

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTES DE LA DIETA EN L'OXIDACIÓ, ELS ANTIOXIDANTS I EL COMPORTAMENT METABÒLIC DE LES LIPOPROTEÏNES
Maria Teresa Bargalló Escrivà
ISBN:978-84-691-1877-1/DL: T-340-2008

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
DEPARTAMENT DE MEDICINA I CIRURGIA

EFECTES DE LA DIETA EN
L'OXIDACIÓ, ELS ANTIOXIDANTS
I EL COMPORTAMENT METABÒLIC
DE LES LIPOPROTEÏNES

Maria Teresa Bargalló Escrivà

Reus, 1994

0072-59660

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
DEPARTAMENT DE MEDICINA I CIRURGIA

EFFECTES DE LA DIETA EN L'OXIDACIÓ,
ELS ANTIOXIDANTS I EL COMPORTAMENT METABÒLIC
DE LES LIPOPROTEÏNES

+ 31

MARIA TERESA BARGALLÓ ESCRIVÀ

TESI DOCTORAL

DESEMBRE 1994



Als meus pares i a la meva germana

A la Rosa

AGRAÏMENTS

Al Dr. Josep Laporte i Salas,

Al Dr. Claude Motta,

Al Dr. Isidre Casals Ribes,

Al Dr. Josep Maria Olivé Plana,

Al Dr. Jordi Salas Salvadó,

per haver acceptat formar part del Tribunal que ha de jutjar aquesta tesi.

Al Dr. Rodrigo Miralles Marrero i al Dr. Joan Fernández Ballart per la seva confiança.

A la Unité de Recherches sur les Dyslipidémies et l'Athérosclérose, INSERM U. 32, Hôpital Henri-Mondor, Créteil (França) i, en especial, a Jean-Louis Richard i a Michel Maillé, per la col.laboració en les tasques de laboratori.

A l'Equip del Laboratoire de Biochimie de l'Hôtel-Dieu, Clermont-Ferrand (França) pel seu recolzament constant.

A l'Equip de Cromatografia dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, del qual forma part el Dr. Casals, per la seva inestimable col.laboració.

A la Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus i, especialment, a Agnes Elizabeth La Ville, a Josefa Girona, a Sílvia Olivé i a Merche Heras, per la col.laboració en les tasques de laboratori.

A Vicenç Alcaraz pel seu ajut i orientació en l'anàlisi estadística d'aquest treball.

Als meus companys de treball perquè han suportat amb paciència el desenvolupament d'aquest treball. Als amics de la Secció de Filologia Hispànica pel seu ajut.

A Jesús Vila i als seus pares pel seu apreciat ajut.

Als meus pares i a la meva germana pel seu suport i perquè sense ells no hauria estat possible aquest treball.

Al Dr. Lluís Masana Marín perquè va iniciar-me en aquest camp d'investigació i m'ha recolzat al llarg d'aquests anys.

i de manera molt especial,

A la Dra. Rosa Solà Alberich per la seva pacient direcció i la seva generosa dedicació sense les quals aquest i altres treballs no haurien estat possibles.

LLISTA DE FIGURES

- 1.- Esquema d'una placa d'ateroma.
- 2.- Estructura d'una HDL.
- 3.- Efecte de la presència dels dobles enllaços sobre la conformació a l'espai d'un àcid gras.
- 4.- Esquema del transport dels lípids exògens.
- 5.- Esquema del transport endogen dels lípids.
- 6.- Esquema del metabolisme de les HDL i del paper d'aquestes lipoproteïnes en el transport invers de colesterol.
- 7.- Fonts intracel.lulars del radicals lliures.
- 8.- Fases de la peroxidació lipídica: iniciació, propagació i finalització.
- 9.- Possibles mecanismes pels quals els antioxidants poden actuar de manera sinèrgica per tal de bloquejar la reacció en cadena.
- 10.- Protecció antioxidant a l'interior de la cèl.lula.
- 11.- Estructura química dels antioxidants biològics.
- 12.- Formació metabòlica del malondialheid a partir de l'àcid araquidònic en la biosíntesi dels eicosanoides.
- 13.- L'oxidació de les LDL afecta tant els components dels lípids com de les apolipoproteïnes.
- 14.- Efectes de les LDL moderadament oxidades sobre les cèl.lules endotelials.
- 15.- Efectes de les LDL més oxidades sobre les cèl.lules endotelials, els macròfags i les cèl.lules musculars llises.
- 16.- Estructura de la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatriè (DPH).
- 17.- Posició possible del DPH a la partícula lipoproteica.
- 18.- Concentració de les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric de les HDL₃ natives i amb Cu²⁺ oxidades.
- 19.- Efectes de les LDL en l'activitat del receptor depurador dels macròfags. Estudis de desplaçament de ¹²⁵I-Ox₂₄-LDL control.
- 20.- Efectes de les HDL₃ en l'efusió de colesterol dels fibroblasts i dels macròfags.

LLISTA DE TAULES

- 1.- Característiques físico-químiques de les lipoproteïnes del plasma.
- 2.- Composició química global de les lipoproteïnes humanes del plasma.
- 3.- Relació dels principals àcids grassos i la seva procedència.
- 4.- Composició en àcids grassos de les HDL₃.
- 5.- Composició en apolipoproteïnes de les lipoproteïnes del plasma.
- 6.- Fluïdesa de les lipoproteïnes humanes.
- 7.- Objectius dels radicals lliures dins de la cèl.lula.
- 8a,b.- Tècniques més rellevants utilitzades per a mesurar la peroxidació lipídica.
- 9.- Propietats químiques i físiques de les LDL oxidades, comparades amb les natives.
- 10.- Canvis que es produeixen en les HDL degut a la seva oxidació.
- 11.- Comparació entre la composició en àcids grassos de les HDL natives i oxidades 12 i 24 h en la fracció del colesterol esterificat.
- 12.- Comparació entre la composició en àcids grassos de les HDL natives i oxidades 12 i 24 h en la fracció dels fosfolípids.
- 13.- Comparació entre la composició en àcids grassos de les HDL natives i oxidades 12 i 24 h en la fracció dels triglicèrids.
- 14.- Algunes de les observacions que donen les bases de la teoria de l'aterogènesi.
- 15.- Algunes de les característiques biològiques més rellevants de la LDL oxidada.
- 16.- Algunes de les característiques biològiques més rellevants de la HDL oxidada.
- 17.- Estudi dels Set països (12095 homes de 40 a 59 anys de 7 països).
- 18.- Aliments que són font de carotens.
- 19.- Aliments que són font d'ubiquinona (coenzim Q).
- 20.- Aliments que són font de vitamina E.
- 21.- Característiques de la població estudiada.
- 22.- Composició dels olis.
- 23.- Composició de la dieta.
- 24.- Lípids, lipoproteïnes i apolipoproteïnes del plasma basals i al final dels períodes d'intervenció dietètica.
- 25.- Composició en lípids i proteïnes de les LDL.
- 26.- Composició en lípids i proteïnes de les HDL₃.
- 27.- Composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL₃.
- 28.- Fluïdesa de les LDL.
- 29.- Fluïdesa de les HDL₃.
- 30.- Peroxidació lipídica de les HDL₃ natives.
- 31.- Susceptibilitat a l'oxidació de les LDL.
- 32.- Susceptibilitat a l'oxidació de les HDL₃.
- 33.- Concentracions de α -tocoferol, β - + γ -tocoferol i retinol en plasma, LDL i HDL₃.
- 34.- Efectes de les HDL₃ en l'efusió de [³H]colesterol lliure dels fibroblasts.
- 35.- Efectes de les HDL₃ en l'efusió de [³H]colesterol lliure dels macròfags.

LLISTA D'ABREVIATURES

AGMI:	Àcids grassos monoinsaturats.
AGPI:	Àcids grassos poliinsaturats.
AGS:	Àcids grassos saturats.
DPH:	Sonda 1,6-difenil-1,3,5 hexatriè.
HDL:	Lipoproteïnes de densitat alta, <i>High Density Lipoprotein</i> .
HDL ₂ :	Subfracció 2 de les lipoproteïnes d'alta densitat.
HDL ₃ :	Subfracció 3 de les lipoproteïnes d'alta densitat.
LDL:	Lipoproteïnes de densitat baixa, <i>Low Density Lipoprotein</i> .
NADH:	Forma reduïda del dinucleòtid de nicotinamida i adenina.
NADPH:	Forma reduïda del fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina.
Lp(a):	Lipoproteïna (a).
LPDS:	Sèrum deficient en lipoproteïnes.
MDA:	Malondialdehid.
TBA:	Àcid tiobarbitúric.
TBARS:	Substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric, <i>Thiobarbituric-acid-reactive substances</i> .
VHDL:	Lipoproteïnes de densitat molt alta, <i>Very High Density Lipoprotein</i> .
VLDL:	Lipoproteïnes de densitat molt baixa, <i>Very Low Density Lipoprotein</i> .

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	15
1.1.- Bases de l'arteriosclerosi	17
1.2.- Factors de risc de l'arteriosclerosi	18
1.3.- Lipoproteïnes i metabolisme lipoproteic	21
1.3.1.- Estructura, nomenclatura i classificació dels lípids i de les lipoproteïnes del plasma	22
1.3.2.- Estructura de les lipoproteïnes	23
1.3.3.- Nomenclatura de les lipoproteïnes	23
1.3.4.- Característiques físico-químiques de les lipoproteïnes del plasma	25
1.3.4.1.- Característiques químiques	25
1.3.4.1.1.- Composició química global	26
1.3.4.1.2.- Composició en àcids grassos	26
1.3.4.1.2.1.- Definició, estructura i nomenclatura dels àcids grassos	
1.3.4.1.3.- Composició en apolipoproteïnes	32
1.3.4.2.- Característiques físiques	33
1.3.4.2.1.- Mobilitat electroforètica	33
1.3.4.2.2.- Fluïdesa	34
1.3.4.2.2.1.- Concepte de fluïdesa <i>optimum</i>	
1.3.4.2.2.2.- Moduladors de la fluïdesa	
1.3.4.2.3.- Grandària	39
1.4.- Metabolisme de les lipoproteïnes	40
1.5.- Oxidació lipoproteica	47
1.5.1.- Radicals lliures	47
1.5.2.- Radicals lliures en els organismes vius. Radicals lliures de l'oxigen	47
1.5.3.- Fonts biològiques dels radicals lliures	49
1.5.4.- Altres fonts de radicals lliures	50
1.5.5.- Punts d'atac dels radicals lliures	52
1.5.6.- Estrès oxidatiu	54
1.5.6.1.- Radicals lliures i cadena de peroxidació lipídica	54
1.5.6.2.- Sistemes antioxidants	56
1.5.6.2.1.- Enzims	63
1.5.6.2.2.- Elements traça	63
1.5.6.2.3.- Vitamines amb funció antioxidant	63
1.5.6.2.3.1.- Vitamina E	
1.5.6.2.3.2.- Vitamina C	
1.5.6.2.3.3.- Vitamina A i carotenoides	
1.5.6.2.3.4.- Interdependència entre els diversos sistemes antioxidants	

1.5.6.2.4.-	Altres antioxidants	65
1.5.6.2.4.1.-	HDL	
1.5.6.2.4.2.-	Colesterol	
1.5.6.2.5.-	Antioxidants existents en el plasma humà	66
1.5.6.3.-	Mesura de la peroxidació lipídica com a reflex de l'estrès oxidatiu	66
1.5.7.-	Característiques físico-químiques de les lipoproteïnes oxidades	72
1.5.7.1.-	LDL oxidades	72
1.5.7.2.-	HDL oxidades	76
1.5.8.-	Susceptibilitat a l'oxidació	81
1.5.8.1.-	Determinació de la susceptibilitat a l'oxidació	81
1.5.8.2.-	Interès de la susceptibilitat a l'oxidació	83
1.6.-	Relació entre oxidació lipoproteica i patogènia de l'arteriosclerosi	84
1.6.1.-	LDL oxidades	84
1.6.2.-	HDL oxidades	92
1.7.-	Dieta i aterogènesi	93
1.8.-	Dieta, peroxidació lipídica i arteriosclerosi	99
2.-	INTERÈS DELS EFECTES DE LA DIETA EN L'OXIDACIÓ, ELS ANTIOXIDANTS I EL COMPORTAMENT METABÒLIC DE LES LIPOPROTEÏNES. HIPÒTESI DE TREBALL	105
3.-	OBJECTIUS	111
4.-	MATERIAL I MÈTODES	115
4.1.-	Individus	117
4.2.-	Pla de l'estudi	118
4.3.-	Dietes	118
4.4.-	Tècniques de laboratori	120
4.4.1.-	Fraccionament lipoproteic	120
4.4.2.-	Composició química global	122
4.4.2.1.-	Mètode de Lowry	123
4.4.3.-	Separació i composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL ₃	124
4.4.4.-	Anisotropia de fluorescència de les LDL i de les HDL ₃	127
4.4.5.-	Determinació de les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (TBARS) en HDL ₃ natives, LDL en Cu ²⁺ oxidades i HDL ₃ en Cu ²⁺ oxidades	130
4.4.6.-	Susceptibilitat a l'oxidació de les LDL i HDL ₃	131
4.4.7.-	Determinació de l'α-tocoferol, β- + γ-tocoferol i retinol en el plasma, les LDL i les HDL ₃ .	132

4.4.8.-	Estudis cel.lulars	135
4.4.8.1.-	Estudi de l'efecte de les LDL en l'activitat del receptor depurador dels macròfags. Efectes en el desplaçament competitiu de $^{125}\text{I-Ox}_{24}$ -LDL control	136
4.4.8.1.1.-	Obtenció dels macròfags	136
4.4.8.1.2.-	Obtenció de sèrum deficient en lipoproteïnes (LPDS)	138
4.4.8.1.3.-	Oxidació de les LDL	139
4.4.8.1.4.-	Marcatge de les LDL oxidades amb ^{125}I	139
4.4.8.1.5.-	Activitat de receptor depurador dels macròfags	142
4.4.8.2.-	Estudis de l'efusió de colesterol	143
4.4.8.2.1.-	Obtenció de fibroblasts	144
4.4.8.2.2.-	Obtenció de macròfags	145
4.4.8.2.3.-	Marcatge del medi de cultiu amb $[^3\text{H}]$ -colesterol lliure	146
4.4.8.2.4.-	Marcatge de les cèl.lules amb colesterol lliure tritiat	146
4.4.8.2.5.-	Incubació de les cèl.lules amb HDL ₃	147
4.4.8.2.6.-	Obtenció del medi i de les cèl.lules	148
4.4.8.2.7.-	Extracció del colesterol lliure	149
4.5.-	Anàlisi estadística	151
5.-	RESULTATS	153
5.1.-	Dietes	155
5.2.-	Lípids, lipoproteïnes i apolipoproteïnes del plasma	155
5.3.-	Composició en lípids, proteïnes i apolipoproteïnes de les LDL i de les HDL ₃	156
5.4.-	Composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL ₃	156
5.5.-	Fluïdesa de les LDL i de les HDL ₃	156
5.6.-	Concentració de les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric de les HDL ₃ natives	157
5.7.-	Susceptibilitat a l'oxidació de les LDL i de les HDL ₃	157
5.8.-	Nivells de α -tocoferol, β - + γ -tocoferol i retinol en plasma, LDL i HDL ₃	157
5.9.-	Correlacions observades entre la composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL ₃ i les concentracions de peroxidació lipídica de les HDL ₃ natives	158
5.10.-	Efectes de les LDL en l'activitat del receptor depurador dels macròfags Estudis de desplaçament de $^{125}\text{I-Ox}_{24}$ -LDL control	158
5.11.-	Efectes de les HDL ₃ en l'efusió de colesterol dels fibroblasts i dels macròfags	159

6.- DISCUSSIÓ	173
6.1.- Els lípids, les lipoproteïnes i les apolipoproteïnes del plasma	175
6.2.- L'estructura i el comportament metabòlic de les LDL i de les HDL ₃ i la relació entre ambdós aspectes	182
6.3.- Peroxidació lipídica de les HDL ₃ i resistència a l'oxidació de les LDL i de les HDL ₃ . Influència dels antioxidants naturals	186
6.4.- Implicacions per a la prevenció dietètica de l'arteriosclerosi	194
7.- CONCLUSIONS	197
8.- BIBLIOGRAFIA	201

INTRODUCCIÓ

1.1.- Bases de l'arteriosclerosi

L'arteriosclerosi, el principal procés anatomopatològic de les malalties cardiovasculars, és una resposta protectora a les lesions de l'endoteli i de les cèl.lules musculars llises de la paret arterial que pot evolucionar vers la formació d'estries lipídiques i de lesions fibroses, precedides i acompanyades d'inflamació. Les lesions avançades de l'arteriosclerosi poden originar-se a partir de diversos tipus de danys que donen una resposta excessiva de tipus proliferatiu, fibrós i inflamatori. Això provoca oclusió de l'artèria afectada i es desencadena la clínica típica en funció de la localització de l'artèria (Fuster V *et al*, 1992a,b; Ross R, 1993).

