *FEBS* 1985; 181: 339-402.
 13. Sömjen GL, Gilat T. Contribution of vesicular and micellar carriers in cholesterol transport in human bile. *J Lipid Res* 1985; 26: 699-705.
 14. Halpern Z, Dudley MA, Kibe A, Lynn MP, Breuer AC, Holzbach RT. Rapid vesicle formation and aggregation in abnormal human bile: a time-lapse video-enhanced contrast microscopy study. *Gastroenterology* 1986; 90: 875-85.
 15. Maschi F, Ayala M, Benavides F, Carbone C. Modelos animales: desarrollo de la línea de ratones congénicos BALB/c, C₉-Cts^{nlk}. *BAG J Basic Appl genetics* 2008; versión on-line, ISSN 1852-233.
 16. Bennett B, Brown M, Scheffield J. Elementos esenciales para la investigación animal. 1994, 2ª edición, Biblioteca Nacional de Agricultura, Beltsville, Maryland.
 17. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20: 470-5.
 18. del Pozo R, Muñoz M, Dumas A, Tapia C, Muñoz K, et al. Efecto de la ingesta de vitamina C en el proceso de formación de cálculos biliares de colesterol. *Rev Med Chile* 2014; 142: 20-6.
 19. Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FF. A simplified method for estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem* 1952; 195: 357-66.
 20. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925; 66: 375-400.
 21. Bray GA, Popkin BM. Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1157-73.
 22. Méndez-Sánchez N, Zamora-Valdés D, Chávez-Tapia NC, Uribe M. Role of diet in cholesterol gallstone formation. *Clinical Chimica Acta* 2007; 376: 1-8.
 23. Brehm BJ, Seeley RJ, D'Alessio DA. A randomized trial comparing a very low carbohydrate diet and a calorie-restricted low fat diet on body weight and cardiovascular risk factors in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1617-23.
 24. Dansinger ML, Gleason JA, Griffith JL, Selker HP, Schaefer EJ. Comparison of the Atkins, Ornish, Weight Watchers, and Zone Diets for weight loss and heart disease risk reduction. A randomized trial. *JAMA* 2005; 293: 43-53.
 25. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, McGuckin BG, Brill C, et al. A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *N Engl J Med* 2003; 348: 2082-90.
 26. Stern L, Iqbal N, Seshadri P, Chicano K, Daily D, et al. The effects of low-carbohydrate versus conventional weight loss diets in severely obese adults: one-year follow-up of a randomized trial. *Ann Intern Med* 2004; 140: 778-85.
 27. Samaha FF, Iqbal N, Seshadri P, Chicano K, Daily D, et al. Low carbohydrate as compared to low fat diet in severe obesity. *N Engl J Med* 2003; 348: 2074-81.
 28. Yancy WS Jr, Olsen MK, Guyton JR, Bakst RB, Westman EC. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2004; 140: 769-77.
 29. Schwingshackl L, Hoffmann G. Comparison of effect of long-term low-fat vs high-fat diets on blood lipid levels in overweight or obese patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 2013; 113: 1640-61.
 30. Sanders TAB, Oakley FR, Miller GL. Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and haemostatic factors. *Arterioscl Thromb Vasc Bio* 1997; 17: 3449-60.
 31. Kris-Etherton P, Shaomei Y. Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 1997; 65 (Suppl): 1628S-44S.
 32. Samaha F. Effect of a very high-fat diets on body weight, lipoproteins and glyemic status in the obese. *Current Atherosclerosis Reports* 2005; 7: 412-20.
 33. Hatahet W, Cole L, Kudchodkar BJ, Fungwe TV. Dietary fats differentially modulate the expression of lecithin:cholesterol acyltransferase, apoprotein-A1 and scavenger receptor B1 in rats. *J Nutr* 2003; 133: 689-94.
 34. Twickler TB, Dallinga-Thie GM, Cohn JS, Chapman MJ. Elevated remnant-like particle cholesterol concentration. A characteristic feature of the atherogenic lipoprotein phenotype. *Circulation* 2004; 109: 1918-25.
 35. Foster GD, Wyatt HR, Hill JO, Makris AP, Rosenbaum DL, et al. Weight and metabolic outcomes after 2 years on a low carbohydrate versus low-fat diet: A randomized trial. *Ann Intern Med* 2010; 153: 147-57.
 36. Maclure KM, Hayes KC, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC. Weight, diet and the risk of symptomatic gallstones in middle-age women. *N Eng J Med* 1989; 321: 563-9.
 37. Cohen DE, Carey MC. Acyl chain unsaturation modulates distribution of lecithin molecular species between mixed micelles and vesicles in model bile. Implications for particle structure and metastable cholesterol solubilities. *J Lip Res* 1991; 32: 1291-302.