A l'origen de les manifestacions clíniques de l'arteriosclerosi hi ha tota una seqüència de canvis complexos que donen lloc a la placa ateromatosa (Ross R, 1993).

Els mecanismes implicats en el procés de formació i progressió de la placa, en particular els que intervenen en la lesió d'una artèria, no són coneguts en la seva totalitat. De totes maneres, s'ha observat repetidament que al començament hi ha la formació d'estries lipídiques, que s'anomenen lesions inicials. Aquestes són dipòsits de colesterol esterificat dins dels macròfags, localitzats en la unió entre l'íntima i la mèdia de les artèries de diàmetre gran i mitjà. En la mesura que el colesterol es vagi dipositant en els macròfags, aquests es transformen en cèl.lules escumoses. Les estries lipídiques es visualitzen fàcilment a la superfície de l'endoteli vascular i la seva evolució comporta que el colesterol també faci dipòsits a l'exterior de la cèl.lula. A mesura que la lesió evoluciona, es produeix proliferació cel.lular i síntesi de fibres, per així constituir la placa fibrosa, en què també s'observa dipòsit extracel.lular de colesterol (Fuster V *et al*, 1992a,b; Ross R, 1993).

Les plaques fibroses contenen un nucli central ric en cristalls de colesterol i restes de necrosi cel.lular, envoltat per una capa fibromuscular de cèl.lules musculars llises, macròfags i col.làgen. En fases posteriors del procés ateroescleròtic aquestes plaques presenten complicacions, com necrosi, trombosi i ulceracions. L'evolució

d'aquestes lesions pot portar a la ruptura de l'íntima arterial. Al mateix temps, la ruptura de les plaques desencadena el procés trombòtic, que evoluciona cap a l'oclusió vascular. Recentment s'ha observat que les plaques més petites són les més perilloses perquè en ser més lipídiques, tenen una major tendència a fisurar-se (Fuster V *et al*, 1992a,b). La lesió, en definitiva, evoluciona cap a l'estenosi i també cap a alteracions funcionals de la regulació vascular (Ross R, 1993) (*Figura 1*).

1.2.- Factors de risc de l'arteriosclerosi

Els resultats dels estudis epidemiològics han mostrat un cert nombre de factors clínics o biològics que predisposen més freqüentment a les lesions d'arteriosclerosi. Els més importants d'aquests factors, anomenats factors de risc, són les hiperlipidèmies, la hipertensió arterial, el tabaquisme, els determinants genètics i la diabetis (Martin MJ *et al*, 1986; Paul O, 1989).

Les hiperlipidèmies, en particular la hipercolesterolèmia, poden augmentar tant la incidència de les lesions d'arteriosclerosi com la progressió de les lesions (Martin MJ *et al*, 1986). En concret, la hipercolesterolèmia familiar és un exemple clar de la relació entre els nivells elevats de colesterol del plasma i el desenvolupament de malalties coronàries (Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel, 1988), com ho mostra el fet que els homozigots de la hipercolesterolèmia familiar moren sovint abans dels 20 anys. Més recentment, s'ha especificat que aquesta relació entre hipercolesterolèmia i malaltia coronària està associada amb les concentracions de colesterol de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) (Kannell WB *et al*, 1981). A l'inrevés, altres estudis epidemiològics han mostrat que existeix una relació negativa entre el risc de patir malalties coronàries i la concentració de colesterol de les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) (Miller N *et al*, 1975).

No solament s'ha observat aquesta relació epidemiològica entre les concentracions de colesterol i les malalties coronàries sinó que s'ha mostrat entre elles una relació causal a partir de diversos estudis genètics i experimentals.

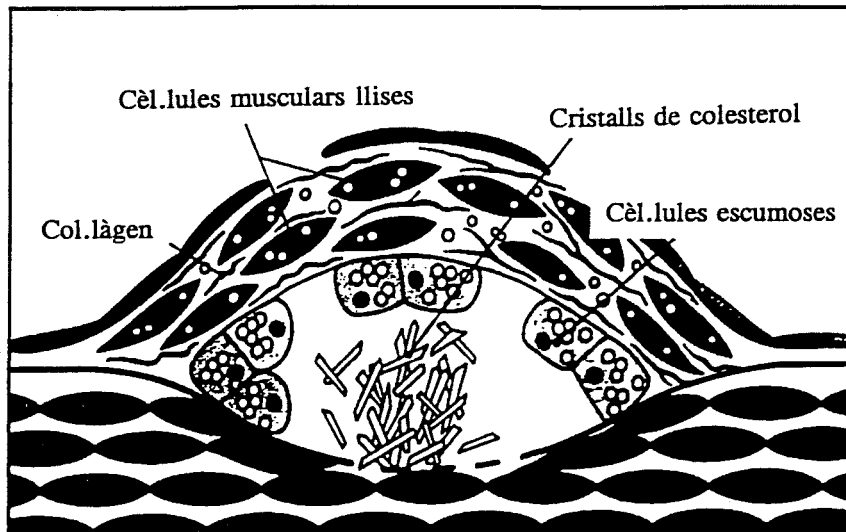


Figura 1.- Esquema d'una placa d'ateroma constituïda per un cor central, que conté cèl.lules escumoses i cristalls de colesterol, i una zona perifèrica formada per col.làgen i cèl.lules musculars llises (Extreta de Thompson GR. Handbook of hyperlipidemias, 1989; p. 94).

Els mecanismes pels quals el colesterol intervé en la formació i la progressió de l'arteriosclerosi són nombrosos i complexos. En concret, el colesterol pot intervenir en la inducció de la lesió de l'endoteli i la promoció de la proliferació de les cèl.lules musculars llises, fet que facilita el creixement i la ruptura de la placa, al mateix temps que afavoreix la trombosi i la reactivitat de les plaquetes (Ross R, 1993).

En el moment actual, altres factors lipídics, diferents dels clàssics, com la lipoproteïna (a) (Lp(a)) (Lawn RM *et al*, 1992), els romanents de les lipoproteïnes riques en triglicèrids (Ji ZS *et al*, 1993) i les lipoproteïnes modificades, especialment les oxidades (Steinberg D *et al*, 1989), poden també intervenir en els mecanismes implicats en l'arteriosclerosi.

En relació a l'oxidació de les lipoproteïnes, detallarem posteriorment en l'apartat 1.6 els lligams que s'estableixen amb la patogènia de l'arteriosclerosi. L'esmentada relació ha estat vinculada fins ara, de totes maneres, a les LDL i als fenòmens que se'n deriven. Actualment, però, es comencen a conèixer les reaccions metabòliques lligades a l'oxidació de les HDL i les conseqüències que se'n poden extraure d'aquest fet (Nagano Y *et al*, 1991; La Ville AE *et al*, 1994).

Per altre costat, s'ha mostrat que l'oxidació de les LDL augmenta la reactivitat de les plaquetes, la qual cosa suggereix la importància potencial de la sensibilització de les plaquetes induïda per les LDL oxidades en la patogènesi de l'arteriosclerosi o la trombosi. Tampoc no es pot descartar el paper que poden jugar les plaquetes en la modificació de les LDL (Kruth HS, 1985; Aviram M, 1987). Tot això dóna una nova dimensió a la relació entre lipoproteïnes del plasma i malalties arterials (Ardlie NG *et al*, 1989).

En referència a la hipertensió arterial, cal subratllar el fet que aquesta no solament augmenta la incidència de manifestacions clíniques d'arteriosclerosi, sinó que també agreuja la seva evolució. De totes maneres, encara s'ha d'avançar més en el

coneixement dels efectes de la hipertensió sobre la placa arterioscleròtica (Martin MJ *et al*, 1986).

Un altre dels factors de risc per a l'arteriosclerosi, el tabac, augmenta la reactivitat de les plaquetes i la producció de prostaglandines: ambdós mecanismes afavoreixen el desenvolupament de l'arteriosclerosi i de la trombosi. D'altra part, s'ha provat que el fet de deixar de fumar comporta una disminució de la incidència de malaltia vascular (Smoking and Health, 1964; Kita T *et al*, 1993; Howard G *et al*, 1994; Sharfstein JM *et al*, 1994).

Els factors genètics tenen un paper important en el procés arterioscleròtic, com ara en la hipercolesterolèmia familiar i la hipoalfalipoproteïnèmia. Però és menys coneguda la interacció entre els factors genètics i els ambientals, socio-econòmics i nutricionals. Una de les hipòtesis que intenta lligar ambdós grups de factors proposa que l'augment de la resposta de la paret arterial, enfront de la lesió inicial, va lligada als determinants genètics (Goldstein JL *et al*, 1984a).

Així mateix, l'estudi dels factors implicats en el procés arterioscleròtic ha permès identificar-ne altres com ara els que formen part de la coagulació, de les malalties auto-immunes i de l'alcohol.

Finalment, l'interès per identificar i conèixer els factors de risc ha permès accedir al seu control, la qual cosa ha suposat una reducció de la mortalitat deguda a les malalties càrdio-vasculars.

1.3.- Lipoproteïnes i metabolisme lipoproteic

El nostre treball s'ha centrat en l'estudi de les lipoproteïnes i algun dels seus aspectes metabòlics, per aquest motiu analitzarem en aquest capítol les característiques de les lipoproteïnes i descriurem breument el seu comportament metabòlic.

1.3.1.- Estructura, nomenclatura i classificació dels lípids i de les lipoproteïnes del plasma

Els lípids juguen un paper important en el metabolisme humà, en particular poden participar en:

- el manteniment de la integritat de les cèl.lules i de les seves membranes,
- la constitució de reserves energètiques,
- el metabolisme intermediari,
- la transmissió i la transducció de senyals.

A començaments de segle, els químics caracteritzaven els lípids per la seva insolubilitat en l'aigua, amb la qual formen "pseudoemulsions" a causa de l'associació dels lípids amb les proteïnes. Entre les proteïnes transportadores específiques de les molècules lipídiques, destaquen, des d'un punt de vista quantitatiu, les partícules destinades al transport de colesterol, de triglicèrids i de fosfolípids que són els lípids majoritaris de l'organisme. Aquestes partícules, denominades lipoproteïnes, transporten els lípids en diverses direccions. Per tant, el coneixement d'aquestes estructures macromoleculares permet entendre la major part dels processos fisiològics i patològics que impliquen el metabolisme lipídic (Havel RJ *et al*, 1955; Havel RJ *et al*, 1973; Jackson RL *et al*, 1976; Morrisett JD *et al*, 1977; Polonovski J *et al*, 1983).

Les lipoproteïnes del plasma han estat classificades en funció de les seves característiques químiques i físiques. La divisió en referència a les característiques químiques té lloc en funció de: la composició química global (Jackson RL *et al*, 1976), la composició en àcids grassos (Skipski VP, 1972) o la composició en apolipoproteïnes (Alaupovic P, 1966). Quant a les característiques físiques que permeten diferenciar-les trobem: la densitat (Havel RJ *et al*, 1955), la mobilitat electroforètica (Lewis L, 1983), la fluïdesa (Jonas A, 1976), la grandària (Blanche PJ *et al*, 1981; Krauss RM *et al*, 1982). Tanmateix, les lipoproteïnes es poden classificar en funció de la seva reactivitat immunològica enfront d'immunosèrums

específics, en funció de la seva reactivitat química enfront dels polianions i de les lectines (reaccions de precipitació) i en funció del seu poder patogen.

1.3.2.- Estructura de les lipoproteïnes

Els diversos components que formen part de les lipoproteïnes es distribueixen a l'espai entre una regió perifèrica, la superfície i una regió central, el nucli (Jackson RL *et al*, 1976; Morrisett JD *et al*, 1977).

A la superfície d'aquestes lipoproteïnes existeixen tres tipus de molècules:

- les proteïnes denominades apolipoproteïnes;
- el colesterol no esterificat que és feblement hidròfil degut a la seva funció alcohol secundària lliure;
- quasi la totalitat dels fosfolípids amb un paper estructural i metabòlic fonamentals. Els fosfolípids s'orienten en l'edifici macromolecular de tal manera que presenten el seu grup polar vers l'exterior de la lipoproteïna i les seves cadenes grasses vers l'interior.

Pel contrari, en el centre de la partícula lipoproteica es troben les dues substàncies apolars: els triglicèrids i el colesterol esterificat. Aquest nucli hidròfob és totalment inaccessible als enzims plasmàtics (*Figura 2*).

1.3.3.- Nomenclatura de les lipoproteïnes

Les lipoproteïnes han estat classificades, com ja hem esmentat, tenint en compte diversos criteris d'acord amb les seves característiques físiques i químiques. En l'actualitat es manté la classificació en funció de la seva densitat i de la seva separació per ultracentrifugació de flotació (Havel RJ *et al*, 1955). A l'apartat següent definirem amb detall algunes de les característiques de les lipoproteïnes.

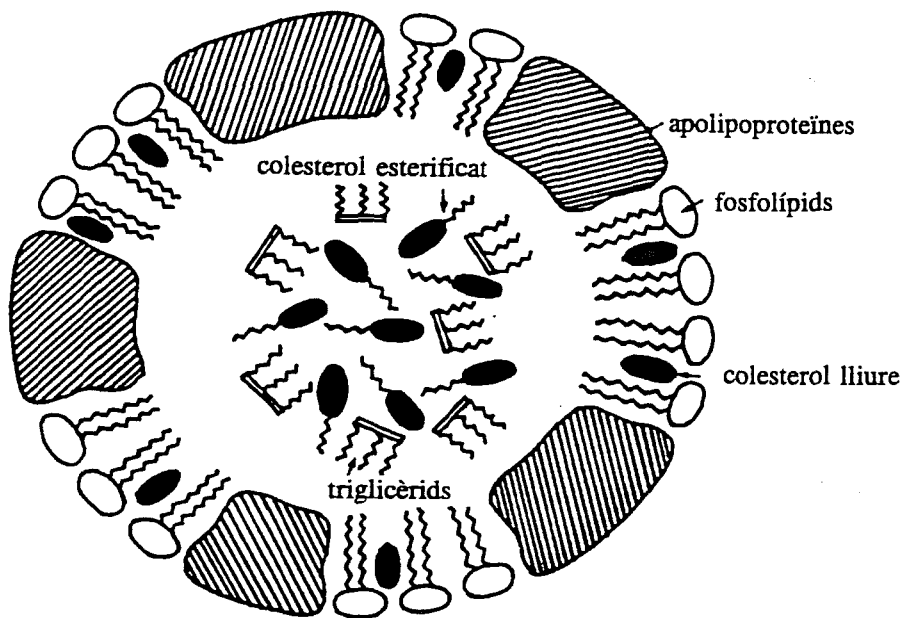


Figura 2.- Estructura d'una HDL.

Tenint en compte la densitat diferencial de les lipoproteïnes, aïllades per ultracentrifugació seqüencial preparativa (Havel RJ *et al*, 1955), s'han descrit els següents tipus:

- Quilomicrons ($d=0.940$),
- Lipoproteïnes de densitat molt baixa, *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL, $d=0.940-1.006$),
- Lipoproteïnes de densitat baixa, *Low Density Lipoprotein* (LDL, $d=1.006-1.063$),
- Lipoproteïnes de densitat alta, *High Density Lipoprotein* (HDL), HDL₂ ($d=1.063-1.125$) i HDL₃ ($d=1.125-1.210$). S'han de tenir en compte també les lipoproteïnes de densitat molt alta, pre- β -HDL o *Very High Density Lipoprotein* (VHDL, $d=1.210-1.250$).

A més a més, cada classe de lipoproteïna és polidispersa, de tal manera que és possible separar subfraccions (*Taula 1*).

Per altra part, es troba la Lp (a) ($d=1.055-1.085$), una lipoproteïna que deu el seu nom a una apolipoproteïna especial (apolipoproteïna (a)), lligada a l'apolipoproteïna B per ponts disulfur i que té una gran analogia en la seva estructura amb el plasminogen.

1.3.4.- Característiques físico-químiques de les lipoproteïnes del plasma

La *Taula 1* dóna les característiques bàsiques que defineixen les principals fraccions lipoproteïques del plasma.

1.3.4.1.- Característiques químiques

Les lipoproteïnes poden ser estudiades segons la seva composició química global, la composició en àcids grassos i la composició en apolipoproteïnes.

Taula 1.- Característiques físico-químiques de les lipoproteïnes del plasma

Lipoproteïnes	Grandària (nm)	Densitat (kg/l)	Massa molecular (MDa)
Quilomicrons	750-1000	< 1.000	> 150
VLDL	30-80	1.000-1.006	5-130
LDL	18-25	1.006-1.063	2.50
HDL₂	9-12	1.063-1.125	0.36
HDL₃	7-9	1.125-1.210	0.20
VHDL	< 7	1.210-1.250	0.15

(*Extreta de Hunninghake D.B. Med Clin North Am 1994; 78: 1-20*).

1.3.4.1.1.- Composició química global

La *Taula 2* dóna el contingut en colesterol total, lliure i esterificat, en triglicèrids, en fosfolípids i en proteïnes (totals i apolipoproteïnes) de les diferents classes de lipoproteïnes.

1.3.4.1.2.- Composició en àcids grassos

De cada classe de lipoproteïna podem conèixer la composició en àcids grassos de les diferents fraccions lipídiques: fosfolípids, triglicèrids i colesterol esterificat, així com de les seves subfraccions (Skipski VP, 1972).

Taula 2.- Composició química global de les lipoproteïnes humanes del plasma

Lipoproteïnes	Proteïnes	Fosfolípids	Colesterol lliure	Colesterol esterificat	Triglicèrids
Quilomicrons	2	5	1	2	90
VLDL	10	16	7	13	54
LDL	23	21	11	41	4
HDL	50	23	5	17	5
HDL ₂	42	35	5	13	5
HDL ₃	56	23	3	15	3
VHDL	72	20	2	5	1

Resultats expressats en % del pes total de les lipoproteïnes. (Extrèta de Kostner GM et al. Human plasma lipoproteïns. Berlin: De Gruyter, 1989; p. 25).

1.3.4.1.2.1.- Definició, estructura i nomenclatura dels àcids grassos

1.3.4.1.2.1.1.- Definició

S'anomenen àcids grassos els àcids carboxílics (R-COOH) aïllats a partir dels greixos, que contenen en la seva estructura els elements C, H i O. La seva funció bioquímica és molt important perquè participen en la biosíntesi dels lípids citoplasmàtics, en la utilització dels greixos alimentaris i en la formació i mobilització dels greixos de reserva, la qual cosa dóna lloc a una activitat important de catabolisme i anabolisme d'àcids grassos. En la *Taula 3* es detallen els principals àcids grassos i la seva procedència.

1.3.4.1.2.1.2.- Estructura dels àcids grassos

Els àcids grassos han estat dividits, en funció de la seva estructura, en àcids grassos saturats i insaturats, i aquests últims, al seu torn, en monoinsaturats i poliinsaturats (Lehninger A, 1975). Quant a la seva configuració espacial, els àcids grassos saturats són lineals. Per altra banda, els àcids grassos insaturats, els monoinsaturats i els poliinsaturats, presenten en general un nombre parell d'àtoms de carboni i de 1 a 6 dobles enllaços, tots *cis*, en una forma corba de U. Una característica que cal subratllar és que tots els dobles enllaços són *cis* per als àcids grassos insaturats amb paper fisiològic.

Així, doncs, l'estructura dels àcids grassos insaturats ve donada per:

- el nombre d'àtoms de carboni,
- el nombre de dobles enllaços,
- la posició d'aquests dobles enllaços.

Els àcids grassos podem trobar-los lliures o lligats, en particular, a les fraccions lipídiques com els triglicèrids, els fosfolípids i el colesterol esterificat amb un àcid gras.

1.3.4.1.2.1.3.- Nomenclatura dels àcids grassos

Hi ha dues nomenclatures, la dels químics i la dels fisiòlegs (Lehninger A, 1975). Els químics posen l'accent en el primer doble enllaç prop del grup carboxil. La nomenclatura dels fisiòlegs subratlla la importància del primer doble enllaç prop del grup metil terminal: aquest doble enllaç determina la pertinença a una família o sèrie. Per tal de reunir els avantatges de les dues nomenclatures, es va elaborar una nomenclatura de consens que consisteix en:

Cx:y,n-m

x: nombre d'àtoms de carboni,

y: nombre de dobles enllaços,

n-m: indica la posició del primer doble enllaç prop del grup metil, numerat a partir d'aquest grup terminal. Així, n-6, per exemple, significa que el primer doble enllaç es troba entre els carbonis 6 i 7 comptats a partir del grup metil. Els altres dobles enllaços es dedueixen d'aquest, ja que sempre hi ha, en situació fisiològica, 3 àtoms de C entre 2 dobles enllaços (estructura divinilmetà). Per exemple: l'àcid linoleic es representa per: C18:2,n-6 i l'àcid oleic per C18:1,n-9.

Detallarem la composició en àcids grassos de les HDL₃, lipoproteïna que hem estudiat en el present treball, per tal de donar una noció dels valors habituals que es troben en l'home (*Taula 4*).

Tipus d'àcid gras	Nomenclatura	Nom trivial	Nom sistemàtic	Greixos on es troba	
Saturats	C12:0	lauric	dodecanòic	Greixos de palmes i lauràcies, greixos de llet (oli de coco especialment).	
	C14:0	mirístic	tetradecanòic	Greixos de miristicàcies, quantitats menors en gairebé tots els greixos.	
	C16:0	palmitic	hexadecanòic	En gairebé tots els greixos (oli de palma especialment).	
	C18:0	estèric	octadecanòic	En molts greixos, especialment de mamífers terrestres.	
	C20:0	araquídic	icosanòic	Greixos de llavors de lleguminoses.	
	C22:0	behènic	docosanòic	Quantitats menors en olis de llavors.	
	C24:0	lignocèric	tetracosanòic	Quantitats menors en olis de llavors.	
	Insaturats amb un sol doble enllaç: monoinsaturats	C16:1,n-7	palmitoleic	cis-hexadec-9-enoic	Olis d'animals marins, quantitats menors en gairebé tots els greixos.
		C18:1,n-9	oleic	cis-octadec-9-enoic	En tots els greixos (olis d'oliva i d'ametlles especialment).
		C20:1,n-9	gadoleic	cis-icos-9-enoic	Olis d'animals marins.
		C22:1,n-9	erúic	cis-docos-13-enoic	Olis de tropeolàcies i crucíferes (oli de colza especialment).
		Insaturats amb més d'un doble enllaç: poliinsaturats	C18:2,n-6	linoleic	cis-cis-octadeca-9,12-dienoic
C18:3,n-3			linolenic	cis-cis-cis-octadeca-9,12,15-trienoic	En olis assecants (oli de llinosa especialment).
C20:4,n-6			araquidònic	eicosa-5,8,11,14-tetraenoic	Quantitats menors en molts greixos animals, fosfatids del cervell, del fetge i de les glàndules suprarenals oli de sardina.

Taula 3.- Relació dels principals àcids grassos i la seva procedència

Taula 4.- Composició en àcids grassos de les HDL₃

Àcids grassos	Fosfolípids	Triglicèrids	Colesterol esterificat
C14:0	0.5 ± 0.1	3.4 ± 0.2	1.5 ± 0.2
C16:0	24.7 ± 0.3	23.6 ± 0.4	12.1 ± 0.3
C16:1	0.4 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2
C18:0	12.3 ± 0.2	4.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1
C18:1,n-9	11.0 ± 0.4	42.0 ± 0.7	18.7 ± 0.8
C18:2,n-6	24.8 ± 1.0	18.1 ± 0.9	51.1 ± 1.6
C18:3,n-3	0.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1
C20:0	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1
C20:3,n-6	3.6 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.1
C20:4,n-6	11.6 ± 0.4	1.6 ± 0.1	6.9 ± 0.2
C20:5,n-3	1.0 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1
C22:5,n-3	1.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	2.2 ± 0.3
C22:6,n-3	6.3 ± 0.3	0.7 ± 0.1	1.0 ± 0.1
C24:0	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1
C24:1,n-9	1.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1

1.3.4.1.3.- Composició en apolipoproteïnes

Les apolipoproteïnes posseeixen activitat antigènica, la qual cosa permet la seva determinació en cada fracció utilitzant reactius immunològics. D'aquesta manera, podem distingir les següents apolipoproteïnes: A (A-I, A-II, A-III, A-IV), B (B-100, B-48), C (C-I, C-II, C-III₀₋₃), D, E, F, G, H. Per altre costat, Alaupovic va definir, l'any 1960, una nova classificació de les lipoproteïnes del plasma, tenint en compte la seva composició en apolipoproteïnes (Alaupovic P, 1966; Puchois P *et al*, 1985) (*Taula 5*).

L'obtenció d'anticossos específics per a cada apolipoproteïna ha permès, recentment, la caracterització immunològica de les lipoproteïnes de densitat i de mobilitat electroforètica idèntiques, que es poden descriure com una barreja de partícules lipoproteïques distintes amb una composició proteica definida. En aquesta nova classificació es consideren les lipoproteïnes plasmàtiques com un conjunt de partícules definides per la seva composició en apolipoproteïnes. Així:

- les partícules simples estarien formades per lípids associats a una apolipoproteïna;
- les partícules complexes estarien formades per lípids associats a dos o més apolipoproteïnes.

Cada família de partícules representa, de fet, un sistema polidispers; així les partícules que contenen únicament l'apolipoproteïna B (Lp B) o l'apolipoproteïna A-I (Lp A-I) poden ser retrobades en totes les classes de densitat. D'aquesta manera podem quantificar les partícules que contenen les apolipoproteïnes A-I i A-II però també les que contenen B i C-III, B i E, ...

Taula 5.- Composició en apolipoproteïnes de les lipoproteïnes del plasma

Apolipoproteïnes	Lipoproteïnes que les contenen
A-I	HDL, Quilomicrons
A-II	HDL, Quilomicrons
A-IV	HDL, Quilomicrons
B-48	Quilomicrons
B-100	VLDL, IDL, LDL
C-I	Quilomicrons, VLDL, HDL
C-II	Quilomicrons, VLDL, HDL
C-III	Quilomicrons, VLDL, HDL
D(A-III)	HDL
E	Quilomicrons, VLDL, HDL

(Extreta de Hunninghake D.B. *Med Clin North Am* 1994; 78: 1-20).

1.3.4.2.- Característiques físiques

Les lipoproteïnes poden ser analitzades en funció de la mobilitat electroforètica, la fluïdesa i la grandària.

1.3.4.2.1.- Mobilitat electroforètica

Des de fa temps s'ha utilitzat la càrrega elèctrica de les lipoproteïnes perquè permet classificar-les en funció de la seva migració, sota l'acció d'un camp elèctric en direcció a la càrrega positiva, sobre paper o sobre un gel (Lewis L, 1983).

La migració té lloc de la següent forma:

- els quilomicrons es queden a l'origen;
- les VLDL migren com les α -2 o pre- β -globulines;
- les LDL migren com les β -globulines;
- les HDL migren com les α -1-globulines;
- les VHDL migren com les pre- β -globulines.

1.3.4.2.2.- Fluïdesa

Els sistemes biològics tenen una organització espacial molecular que es basa majoritàriament en la naturalesa amfipàtica dels seus components. En realitat cada entitat molecular estarà sota la dependència de diferents factors dinàmics, lligats a l'estructura dels constituents o al seu comportament enfront de la temperatura. Globalment, el conjunt dels moviments existents en el si d'una estructura lipídica determina la dinàmica lipídica i defineix el concepte de fluïdesa.

Aquest concepte es pot aplicar a les lipoproteïnes. Per a mesurar la fluïdesa valorarem l'anisotropia de fluorescència, utilitzant el mètode de la polarització de fluorescència (Jonas A, 1976; Shinitzky M *et al*, 1978) (Taula 6).

Taula 6.- Fluïdesa de les lipoproteïnes humanes

Lipoproteïnes	Anisotropia de fluorescència (r)	
	24°C	37°C
VLDL	0.131 ± 0.018	0.100 ± 0.011
LDL	0.259 ± 0.010	0.218 ± 0.011
HDL	0.239 ± 0.023	0.188 ± 0.002
HDL ₃	0.239 ± 0.001	0.186 ± 0.001

*Resultats obtinguts en presència de la sonda 1,6-difenil-1,3,5 hexatriè (DPH).
L'anisotropia de fluorescència (r) representa la inversa de la fluïdesa.
(Extreta de resultats del nostre laboratori).*

1.3.4.2.2.1.- Concepte de fluïdesa *optimum*

La fluïdesa d'una estructura en la qual s'obtenen les funcions fisiològiques òptimes s'anomena fluïdesa *optimum* (fluïdesa òptima) (Shinitzky M *et al*, 1982; Shinitzky M, 1984). La integritat d'aquesta fluïdesa es pot mantenir mercès els processos d'adaptació i de regulació en què participen les modificacions de les aportacions alimentàries i les biosíntesis lipídiques.

D'aquí l'interès de la nutrició ja que el tipus d'àcid gras de la dieta és un modulador d'aquesta fluïdesa.

1.3.4.2.2.2.- Moduladors de la fluïdesa

La fluïdesa lipídica està regulada per dos grans tipus de moduladors:

- moduladors químics,
- moduladors físics (Shinitzky M *et al*, 1976).

1.3.4.2.2.2.1.- Moduladors químics

La seva acció es deu a fenòmens de translocació o d'intercanvis entre un sistema i l'exterior. La modulació de la fluïdesa mitjançant la composició química global s'exerceix en un temps de l'ordre de minuts a hores. Els principals moduladors químics, citats per ordre d'importància, són:

- colesterol
- triglicèrids
- fosfolípids
- grau d'insaturació dels àcids grassos
- proteïnes.

Colesterol

El colesterol exerceix, en condicions fisiològiques, un efecte rigidificant de les estructures lipídiques, és a dir, disminueix la fluïdesa d'aquestes. En particular, el colesterol estableix fàcilment enllaços amb els fosfolípids de tal manera que es formen zones de poca fluïdesa dins de l'estructura lipídica. Aquest fet té lloc d'una

manera més remarcable quan augmenta la concentració de colesterol a l'estructura esmentada. Així doncs, la relació colesterol/fosfolípids és un índex que està relacionat estretament amb la fluïdesa (Cooper RA, 1977).

Per altra banda, el colesterol s'intercanvia lliurement entre diversos sistemes anant sempre del sistema més ric en colesterol al més pobre, com té lloc entre les lipoproteïnes i les membranes cel·lulars (Lund-Katz S *et al*, 1984).

Triglicèrids

Contràriament al colesterol, els triglicèrids exerceixen un efecte fluïdificant (Deckelbaum RJ *et al*, 1984; Solà R *et al*, 1990).

Fosfolípids

L'esfingomielina i la fosfatidilcolina constitueixen el 50% dels fosfolípids dels sistemes biològics. Aquests dos tipus de fosfolípids es situen en els dos extrems possibles de l'efecte sobre la fluïdesa, així la presència d'esfingomielina rigidificaria l'estructura i la presència de fosfatidilcolina induïria la seva fluïdificació (Barenholz Y *et al*, 1980).

Grau d'insaturació dels àcids grassos

La introducció d'un doble enllaç *cis* en una cadena d'àcids grassos és essencial per a la seva fluïdesa. De fet, el doble enllaç provoca un augment del volum específic de l'àcid gras i, per tant, un augment de la fluïdesa. No obstant, la introducció d'un segon doble enllaç no augmenta de forma tant important la fluïdesa (Seelig A *et al*, 1977; Stubbs CD *et al*, 1981) (*Figura 3*).

Proteïnes

Les proteïnes tenen un efecte rigidificant sobre els fosfolípids del seu voltant pel compactament local que exerceixen sobre aquests (Shinitzky M *et al*, 1976). En la mesura que les proteïnes s'allunyen dels fosfolípids, aquest efecte és menys

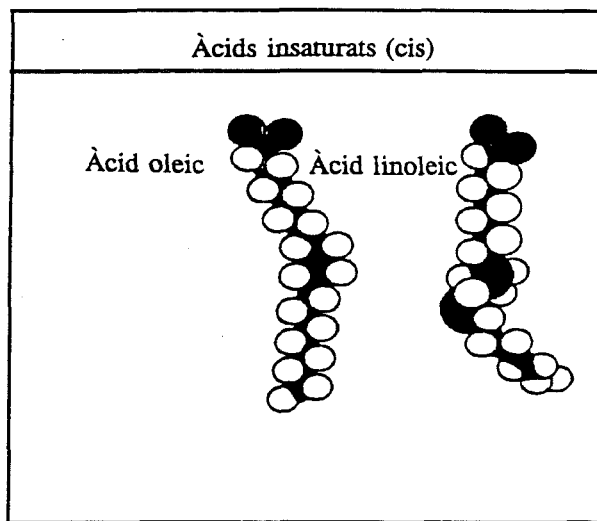


Figura 3.- L'esquema representa l'efecte de la presència d'un o dos dobles enllaços sobre la conformació a l'espai d'un àcid gras, és a dir, sobre el seu volum lliure. Per una longitud de cadena hidrocarbonada igual, els àcids grassos amb un doble enllaç ocupen un volum lliure més petit que si hi ha dos dobles enllaços. Aquests exemples ens mostren l'estructura de l'àcid oleic i linoleic. A més, en la naturalesa els àcids grassos tenen dobles enllaços en posició cis. (Extreta de Lehninger AL. Biochemistry, 1975; p. 282).

important. De totes maneres, en l'actualitat solament disposem de dades referents al paper de les proteïnes de la membrana sobre la fluïdesa; però no hi ha dades sobre el paper de les apolipoproteïnes en les propietats físico-químiques de les lipoproteïnes.

1.3.4.2.2.2.- Moduladors físics

A diferència dels moduladors químics, el seu efecte es realitza en un període de l'ordre de segons, la qual cosa, des del punt de vista fisiològic, es pot considerar com a instantàni (Shinitzky M *et al*, 1976).

Els principals moduladors físics són:

- temperatura
- volum.

Temperatura

Cada fosfolípid, independentment dels tipus d'àcids grassos que el constitueixin, té una temperatura de transició de fase que determina el límit entre l'estat de gel, poc fluid, i l'estat cristall-líquid, molt fluid. De totes maneres, aquest factor és poc remarcable en el cas dels organismes homeotermes com ara l'humà (Shinitzky M *et al*, 1976).

Volum

Es tracta d'un factor estàtic, és a dir, independent del temps. Aquest modulador està lligat a la fluïdesa (F) per l'equació de Batchinsky:

$$F = \frac{V - V_{+++}}{B}$$

V = Volum específic d'un fosfolípid.

V₊₊₊ = Volum per a una fluïdesa nul.la.

B = Constant dependent de cada fosfolípid.

Així, la introducció d'un o més dobles enllaços augmentarà V per un fosfolípid donat i, per tant, augmentarà F (*Figura 3*). Aquesta noció de volum és molt important en el cas de les manipulacions dietètiques en les lipoproteïnes. L'augment de la fluïdesa desencadenada per l'enriquiment en àcids grassos monoinsaturats dels fosfolípids tindrà un efecte important sobre el volum i, en conseqüència, sobre la grandària de les lipoproteïnes.

1.3.4.2.3.- Grandària

Si considerem que l'estructura de les lipoproteïnes és probablement esfèrica, podem separar les principals classes de lipoproteïnes en funció de la seva grandària (Blanche PJ *et al*, 1981, Krauss RM *et al*, 1982). La grandària expressada segons el diàmetre és, aproximadament, de 750-1000 nm per als quilomicrons, 30-80 nm per a les VLDL, 18-25 nm per a les LDL. Pel que fa a les HDL, podem diferenciar les HDL₂ amb un diàmetre de 9-12 nm i les HDL₃ de diàmetre 7-9 nm (*Taula 1*).

1.4.- Metabolisme de les lipoproteïnes

Una vegada definits els conceptes bàsics referents a les lipoproteïnes, estudiarem el seu comportament metabòlic.

La dieta habitual aporta al voltant del 30-40% del total calòric per dia en forma de lípids, dels que uns 100-150 g són triglicèrids i uns 500 mg són colesterol.

Aquests lípids absorbits a l'intestí són retransformats en un sistema hidròfil, les lipoproteïnes, la qual cosa permet el seu transport a través del plasma des del lloc d'absorció fins als punts de captació.

Així, a l'enteròcit es formen les estructures macromoleculares anomenades quilomicrons que, com ja hem dit, són partícules constituïdes per colesterol esterificat per àcids grassos, i triglicèrids que estan associats a les apolipoproteïnes B-48, A-I i A-IV. Aquestes macromolècules passen des de la limfa al plasma, on adquireixen les apolipoproteïnes C i E que provenen de les HDL (Friedman HI *et al*, 1972) (*Figura 4*). Aquests quilomicrons plasmàtics seran transformats, sota l'acció de l'enzim lipolític anomenat lipoproteïnàlipasa, localitzat a l'endoteli vascular, en romanents de quilomicrons (Fielding PE *et al*, 1977). Aquest enzim hidrolitza els triglicèrids en àcids grassos lliures, en monoglicèrids i en diglicèrids que seran utilitzats com a font d'energia en el múscul o emmagatzemats en el teixit adipós. Per altra banda, els fosfolípids i l'apolipoproteïna A-I seran transferits a les HDL. Durant aquest procés d'hidròlisi, els quilomicrons intercanvien amb les HDL els seus triglicèrids en contra del colesterol esterificat. Per tal que es realitzi aquest procés, és necessària l'acció de la proteïna que transfereix el colesterol esterificat: la proteïna de transferència dels èsters de colesterol (CETP) (Glomset JA, 1968).

L'apolipoproteïna E, present als quilomicrons parcialment delipidats o als romanents rics en colesterol esterificat, facilita l'eliminació d'aquestes partícules pel fetge, a

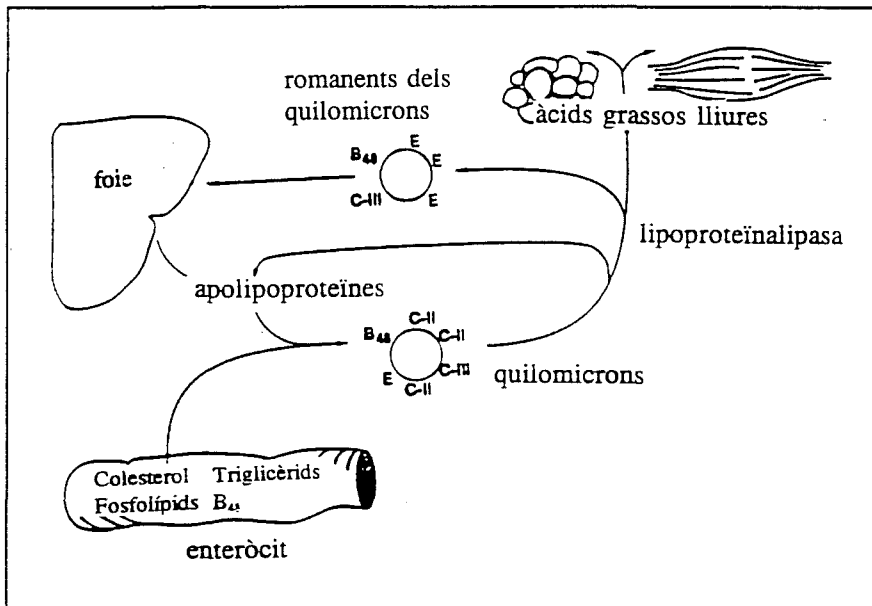


Figura 4.- Esquema del transport dels lípids exògens des de l'intestí vers els teixits perifèrics i el fetge. (Extreta de Hunninghake DB. Med Clin North Am 1994; 78: 1-67).

través de la interacció amb un receptor hepàtic específic de l'apolipoproteïna E (Mahley RW *et al*, 1983; Jäckle S *et al*, 1993).

Per altre costat, al fetge, els triglicèrids i el colesterol esterificat s'associen a l'apolipoproteïna B-100, a les apolipoproteïnes C (C-I, C-II i C-III) i E, per a formar les VLDL que són secretades sota aquesta forma. Des de la seva entrada a la circulació sanguínia, a l'endoteli capil·lar, aquestes VLDL estan sotmeses a l'acció de la lipoproteïnalipasa que hidrolitza els triglicèrids com ho feia en els quilomicrons. A més a més, es transfereixen a les HDL les apolipoproteïnes C i E de les VLDL. Aquest procés complex indueix la formació de les lipoproteïnes romanents de les VLDL, anomenades també IDL, que contenen l'apolipoproteïna B i l'apolipoproteïna E. Aquests romanents de les VLDL sofreixen una lipòlisi sota l'acció de la lipasa hepàtica, que també té una activitat fosfolipàsica. Les accions de la lipoproteïnalipasa i de la lipasa hepàtica comporten, doncs, la transformació dels romanents de les VLDL en LDL (Bilheimer DW *et al*, 1972). Aquestes VLDL són reconegudes per un receptor específic hepàtic recentment descrit (Ziere GJ *et al*, 1993) (*Figura 5*).

Per altra banda, les IDL i LDL poden ser reconegudes per un receptor hepàtic, anomenat receptor de les LDL, que interacciona amb les apolipoproteïnes B-100 i E (Goldstein JL *et al*, 1984a; Goldstein JL *et al*, 1984b). L'activitat del receptor de les LDL ve regulat, entre altres, pel contingut cel·lular en colesterol. Si el contingut intracel·lular en colesterol, en particular en el fetge, és feble, l'activitat del receptor LDL es veu augmentada; en conseqüència, es produeix una reducció de les concentracions de colesterol plasmàtic. D'altra banda, si el contingut en colesterol intracel·lular és elevat, es realitza el procés invers. Així, doncs, les LDL són distribuïdores de colesterol a les cèl·lules en un procés essencialment hepàtic, encara que totes les cèl·lules tinguin receptors de les LDL (Goldstein JL *et al*, 1984a; Goldstein JL *et al*, 1984b) (*Figura 5*).

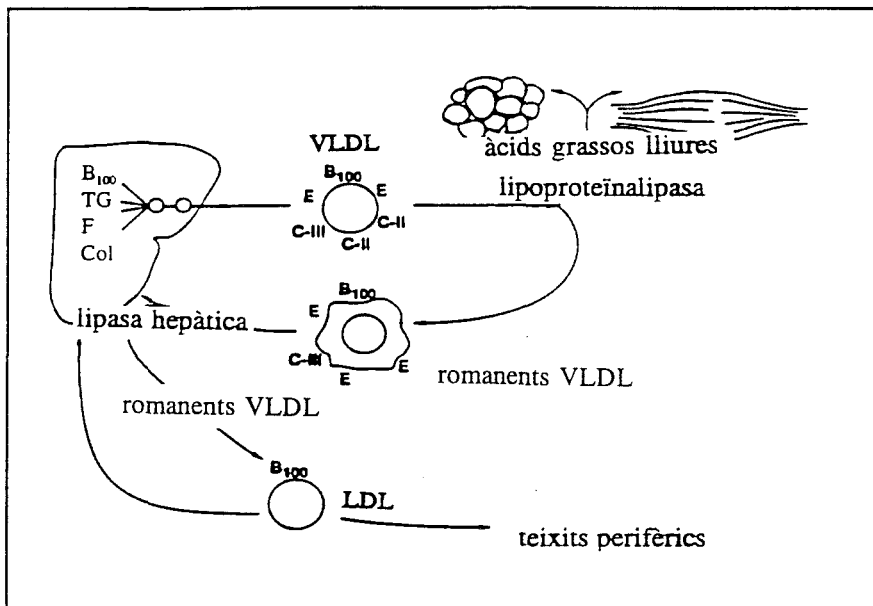


Figura 5.- Esquema del transport endogen dels lípids: en el fetge, els lípids s'associen a les apolipoproteïnes i formen les VLDL. Aquestes VLDL es transformen en romanents de VLDL o en IDL i després en LDL. (Extreta de Hunninghake DB. Med Clin North Am 1994; 78: 1-67).

En referència a les HDL, s'ha constatat que aquestes tenen un paper important, ja que asseguren el retorn del colesterol extrahepàtic en direcció al fetge per tal de permetre l'excreció. Aquest procés constitueix el transport invers de colesterol (Glomset JA, 1968).

Les HDL tenen un origen a la vegada hepàtic i intestinal. Aquests dos òrgans produeixen les apolipoproteïnes A-I i A-II que s'associaran als fosfolípids, al colesterol lliure, a les apolipoproteïnes E i a una petita quantitat de triglicèrids, per a formar una molècula discoïdal o HDL naixent (*Figura 6*).

Existeix una altra hipòtesi en referència a l'origen de les HDL. Aquestes s'obtidrien a partir de partícules esfèriques riques en triglicèrids, els quilomicrons i les VLDL. Aquestes lipoproteïnes sotmeses a les accions lipolítiques de la lipoproteïnàlipasa i de la lipasa hepàtica produeixen, a partir dels materials de superfície residuals, les HDL discoïdals (Friedman HI *et al*, 1972).

L'enzim lecitín colesterol aciltransferasa (LCAT) realitza l'esterificació del colesterol lliure de les HDL que, convertit en hidròfob, reposa en el centre de la lipoproteïna. La regió perifèrica queda alliberada i ocupada posteriorment per una nova molècula de colesterol no esterificat provinent de les cèl.lules dels teixits i que al seu torn es veurà sotmès a l'acció de la LCAT. Recentment, s'ha observat que el colesterol lliure dels teixits és captat per les pre- β_1 -HDL i transferit de manera molt ràpida i progressiva a les pre- β_2 -HDL, pre- β_3 -HDL i HDL₃ (Kunitake ST *et al*, 1992; Hennessy LK *et al*, 1993; Huang Y *et al*, 1993; Barrans A *et al*, 1994; Marques-Vidal P *et al*, 1994).

En aquesta cascada de remodelatge, sota l'acció de la LCAT, les HDL₃ augmenten la seva grandària per a donar les HDL₂. Aquestes HDL₂ intercanvien el seu colesterol esterificat enfront dels triglicèrids de les VLDL i els quilomicrons per l'intermedi de la CETP (Marotti KR *et al*, 1992). Les HDL₂, enriquides així amb triglicèrids, es veuen sotmeses a l'acció dels enzims lipolítics, en particular a la

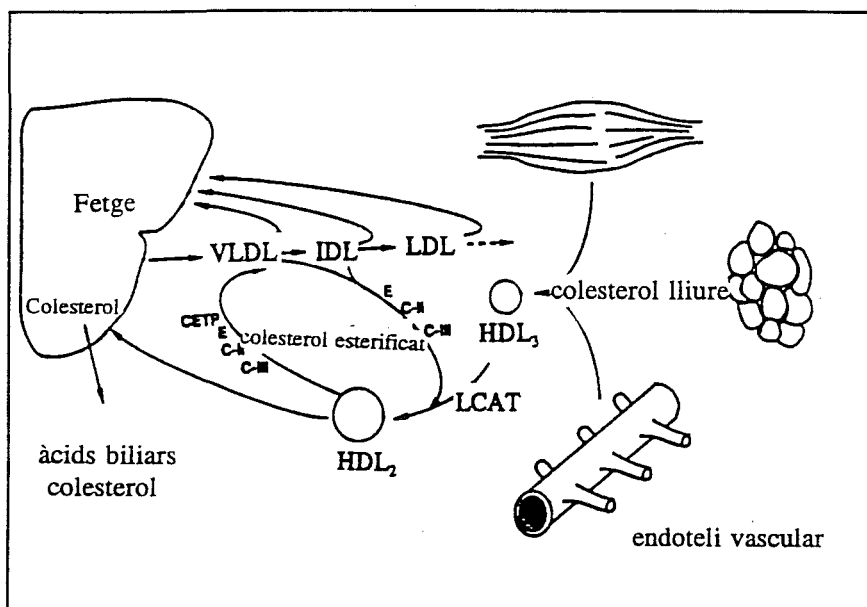


Figura 6.- Esquema del metabolisme de les HDL i del paper d'aquestes lipoproteïnes en el transport invers de colesterol: el colesterol lliure cel.lular es transfereix a les HDL₃. Després de l'esterificació produïda per l'acció de l'enzim LCAT, el colesterol es pot transferir directament a les lipoproteïnes que contenen l'apolipoproteïna B-100. (Extreta de Hunninghake DB. Med Clin North Am 1994; 78: 1-67).

lipasa hepàtica, que hidrolitzen els triglicèrids i els fosfolípids, i es transformen en HDL₃. La repetició d'aquest fenomen porta, poc a poc, el canvi de la configuració discoïdal de la HDL cap a una configuració esfèrica que permet l'eliminació dels excedents de colesterol dels teixits. El colesterol, emmagatzemat d'aquesta manera per les HDL₂, és cedit després als hepatòcits. Finalment, es reciclen les HDL (*Figura 6*).

Així doncs, el transport invers del colesterol comprèn les següents etapes (Glomset JA, 1968):

- la transferència del colesterol provinent de les cèl.lules o de les altres lipoproteïnes a les pre- β -HDL de grandària petita, o a les HDL₃ que són riques en fosfolípids i apolipoproteïna A-I;
- l'esterificació del colesterol sota l'acció de l'enzim LCAT. Aquest enzim és activat per l'apolipoproteïna A-I i comporta la transformació de les HDL₃ en HDL₂;
- el transport del colesterol en direcció al fetge, directament o per l'intermediari de la cascada de transformació de les VLDL en IDL i LDL, amb l'intercanvi dels triglicèrids i del colesterol esterificat amb les HDL, sota l'acció de la CETP;
- el reconeixement de les HDL₂ pels hepatòcits i, sota l'acció de la lipasa hepàtica, el reciclatge de les lipoproteïnes.

Finalment, es constata que el metabolisme de les lipoproteïnes està compost d'intercanvis i transformacions contínues, que es dirigeixen a la seva degradació final en el fetge.

1.5.- Oxidació lipoproteica

Una vegada analitzats els diversos aspectes que envolten les lipoproteïnes, com ara la seva classificació, característiques i metabolisme, examinarem els diversos successos que envolten la modificació oxidativa de les lipoproteïnes per tal d'aprofundir en la patogènia de l'arteriosclerosi. En concret, l'oxidació lipoproteica pot permetre trobar explicacions a fets no comprensibles des d'altres hipòtesis.

A més, per tal d'entendre més fàcilment els fenòmens lligats a l'oxidació lipoproteica, detallarem els fets que estan a la seva base. En concret, començarem per l'estudi dels radicals lliures que intervenen en els organismes vius i veurem en quines circumstàncies poden donar lloc a l'oxidació.

1.5.1.- Radicals lliures

Un radical és un àtom o grup d'àtoms amb un nombre imparell d'electrons. Encara que, estrictament parlant, la paraula lliure darrera de radical és innecessària (Traynham JG, 1986), seguirem utilitzant el terme radical lliure donat que és el més comú.

1.5.2.- Radicals lliures en els organismes vius. Radicals lliures de l'oxigen

Els radicals lliures són generats *in vivo* en el transcurs dels processos metabòlics normals. Així, l'acció catalítica de molts enzims cel.lulars i els processos de transport electrònic impliquen una transferència d'un electró que dóna radicals lliures intermedis (Freeman BA *et al*, 1982; Machlin LJ *et al*, 1987).

Degut a la presència de l'oxigen molecular en els organismes aeròbics i a la seva capacitat per a acceptar electrons, els radicals lliures de l'oxigen participen en processos com ara l'oxidació enzimàticament controlada de les biomolècules, la qual cosa permet l'alliberament d'energia i de compostos essencials per a la vida. De totes maneres, l'oxigen pot ser tòxic per a les cèl.lules, per la qual cosa les reaccions oxidatives són estrictament controlades en els sistemes biològics. No obstant, sota

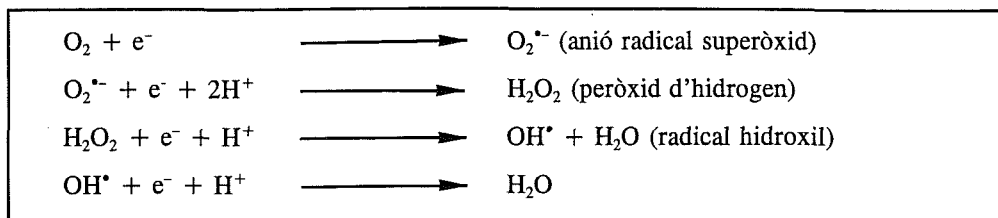
condicions fisiopatològiques, com ara en el trencament o la mort de teixits vius, es poden originar radicals lliures de l'oxigen. Aquests, a diferència de l'oxigen molecular, reaccionen fàcilment amb les molècules que es troben en la seva àrea d'influència (Kanner J *et al*, 1987).

Seguidament ens centrarem, doncs, en l'estudi dels radicals lliures derivats de l'oxigen degut a la importància d'aquests, per damunt de radicals lliures derivats del nitrogen o d'altres elements.

Els radicals lliures de l'oxigen, que s'anomenen espècies actives o parcialment reduïdes de l'oxigen, es formen quan la molècula d'oxigen capta, de manera seqüencial, quatre electrons per tal de donar diverses espècies, radicals i no radicals i arriba al final a una molècula d'aigua.

L'addició del primer electró porta a la formació de l'anió radical superòxid ($O_2^{\bullet-}$) que també s'anomena radical superòxid. Quan s'afegeix un segon electró es forma el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) que no és un radical. En l'addició d'un tercer electró s'origina una espècie inestable que es descompon per a donar finalment el radical hidroxil (OH^{\bullet}) i l'anió hidroxil (OH^-) que es convertirà en una molècula d'aigua. Aquest radical hidroxil format és altament destructiu per als éssers vius ja que pot captar un electró de quasi totes les molècules orgàniques que estiguin en posicions molt properes. De totes maneres, l'alta reactivitat de l' OH^{\bullet} pot ser un avantatge en el sentit que el radical tindrà una vida mitjana molt curta *in vivo* i en molts casos la seva reactivitat a l'atzar solament causarà dany en un lloc molt concret i en un temps molt limitat. Per últim, l'addició d'un quart electró en la seqüència dona lloc a la formació d'una molècula d'aigua.

Així doncs, els radicals lliures més agressius són: $O_2^{\bullet-}$ i OH^{\bullet} .



Per altre costat, hem de parlar també de l'oxigen singlet (1O_2) per la seva importància en l'oxidació. Aquest metabòlit és un estat excitat de l'oxigen no radical que també és capaç de reaccionar amb estructures biològiques. La seva formació pot provenir del subministrament d'energia en forma de llum (fotòlisi), de radiacions ionitzants (radiòlisi), d'un potencial elèctric (electròlisi) o també a través d'una reacció química o bioquímica com ara la reacció Haber-Weiss catalitzada pel ferro o la dismutació espontània de l'anió radical superòxid.

1.5.3.- Fonts biològiques dels radicals lliures

En relació a les fonts intracel.lulars de radicals lliures podem destacar:

- Autooxidació de molècules petites (tiols, hidroquinones, catecolamines, flavines, ...) en què es produeix $O_2^{\bullet -}$.
- Enzims i proteïnes solubles que generen $O_2^{\bullet -}$ durant el seu cicle catalític. Podem destacar la xantinaoxidasa, aldehidasa, flavoproteïna deshidrogenasa, etc.
- Transport electrònic mitocondrial en què es produeix $O_2^{\bullet -}$ i OH^{\bullet} . Els factors que influeixen en la producció de radicals mitocondrials són aquells que regulen la respiració.

- Sistemes de transport electrònic de les membranes del reticle endoplasmàtic i nuclear en què es troben implicats els radicals OH^{\bullet} i el $\text{O}_2^{\bullet-}$. Aquestes dues membranes intracel·lulars contenen citocrom P_{450} i b_5 . Per tal de realitzar la seva funció, requereixen com a cofactors la forma reduïda del dinucleòtid de nicotinamida i adenina (NADH) i la forma reduïda del fosfat de dinucleòtid de nicotinamida i adenina (NADPH).
- Peroxisomes: Són fonts potents de H_2O_2 però el sistema enzimàtic anomenat catalasa peroxisomal controla la producció del peròxid d'hidrogen per tal d'evitar la seva difusió al citoplasma (*Figura 7*).

1.5.4.- Altres fonts de radicals lliures

A més a més dels processos metabòlics normals, hi ha diverses formes per les quals un ésser viu pot ser exposat als radicals lliures. Entre ells podem destacar:

- activitat microbicida dels fagòcits activats (Weiss SJ *et al*, 1982),
- fàrmacs com ara agents antineoplàsics, antibiòtics, ... en què moltes de les seves propietats són degudes a la generació de radicals d'oxigen (Doroshov JH, 1990),
- irradiacions electromagnètiques o radioactives (Negre-Salvayre A *et al*, 1991),
- agents ambientals com ara pesticides, pol·lucionants, solvents, fum del tabac, hidrocarburs aromàtics, ... (O'Brien PJ, 1988).

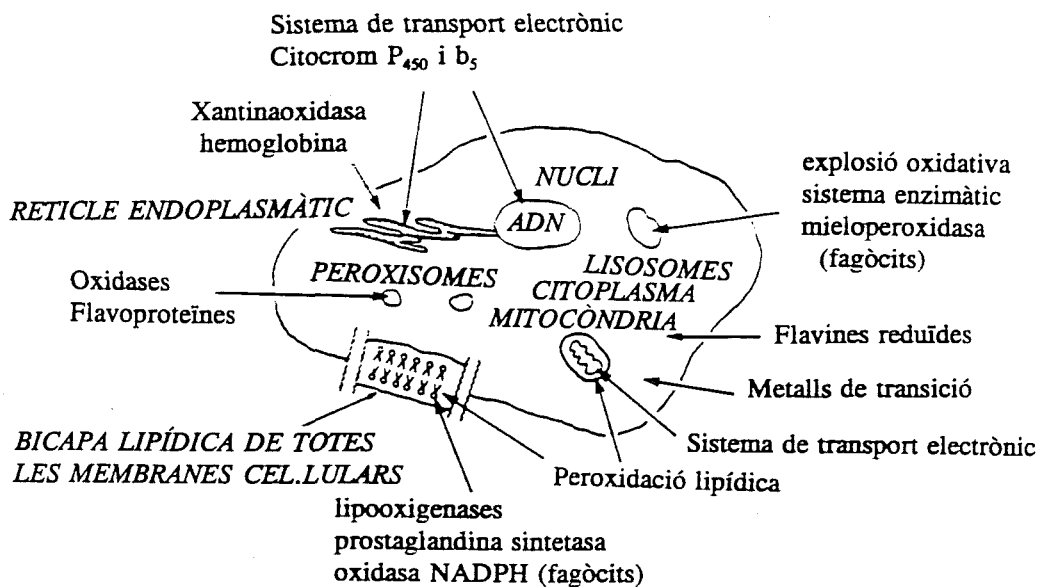


Figura 7.- Fonts intracel·lulars de radicals lliures. (Extreta de Machlin LJ et al. FASEB J 1987; 1: 441-445).

1.5.5.- Punts d'atac dels radicals lliures

La *Taula 7* resumeix els principals objectius dels radicals dins de la cèl.lula i les conseqüències que se'n deriven. De totes maneres, és important recordar que, de manera virtual, tots els components cel.lulars són capaços de reaccionar amb els radicals. Aquesta reacció implica una sèrie de modificacions metabòliques i estructurals de les cèl.lules que al final poden portar a la mort cel.lular.

Així doncs, malgrat que els processos d'oxidació es poden donar en totes les cèl.lules i en gran part dels seus components, ens centrarem en la reacció dels radicals de l'oxigen amb els àcids grassos poliinsaturats ja que aquests formen part, no solament de totes les estructures que tenen membrana, sinó també de les lipoproteïnes. De totes maneres, cal recordar que la reacció dels radicals lliures de l'oxigen amb els àcids grassos poliinsaturats pot tenir lloc a través de dues vies: una enzimàtica, controlada, que donarà lloc a les prostaglandines i leucotriens, i una altra no enzimàtica, a l'atzar, que es dona quan existeixen condicions favorables per a l'oxidació. Aquesta darrera via és la que estudiarem a continuació.

Taula 7.- Objectius dels radicals lliures dins de la cèl.lula

Objectiu	Conseqüència
<i>. Molècules petites</i>	
Molècules petites amb dobles enllaços i aminoàcids que contenen grups tiol	Desnaturalització i entrecreuament de la proteïna, inhibició de l'enzim. Canvis en la permeabilitat de les cèl.lules i de les organel.les.
Bases dels àcids nucleics	Canvis en el cicle cel.lular, mutacions.
Hidrats de carboni	Canvis del receptor de superfície de la cèl.lula.
Lípids insaturats	Oxidació dels àcids grassos i del colesterol. Entrecreuament dels lípids. Canvis en la permeabilitat de la cèl.lula i de les organel.les.
Cofactors	Disminució de la disponibilitat i activitat dels cofactors, tant la nicotinamida com la flavina.
Neurotransmissors	Disminució de la disponibilitat i activitat dels neurotransmissors, incloses la serotonina i epinefrina.
Antioxidants	Disminució en la disponibilitat de l' α -tocoferol i del β -carotè.
<i>. Macromolècules</i>	
Proteïnes	Escissió de la cadena peptídica, desnaturalització de la proteïna.
ADN	Escissió de la cadena, modificació de les bases.
Àcid hialurònic	Canvi en la viscositat del fluid sinovial.

(Extreta de Freeman BA et al. Lab Invest 1982; 47: 412-426).

1.5.6.- Estrès oxidatiu

Aquest és un concepte que sorgeix quan es desequilibra el balanç de l'equilibri prooxidant-antioxidant a favor del primer dels dos. Aquest fet té lloc degut a l'atac incontrolat i a l'atzar dels àcids grassos poliinsaturats. D'altra part, l'organisme intenta evitar, a través de diversos sistemes, que es doni aquesta reacció que pot tenir conseqüències molt negatives per al seu funcionament correcte. De totes maneres, aquests sistemes de defensa poden fallar de tal manera que s'origina l'estrès oxidatiu.

Per tal d'analitzar l'estrès oxidatiu és necessari estudiar cadascun dels dos aspectes que hi estan implicats, és a dir:

- Radicals lliures i cadena de peroxidació lipídica;
- Sistemes antioxidants.

1.5.6.1.- Radicals lliures i cadena de peroxidació lipídica

Com dèiem, l'organisme viu produeix de forma constant l'anió radical superòxid o el peròxid d'hidrogen al llarg de diversos processos metabòlics. De totes maneres, el cos té una sèrie de defenses que permeten controlar el nivell d'ambdues espècies i, d'aquesta manera, impedir que participin en el procés de peroxidació lipídica, que definirem una mica més endavant.

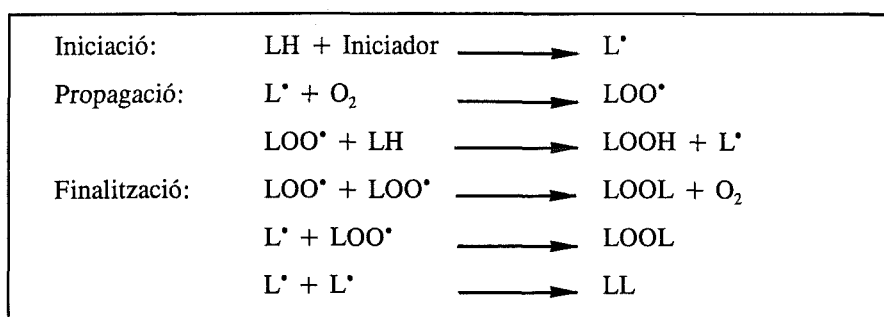
Per un altre costat, la gran reactivitat del radical hidroxil impedeix que el cos l'utilitzi com a substrat. Aquest és el motiu pel qual tots els esforços de la cèl.lula van adreçats a prevenir la seva formació. Això no impedeix que el radical hidroxil es formi, en més o menys quantitat, en la reacció entre el peròxid d'hidrogen i els ions ferrós o cúpric segons el mecanisme de l'anomenada reacció d'Haber-Weiss. Així mateix, la generació del radical hidroxil pot ser causada per fàrmacs com ara l'adriamicina, un agent anticancerigen i cardiotòxic (Bannister JV *et al*, 1983).

Així, sota condicions patològiques o en presència de certs medicaments, es poden formar quantitats molt més grans de radicals o d'espècies activades de l'oxigen que

en condicions normals, de tal manera que puguin realitzar un atac a l'atzar sobre les macromolècules orgàniques que es trobin properes al punt de la seva generació (Kanner J *et al*, 1987). En últim terme, aquest atac podria portar a la superació de les defenses de la cèl.lula, la qual cosa podria conduir al dany i, fins i tot, a la mort de la cèl.lula.

Dins dels possibles atacs que poden realitzar els radicals, és important l'agressió sobre els àcids grassos poliinsaturats dels fosfolípids, tant de la membrana cel.lular com de les lipoproteïnes. Aquest atac té lloc, principalment, sobre els àcids grassos que tenen més facilitat per a donar un hidrogen per l'estabilització d'un radical lliure adjacent a un doble enllaç (Sevanian A *et al*, 1985). En concret, la susceptibilitat dels àcids grassos insaturats a l'oxidació augmenta amb el grau d'insaturació en la proporció següent: oleic < linoleic < linolènic (1:10:30, respectivament) (Labuza TP, 1971).

L'atac d'un dels possibles iniciadors de l'autooxidació o peroxidació lipídica en cadena sobre els àcids grassos poliinsaturats, com ara l'atac del radical hidroxil OH[•], podria esquematitzar-se de la següent manera:



Dins d'aquest procés, la iniciació es realitza, preferentment, a través de l'extracció d'un àtom d'hidrogen de la molècula de lípid, la qual cosa genera el radical d'aquest lípid que estarà implicat posteriorment en la cadena de peroxidació lipídica.

Dins de l'etapa anomenada de propagació es donen les següents classes de reaccions:

- a) processos de transferència d'àtoms o grups d'àtoms (ex., reacció dels radicals peroxi amb els alcans amb la transferència d'un àtom d'hidrogen);
- b) addició del radical (incloent la ciclació) als substrats insaturats (ex., addició del radical carbonil a l'oxigen o ciclació dels radicals);
- c) reaccions de fragmentació del radical (ex., generació d'aldehids i cetones com a producte de la fragmentació dels peròxids);
- d) reaccions de reordenació (ex., reordenacions dels radicals peroxi).

Per últim, en l'etapa de finalització es dona la combinació dels radicals, per acoblament o disproporcionació, per a formar productes no radicals (Porter NA, 1990).

En concret, a la *Figura 8* es dona un esquema més detallat de les fases de la peroxidació lipídica que tenen lloc en l'oxidació de les lipoproteïnes.

Per altre costat, l'atac per part de l'oxigen singlet, una altra espècie capaç d'iniciar la peroxidació lipídica, té lloc per un mecanisme diferent que consisteix en la seva addició directament al doble enllaç. En el nostre cas, són significatius per la seva importància l'addició a l'oleat (Frankel EN, 1980) i al colesterol (Smith LL, 1991).

1.5.6.2.- Sistemes antioxidants

El terme antioxidant pot ser utilitzat per a descriure qualsevol substància que, en concentracions significativament més baixes que les del substrat al qual protegeix, inhibeixi o retardi la seqüència oxidativa d'aquest (Gutteridge JMC, 1990).

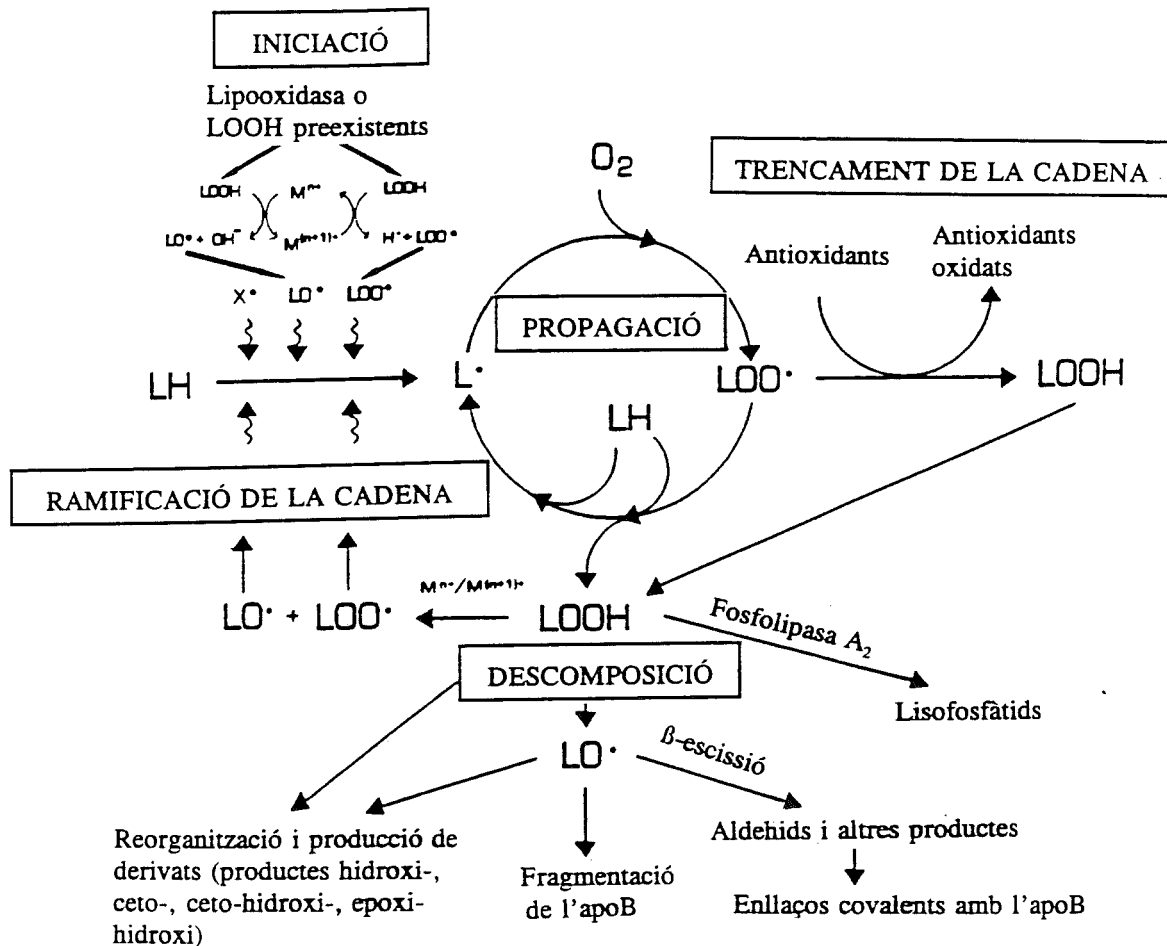


Figura 8.- Esquema que mostra de forma més detallada les diferents fases de la peroxidació lipídica: iniciació, propagació i finalització. L'esquema s'aplica a una LDL però sembla, segons els coneixements actuals, que també correspondria a una HDL. (Extreta de Esterbauer H et al. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341-390).

Existeixen múltiples classificacions dels antioxidants si bé una de les més completes podria ser la que inclou les molècules que protegeixen tots els tipus de constituents cel·lulars (*Figura 9*):

- a) Antioxidants anomenats primaris que consistirien en enzims (superòxid dismutasa, glutatió peroxidasa, ...) i compostos (vitamina E, β -carotè, àcid úric, ...), que s'encarregarien de prevenir tant les reaccions d'iniciació com les de propagació dels radicals o de l'oxigen singlet amb els constituents cel·lulars. Aquests antioxidants podrien protegir les proteïnes amb la mateixa eficiència amb què preserven els lípids, els àcids nucleics o els hidrats de carboni. Al seu torn, aquests antioxidants primaris podrien subdividir-se en:
 - a.1) els anomenats preventius, que són aquells que desactiven, d'una part, les espècies actives de l'oxigen (ex., l'anió radical superòxid $O_2^{\cdot-}$) i, per altra, els possibles precursors dels radicals lliures, per la qual cosa suprimeixen la generació d'aquests radicals. Aquest tipus d'antioxidants redueixen la velocitat de la fase d'iniciació del procés de peroxidació lipídica. En concret, trobem la superòxid dismutasa, la glutatió peroxidasa, la catalasa, la transferrina i la ceruloplasmina, i el β -carotè i la vitamina A que desactiven l'oxigen singlet.
 - a.2) els antioxidants que interfereixen en l'etapa de propagació del procés de peroxidació lipídica, per la qual cosa trencarien aquest procés per a donar el radical estable de l'antioxidant. Aquí trobem l'àcid ascòrbic, el glutatió, la vitamina E, l'àcid úric i la cisteïna.

De totes maneres, un dels problemes principals que es troba en l'estudi de la peroxidació lipídica en sistemes d'importància biològica és la dificultat a separar sense ambigüitat l'activitat antioxidant de prevenció de la cadena de la corresponent a la propagació de la cadena de peroxidació.

- b) Antioxidants que intenten evitar l'acumulació de les proteïnes danyades per l'oxidació i que s'encarreguen de degradar els fragments de proteïna potencialment tòxics. Aquest grup inclou, entre d'altres, els sistemes de reparació de l'ADN i els sistemes proteolítics. Aquests tipus d'antioxidants

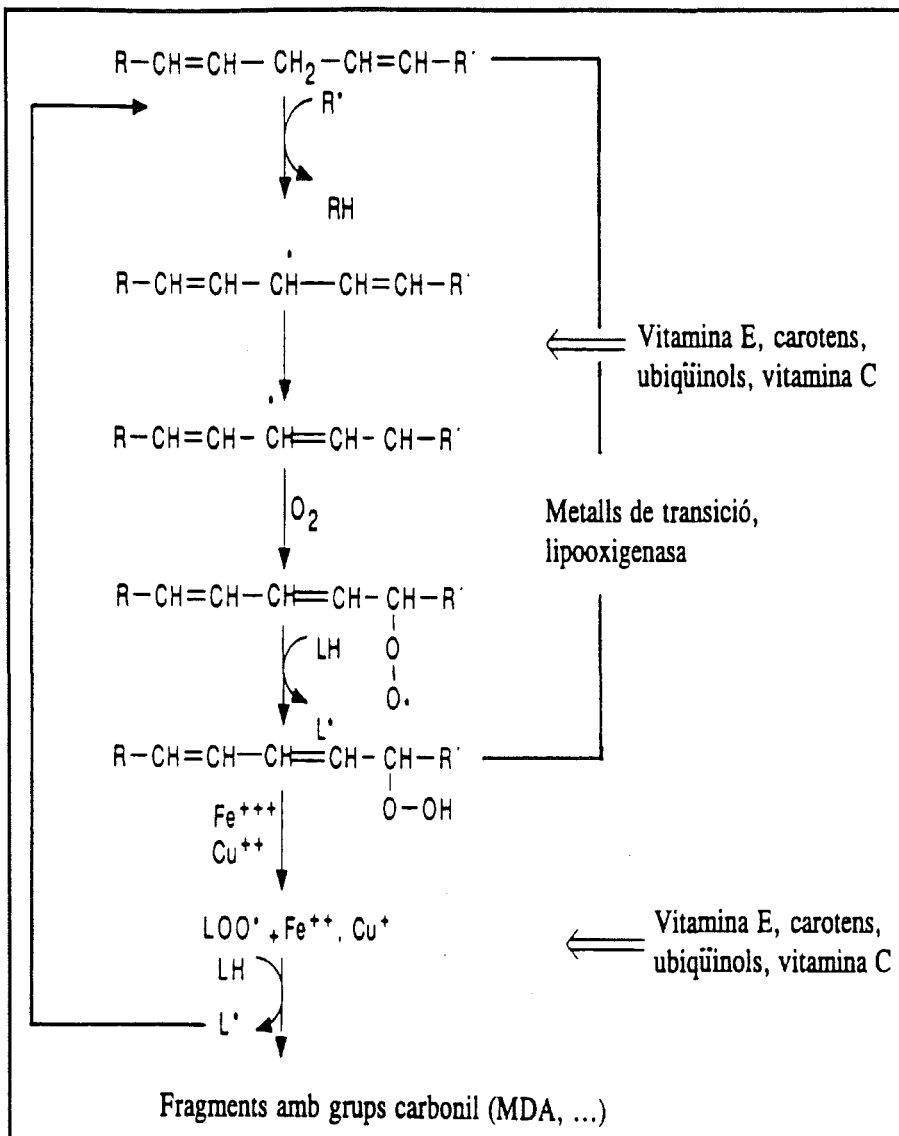


Figura 9.- Possibles mecanismes pels quals els antioxidants com la vitamina E, ubiquinols, carotenoides i vitamina C poden actuar de manera sinèrgica per tal de bloquejar la reacció en cadena (Extreta de Camejo G. Clin Invest Arteriosclerosis 1993; 5: 73-83).

poden ser de gran importància quan tots els altres sistemes previs han estat insuficients per a fer front a l'estrès oxidatiu (Davies KJA, 1988).

De totes maneres, els antioxidants anteriorment descrits també es poden dividir en aquosos i liposolubles, tenint en compte si actuen en la fase aquosa o lipídica, respectivament. Així, els radicals formats en la regió aquosa són depurats exclusivament per antioxidants hidrofílics, tals com l'àcid ascòrbic o l'àcid úric. Per un altre costat, els radicals que penetren en les zones lipídiques i els radicals generats inicialment dins de les zones lipídiques són depurats pels antioxidants liposolubles com la vitamina E.

Cal tenir en compte, tanmateix, la capacitat que l'organisme té de regenerar un determinat antioxidant. Si no ho pot fer, l'organisme crearà sistemes de protecció d'aquest antioxidant per tal de preservar-lo al màxim. Així, existeix un sistema de regeneració de la vitamina E, dut a terme bàsicament per la vitamina C (Niki E *et al*, 1985). Pel contrari, el cos no té sistemes de protecció per al colesterol i l'albúmina (Halliwell B, 1988), donat que són compostos que el cos pot obtenir fàcilment (*Figura 10*).

En els propers apartats explicarem les propietats antioxidants de:

- enzims
- elements traça
- vitamines
- HDL
- colesterol.

En la *Figura 11* es dona l'estructura dels principals antioxidants biològics.

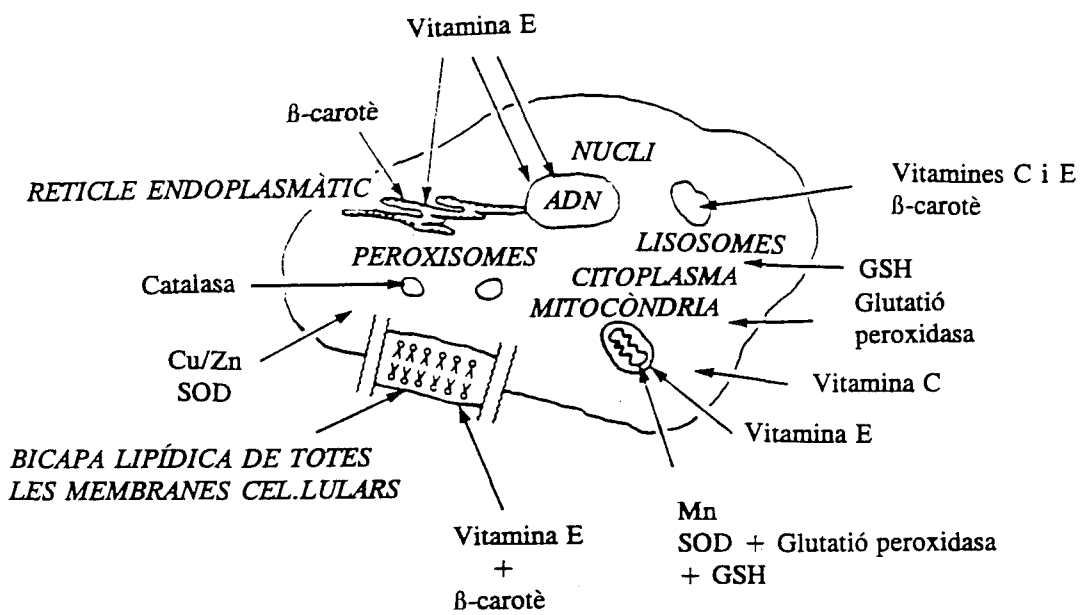
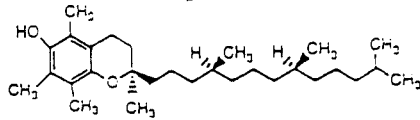


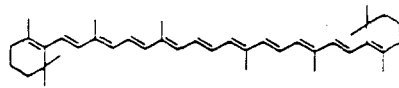
Figura 10.- Protecció antioxidant a l'interior de la cèl.lula. (Extreta de Machlin LJ et al. FASEB J 1987; 1: 441-445).

Estructura dels antioxidants

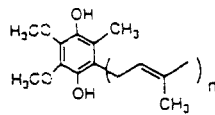
Liposolubles



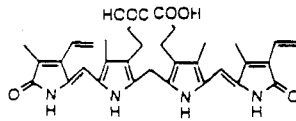
α -tocoferol



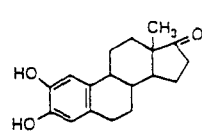
β -carotè



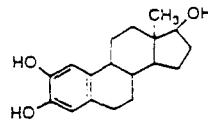
Ubiquinol



Bilirubina

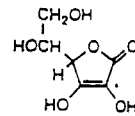


Hidroxiestrona

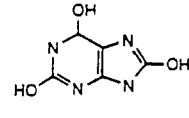


Hidroxiestradol

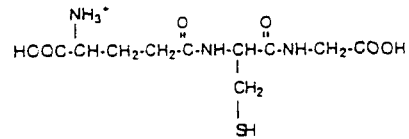
Hidrosolubles



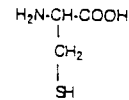
Àcid ascòrbic



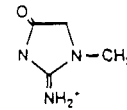
Àcid úric



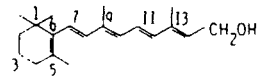
Glutatió



Cisteïna



Creatina



Retinol

Figura 11.- Estructura química dels antioxidants biològics. (Extreta de Camejo G et al. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1993; 5: 73-83).

1.5.6.2.1.- Enzims

Entre els enzims antioxidants destaquem les superòxids dismutases, la catalasa i la glutatió peroxidasa. Aquests enzims estan subjectes a la regulació per l'estat de nutrients de la cèl.lula, teixit o organisme. Els enzims requereixen cofactors inorgànics per a la seva funció catalítica i, d'aquesta manera, els elements traça en la dieta esdevenen crítics en la seva expressió i, fins i tot, en la seva regulació (Harris ED, 1992).

1.5.6.2.2.- Elements traça

Existeixen diversos metalls fisiològicament importants que formen part dels enzims antioxidants. Així, el zinc (Bray TM *et al*, 1990), el coure i el manganès són necessaris per a l'activitat dels dos tipus de superòxid dismutasa. El seleni és un component essencial de la glutatió peroxidasa.

1.5.6.2.3.- Vitamines amb funció antioxidant

1.5.6.2.3.1.- Vitamina E

La vitamina E és l'antioxidant soluble en lípid més important. En referència a la nomenclatura, s'ha recomanat que s'utilitzi el terme vitamina E per a la descripció genèrica de tots els compostos que tenen activitat biològica com l' α -tocoferol (Machlin LJ, 1991).

L' α -tocoferol constitueix el 90% del total de tocoferols existents en els teixits animals. Els β -, γ -, δ -tocoferols tenen solament, de manera aproximada, un 40, 20 i 10%, respectivament, de l'activitat biològica de l' α -tocoferol (Burton GW *et al*, 1982).

Una característica destacable és que són substàncies termolàbils i fotosensibles.

Estructura

Existeixen vuit compostos naturals que tenen activitat vitamina E (Machlin LJ, 1991), dels quals 4 són tocols o tocoferols i els altres 4 són tocotrienols. Així, es dedueix que el terme tocoferol no és sinònim de vitamina E.

Transport

La vitamina E és transportada en el plasma humà per les lipoproteïnes (Traber MG *et al*, 1988). Les LDL i HDL contenen al voltant del 90% del total de la vitamina E del sèrum en humans (Clevidence BA *et al*, 1989), associada predominantment amb les HDL (Granot E *et al*, 1988).

Funció

La funció biològica de la vitamina E no ha estat totalment resolta. De totes maneres, la major part de les teories actuals sobre la seva acció s'engloben en dues categories àmplies: una d'elles suggereix un paper antioxidant protector, mentre que l'altra proposa una funció metabòlica i estructural en els organismes vius:

- 1) **Funció antioxidant:** La hipòtesi antioxidant (Tappel AL, 1962) suposa que l'única funció de la vitamina E en els sistemes biològics és que ella s'oxida, evitant així l'oxidació dels lípids insaturats. De totes maneres, la vitamina E ha d'incorporar-se dins de la membrana cel·lular per a poder exercir la seva capacitat antioxidant (Hennig B *et al*, 1987).
- 2) **Funció metabòlica i estructural:** La vitamina E també actua com un component estructural que estabilitza les biomembranes que contenen àcids grassos insaturats (Takenaka Y *et al*, 1991).

Una de les altres funcions assignades consisteix en la incidència de la vitamina E sobre la cascada de productes de l'àcid araquidònic (Cao YZ *et al*, 1987).

1.5.6.2.3.2.- Vitamina C

La vitamina C és un dels antioxidants hidrosolubles més importants en el plasma humà. De totes maneres, cal subratllar que, en funció d'una sèrie de condicions, pot actuar com una substància pro-oxidant (Wefers H *et al*, 1988; Wang X *et al*, 1992).

1.5.6.2.3.3.- Vitamina A i carotenoides

La vitamina A és una vitamina liposoluble. Dins dels carotenoides, destaca el paper del β -carotè com la forma més comuna i efectiva de provitamina A.

Funció

A més a més del seu paper com antioxidants preventius (Diplock AT, 1991), hi ha un altre aspecte sorprenent: s'ha trobat que la suplementació de la dieta amb β -carotè augmenta de forma petita, però significativa, el colesterol de les HDL (Ringer TV *et al*, 1991).

1.5.6.2.3.4.- Interdependència entre els diversos sistemes antioxidants

Els diversos sistemes antioxidants interactuen entre ells per a donar una efectivitat global més gran. Així, algunes de les combinacions més importants són:

- Vitamina C + vitamina E (Niki E *et al*, 1985);
- Vitamina C + glutatió (Wefers H *et al*, 1988).

1.5.6.2.4.- Altres antioxidants

1.5.6.2.4.1.- HDL

S'ha mostrat que les HDL protegeixen *in vitro* a les LDL de la peroxidació lipídica (Hinsbergh VWM van *et al*, 1986; Chander R *et al*, 1990; Parthasarathy S *et al*, 1990a; Klimov AN *et al*, 1993). Aquest efecte pot ser el reflex del més alt contingut de vitamina E de les HDL o de la seva capacitat d'eliminar l'anió radical superòxid (Chander R *et al*, 1990). Per altra banda, s'ha suggerit que les HDL poden segrestar els ions Cu^{2+} o Fe^{2+} a fi de prevenir la seva participació en les reaccions per radicals (Halliwell B, 1988).

1.5.6.2.4.2.- Colesterol

Malgrat els efectes perjudicials que han assenyalat els estudis epidemiològics en referència a l'augment excessiu del colesterol en el plasma, s'ha mostrat la capacitat antioxidant del colesterol. Per explicar aquesta aparent contradicció, s'ha plantejat la hipòtesi que l'organisme acumularia nivells més elevats de colesterol per tal de contrarestar l'efecte de l'increment d'oxidants del medi (Smith LL, 1991).

1.5.6.2.5.- Antioxidants existents en el plasma humà

En el plasma humà trobem una sèrie de mecanismes de defensa antioxidants, que el fan altament resistent a la peroxidació (Wayner DDM *et al*, 1985).

Per a definir el concepte global d'antioxidants del plasma, disposem del paràmetre anomenat en anglès TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Potential*), que podríem denominar capacitat total antioxidant per a captar radicals peroxi. S'ha mesurat experimentalment que la participació a la capacitat de captar o "atrapar" radicals en el plasma humà és el següent: 35-65% per a l'urat, 0-24% per a l'ascorbat, 5-10% per a la vitamina E i 10-50% per a les proteïnes del plasma (Wayner DDM *et al*, 1987). Malgrat que la vitamina E representa solament una petita fracció d'aquest TRAP, possiblement té un paper vital en el manteniment d'una inhibició eficient de la peroxidació a través de les seves interaccions amb altres antioxidants (Niki E *et al*, 1985).

1.5.6.3.- Mesura de la peroxidació lipídica com a reflex de l'estrès oxidatiu

Ara bé, coneguda la importància de l'estrès oxidatiu, es comprén que una de les grans necessitats en el camp de la biologia dels radicals lliures consisteix en el desenvolupament d'una mesura fiable d'aquest, tant en teixits com en membranes i lipoproteïnes.

En concret, és crucial trobar tècniques específiques i sensibles per a poder donar una evidència directa i inequívoca del balanç final entre les condicions oxidants i

antioxidants *in vivo*. Tècniques molt acurades ens permetran conèixer de manera molt més exacta la contribució dels antioxidants en el balanç (Chow CK, 1991).

Un aspecte que cal tenir en compte és la determinació dels productes d'oxidació de les reaccions metabòliques en condicions fisiològiques, sense evidència de patologia. Un coneixement exhaustiu d'això permetrà una valoració més precisa dels productes d'oxidació lligats a la patologia (Martin W, 1984).

Un altre problema addicional és la producció *ex vivo* d'un producte d'oxidació que ens falsejarà els nostres resultats. En particular, aquest problema ha de ser minimitzat a través d'un control escrupolós del procediment de recollida i del temps, temperatura i condicions d'emmagatzematge.

De totes maneres, una de les dificultats consisteix en el fet que les espècies actives de l'oxigen i els radicals lliures són tan reactius i de vida tan curta que són difícils de mesurar directament; per aquesta raó, la major part de les metodologies avaluen els productes de la cadena de la peroxidació lipídica com un reflex de l'estrès oxidatiu.

De manera esquemàtica, els procediments per a conèixer el grau de peroxidació lipídica en sistemes biològics mesuren els següents compostos:

- precursors dels hidroperòxids lipídics, tals com els diens conjugats i els radicals peroxi,
- hidroperòxids lipídics per se,
- productes de degradació dels hidroperòxids lipídics tals com alcans i aldehids,
- productes secundaris tals com compostos base-Schiff fluorescents.

De totes maneres, ja que cadascun d'aquests mètodes representa solament un aspecte dels processos complexos de l'oxidació lipídica, seria convenient mesurar de manera simultània diversos productes de la reacció; per exemple, canvis en els àcids grassos

que han estat afectats, canvis en els antioxidants que han estat consumits i diversos productes intermedis o finals de l'oxidació (Pryor WA *et al*, 1991; Sahlin K *et al*, 1991).

Les *Taules 8a i 8b* donen un resum d'algunes de les tècniques emprades en mostres biològiques, així com dels seus avantatges i inconvenients.

Test de les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (Thiobarbituric-acid-reactive substances, TBARS)

Seguidament detallarem el test de les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (TBARS), que indicarem de manera breu a la *Taula 8b*, per ser aquest el mètode més comú a causa de la seva simplicitat i sensibilitat. L'esmentat test utilitza la reactivitat de l'àcid tiobarbitúric (TBA) per tal de donar un índex diagnòstic de la presència i extensió de la peroxidació lipídica. El mètode mesura la reactivitat del TBA amb el malondialdehid (MDA), la qual cosa dona un adducte 1:2 MDA:TBA vermell fluorescent. El MDA s'obté, d'una part, de l'oxigenació enzimàtica de l'àcid araquidònic (*Figura 12*) i, de l'altra, com a producte final de la degradació oxidativa d'alguns àcids grassos per una via no enzimàtica. En concret, el MDA s'origina a partir dels àcids grassos poliinsaturats que posseeixen tres o més dobles enllaços; això significa que no es formarà a partir de l'àcid linoleic, que solament té dos dobles enllaços, però sí dels seus derivats com l'àcid araquidònic (Janero DR, 1990).

Cal tenir en compte l'advertiment que el test pot donar resultats erronis (Halliwell B, 1984) per manca d'especificitat ja que, d'una part, el MDA pot ser generat, encara que de forma minoritària, a partir de proteïnes, àcids nucleics, hidrats de carboni o pigments biliars i, per altra, perquè donen reacció positiva substàncies com ara els disacàrids, altres aldehyds, àcid siàlic, i circumstàncies tant freqüents i simples com ara la sang hemolitzada (Janero DR, 1990; Kojima T *et al*, 1990).

Taula 8a.- Tècniques més rellevants utilitzades per a mesurar la peroxidació lipídica

Mètode	Què es mesura ?	Detalls importants a destacar
Anàlisis dels àcids grassos per cromatografia gasosa o HPLC	Pèrdua dels àcids grassos insaturats	Molt útil per tal d'avaluar la peroxidació lipídica estimulada per diferents complexos metàl·lics que donen diferents distribucions de productes.
Glutatió peroxidasa	Peròxids lipídics	La glutatió peroxidasa reacciona amb l'H ₂ O ₂ i l'hidroperòxid lipídic, oxidant el glutatió (GSH) per a donar la seva forma oxidada (GSSG). L'addició de glutatió reductasa i NADPH per a tornar la GSSG a GSH dona lloc a un consum de NADPH que pot ser relacionat amb el contingut de peròxid. La sensibilitat és de 3 nmol/ml de peròxid. No es poden mesurar els peròxids dins de les membranes; per tal de fer-ho s'han d'escindir mitjançant les fosfolipases.
Hydrocarburs gasosos	Pentà i età	La cromatografia gasosa mesura els gasos que es formen al llarg de la descomposició dels peròxids lipídics. Aquesta és una via menor de la peroxidació lipídica però el mètode pot ser utilitzat com una mesura <i>in vivo</i> no invasiva de la peroxidació. Requereix control rigorós dels hidrocarburs gasosos produïts per bacteris i pol·lucionants de l'aire. La producció del gas també es troba afectada per la concentració <i>in vivo</i> d'O ₂ i pel metabolisme del pentà a pentanol. La producció de l'hidrocarbur gasós depèn de la presència d'ions metàl·lics per a descompondre els peròxids lipídics, per la qual cosa és imprescindible que els metalls es trobin en quantitats suficients.
Emissió de llum	Carbonils en estat excitat, oxigen singlet	L'auto-reacció dels radicals peroxi pot produir carbonils en estat excitat i oxigen singlet, que emeten llum quan retornen a l'estat fonamental. Aquesta és una tècnica interessant en sistemes lipídics aïllats. La quimiluminiscència de baix nivell és un mètode potencialment útil per a la mesura de la generació d'espècies reactives de l'oxigen en òrgans complets, encara que la llum pot originar-se des de diverses fonts.

(*Extrata de Gutteridge JMC et al. TIBS 1990; 15: 129-135*).

Taula 8b.- Tècniques més rellevants utilitzades per a mesurar la peroxidació lipídica:

Mètode	Què es mesura ?	Detalls importants a destacar
Fluorescència	Aldehids	Aldehids tals com el malondialdehid poden reaccionar amb els grups amino lliures (aminoàcids, proteïnes, àcids nucleics, ...) a pH àcid per a formar bases de Schiff conjugades fluorescents. A pH neutre es poden formar dihidropiridines fluorescents. Els aldehids poden també polimeritzar per a produir productes fluorescents en absència de grups amino. La formació de productes fluorescents s'origina a partir d'una via menor i té una química molt complexa, però és un mètode molt sensible. De totes maneres, no hauria de ser utilitzat sense la caracterització detallada que confirmi que els productes fluorescents són productes finals de la peroxidació lipídica.
Test TBARS	Substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric	La mostra s'escalfa a un pH baix amb l'àcid tiobarbitúric i el cromòfor resultant es mesura per absorbància a uns 532 nm o per fluorescència a 553 nm. El cromòfor pot ser extret amb n-butanol.
HPLC/tècniques d'anticossos	Aldehids citotòxics	Els hidroxiàlquenals (ex., 4-hidroxiionenal pels àcids grassos de la sèrie n-6 o el 4-hidroxihexenal per a la sèrie n-3) són productes de la peroxidació lipídica que ja són citotòxics a una concentració de nanomols. Poden ser mesurats mitjançant HPLC. S'han desenvolupat diverses tècniques que utilitzen anticossos per a detectar proteïnes modificades pels productes de la peroxidació lipídica, és a dir, proteïnes modificades per la reacció amb aldehids insaturats.
Conjugació de diens	Estructures amb diens conjugats	L'oxidació dels àcids grassos insaturats va acompanyada per un augment en la absorbància ultraviolada a 230-235 nm. Útil per a lípids complets. Requereix una sèrie de precaucions i de controls per a utilitzar-lo en mostres biològiques. S'augmenta l'especificitat i la sensibilitat treballant amb la segona derivada de l'espectre.

(*Exreta de Gutteridge JMC et al. TIBS 1990; 15: 129-135*).

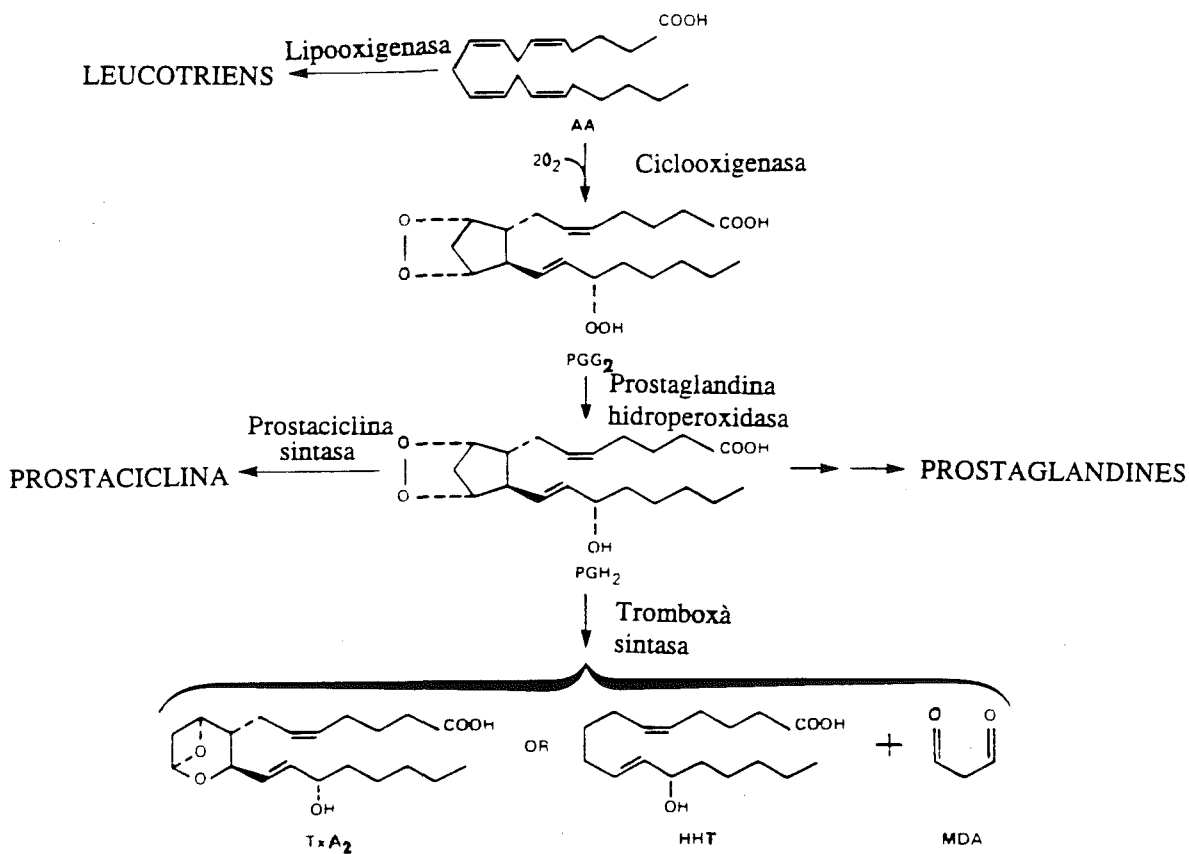


Figura 12.- Formació metabòlica del MDA a partir de l'àcid araquidònic (AA) en la biosíntesi dels eicosanoides. El MDA s'origina com un producte lateral de la conversió enzimàtica de la prostaglandina H₂ (PGH₂) en dos tipus de lípids, el tromboxà A₂ (TxA₂) i l'àcid 12(L-)-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienoic (HHT). (Extreta de Janero DR. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540).

Un altre aspecte important d'aquesta tècnica és que existeixen una sèrie de factors que influeixen en la resposta de les TBARS:

- Metalls de transició presents en la mostra
- temps i temperatura de la reacció
- pH i àcid utilitzat per a la reacció (Janero DR, 1990).

De totes maneres, no solament el mètode TBARS és criticable, sinó que totes les altres tècniques de què es disposa en l'actualitat per a avaluar les conseqüències de les reaccions per radicals lliures, tenen també objeccions teòriques (Halliwell B *et al*, 1987). La raó és que cap d'elles compleix totalment els criteris de bona pràctica analítica, és a dir, sensibilitat, selectivitat, validesa, reproductibilitat, independència de la matriu de la mostra i practicabilitat (Esterbauer H *et al*, 1989b).

1.5.7.- Característiques físico-químiques de les lipoproteïnes oxidades

En aquest apartat detallarem les característiques de les lipoproteïnes oxidades per tal de facilitar la comprensió del seu comportament metabòlic que difereix del que hem descrit per a les lipoproteïnes normals. Això ens permetrà atansar-nos als conceptes actuals de la relació entre les lipoproteïnes oxidades i l'arteriosclerosi.

Cal tenir en compte que es disposa de molta més informació de les LDL oxidades que de les HDL, encara que recentment les HDL han estat unes partícules atractives com a objecte d'estudi. Seguidament senyalarem alguns dels coneixements actuals sobre cadascuna d'aquestes lipoproteïnes oxidades.

1.5.7.1.- LDL oxidades

Les LDL són sensibles a la peroxidació lipídica a causa, possiblement, del seu alt contingut en àcids grassos poliinsaturats, que representa al voltant de 35 a 45% del total d'àcids grassos (Esterbauer H *et al*, 1987).

Aquesta oxidació es pot realitzar *in vitro*, intentant reproduir els fenòmens que es produeixen *in vivo*. Entre les cèl.lules emprades per a la modificació de les LDL hi

ha les cèl.lules implicades en la placa d'ateroma com les cèl.lules endotelials, cèl.lules musculars llises, monòcits, macròfags, ... (Parthasarathy S *et al*, 1986b). Aquesta modificació és, a més a més, presumiblement anàloga a la modificació peroxidativa que es realitza, per exemple, amb el Cu^{2+} en absència de cèl.lules (Steinberg D *et al*, 1989).

La *Taula 9* resumeix les propietats físiques i químiques de les LDL oxidades. D'altra part, els canvis que es produeixen en les LDL com a conseqüència de la seva modificació oxidativa s'esquematitzen en la *Figura 13*.

Taula 9.- Propietats químiques i físiques de les LDL oxidades, comparades amb les natives

-
-
- . Pèrdua completa d'antioxidants.
 - . Pèrdua més o menys completa dels àcids grassos poliinsaturats.
 - . Pèrdua de la fosfatidilcolina i del colesterol esterificat.
 - . Augment del contingut de lisofosfatidilcolina i dels oxisterols.
 - . Augment del contingut dels hidroxi- i dels hidroperoxi- dels àcids grassos poliinsaturats.
 - . Augment del contingut de diens conjugats.
 - . Augment del contingut de malondialdehid, hexanal, 4-hidroxinonenal i altres aldehids.
 - . Forta fluorescència a 430 nm amb excitació a 360 nm.
 - . Pèrdua parcial dels grups amino lliures en l'apolipoproteïna B.
 - . Fragmentació de l'apolipoproteïna B en pèptids més petits.
 - . Reconeixement per anticossos específics dels epítops de malondialdehid i 4-hidroxinonenal sobre l'apolipoproteïna B.
 - . Augment de la mobilitat electroforètica i augment de la densitat (1.060-1.080).
 - . Augment de la tendència a l'agregació.
 - . Augment de la variabilitat de la seva grandària.
 - . Reordenació conformacional de l'estructura de l'apolipoproteïna B i de la monocapa de fosfolípids.
-
-

(Extreta d'Esterbauer H et al. Free Radic Biol Med 1992; 13: 341-390).

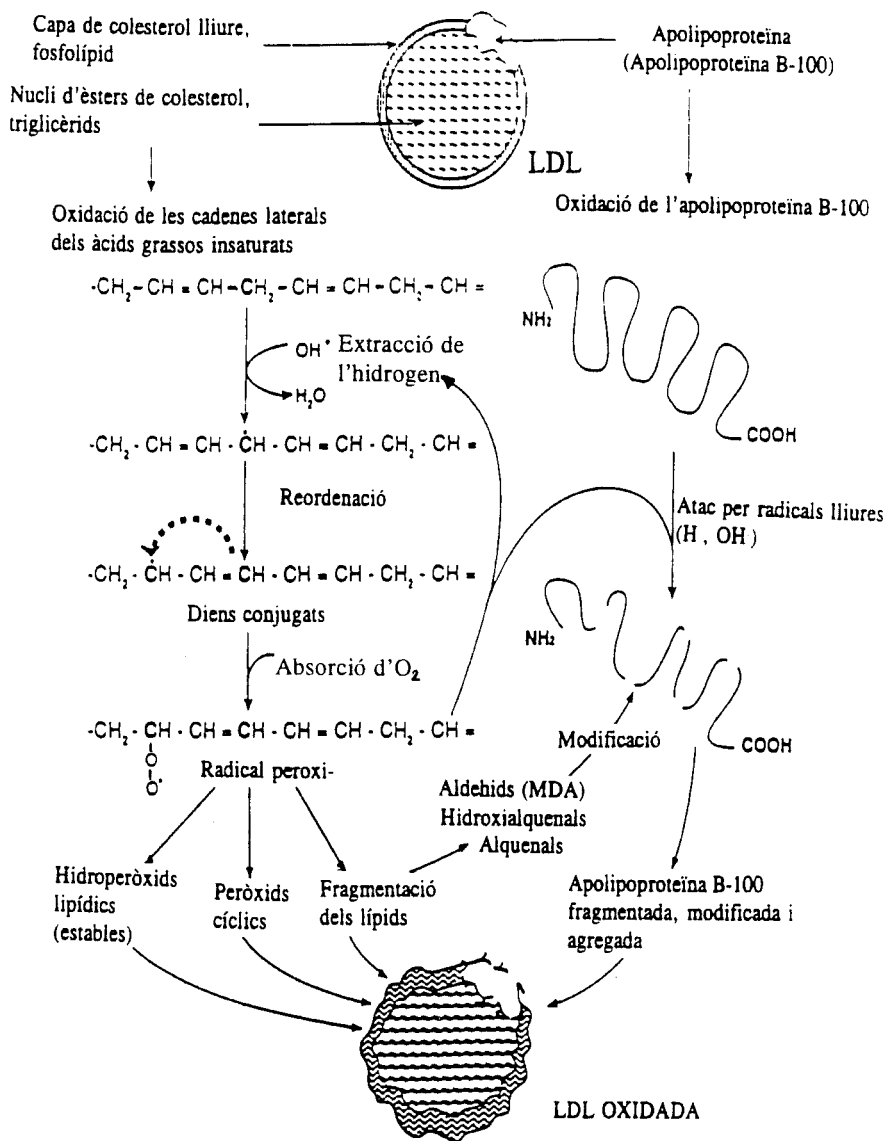


Figura 13.- L'oxidació de les LDL afecta tant els components dels lípids com de les apolipoproteïnes. La cadena de la peroxidació lipídica es representa a la part esquerra. La reordenació dels dobles enllaços dona lloc a una configuració de diens conjugats; la captació posterior d'oxigen portarà a la formació dels radicals peroxi reactius. Aquests radicals peroxi poden portar a la fragmentació dels lípids i són capaços, per sí mateixos, de prendre hidrogen dels lípids insaturats; s'inicia així una reacció en cadena de radicals lliures. A la dreta de la figura es representa l'oxidació de l'apolipoproteïna B. El dany ocasionat pels radicals lliures pot fragmentar la molècula; l'aparició posterior de formes de pes molecular més alt pot implicar l'agregació de partícules de LDL senceres. Així, l'oxidació de la meitat lipídica de la partícula la converteix en citotòxica, mentre que l'oxidació de l'apolipoproteïna (i la modificació de l'apolipoproteïna pels productes de l'oxidació lipídica) altera el seu reconeixement per part dels receptors cel·lulars. (Extreta de Lyons TJ. Diab Med 1991; 8: 411-419).

1.5.7.2.- HDL oxidades

S'ha trobat que les HDL poden ser oxidades i que els productes de l'oxidació són semblants als obtinguts per a les LDL sota les mateixes condicions oxidatives. Els canvis que es produeixen en les HDL degut a aquesta modificació es relacionen en la *Taula 10*.

Les *Taules 11, 12 i 13* següents detallen la composició en àcids grassos de les HDL oxidades a partir de resultats obtinguts en el nostre laboratori.

Taula 10.- Canvis que es produeixen en les HDL degut a la seva oxidació

-
-
- L'oxidació de 12 h i 24 h en una solució de Cu^{2+} provoca una pèrdua de l'apolipoproteïna A-I d'un 16 i d'un 45%, respectivament en relació a les natives (La Ville AE *et al*, 1994).
 - L'augment de l'agressivitat de l'oxidació implica la desaparició de les apolipoproteïnes presents en les HDL encara que quantitativament menys importants, com l'apolipoproteïnes A-II, A-IV i E (La Ville AE *et al*, 1994).
 - La modificació oxidativa provoca un increment de la càrrega negativa (Nagano Y *et al*, 1991; La Ville AE *et al*, 1994).
 - L'oxidació de les HDL comporta una reducció del contingut en fosfolípids, en colesterol esterificat i un augment del quocient colesterol lliure/fosfolípids (La Ville AE *et al*, 1994; Morel DW, 1994).
 - La modificació oxidativa provoca una disminució en el contingut en àcids grassos poliinsaturats, un increment de la proporció d'àcids grassos saturats de cadena curta i el manteniment del percentatge d'àcids grassos monoinsaturats presents en els triglicèrids, colesterol esterificat i fosfolípids (La Ville AE *et al*, 1994).
 - L'oxidació suposa un augment de la densitat de les HDL a causa d'una relació alterada entre les quantitats totals de lípid i de proteïna (Bradamante S *et al*, 1992).
 - La modificació oxidativa comporta un augment del contingut de la lisofosfatidilcolina, producte tòxic per a la cèl.lula (Bradamante S *et al*, 1992).
 - L'oxidació de les HDL implica la disminució de la fluïdesa i l'augment de l'ordre de les cadenes dels àcids grassos dels fosfolípids. Aquesta disminució de la fluïdesa de l'estructura de les HDL és, en part, deguda als enllaços entre els subproductes de l'oxidació lipídica i les proteïnes i els lípids existents (Eichenberger K *et al*, 1982),
 - L'oxidació de les HDL indueix fenòmens d'agregació entre elles (Bradamante S *et al*, 1992).
 - L'oxidació provoca canvis de la conformació en l'espai de les apolipoproteïnes (Shoukry MI *et al*, 1994).
 - L'oxidació indueix un augment de la grandària de les HDL (Shoukry MI *et al*, 1994).
 - L'oxidació modula l'estabilitat de l'associació entre els lípids i les apolipoproteïnes (Shoukry MI *et al*, 1994).
-
-

(Extreta d'Eichenberger K *et al*. *FEBS Lett* 1982; 142: 59-62; Nagano Y *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6457-6461; Bradamante S *et al*. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 193-203; La Ville AE *et al*. *Atherosclerosis* 1994; 105: 179-189; Morel DW. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 408-416; Shoukry MI *et al*. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1210: 355-360).

Taula 11.- Comparació entre la composició en àcids grassos de les HDL natives i oxidades 12 i 24 h en la fracció del colesterol esterificat

Àcids grassos	HDL natives	HDL oxidades 12 h	HDL oxidades 24 h	Canvi en relació a les natives	
				HDL oxidades 12 h / HDL natives	HDL oxidades 24 h / HDL natives
C14:0	0.96 ± 0.10	1.39 ± 0.16	1.91 ± 0.47	+ 44.8 % / + 99.0 %	
C16:0	10.62 ± 0.40	12.49 ± 0.67	16.68 ± 1.66	+ 17.6 % / + 57.1 %	
C16:1	1.97 ± 0.62	2.52 ± 0.64	2.03 ± 0.62	+ 27.9 % / + 3.0 %	
C18:0	1.99 ± 0.48	3.58 ± 0.98	9.12 ± 2.54	+ 79.9 % / + 358.3 %	
C18:1,n-9	20.15 ± 1.98	21.59 ± 1.96	21.15 ± 2.61	+ 7.1 % / + 5.0 %	
C18:2,n-6	56.24 ± 4.13	50.78 ± 1.57	43.41 ± 2.32	- 9.7 % / - 22.8 %	
C18:3,n-6	0.81 ± 0.21	1.08 ± 0.15	0.79 ± 0.29	+ 33.3 % / - 2.5 %	
C18:3,n-3	0.32 ± 0.04	0.30 ± 0.08	0.07 ± 0.03	- 6.2 % / - 78.1 %	
C20:0	---	---	---	---	
C20:1,n-9	---	---	---	---	
C20:2,n-6	---	---	---	---	
C20:3,n-6	0.50 ± 0.13	0.40 ± 0.10	0.19 ± 0.08	- 20.0 % / - 62.0 %	
C20:4,n-6	5.53 ± 1.35	4.49 ± 1.38	3.26 ± 0.82	- 18.8 % / - 41.0 %	
C20:5,n-3	0.39 ± 0.10	0.36 ± 0.10	0.25 ± 0.10	- 7.7 % / - 35.9 %	
C22:0	---	---	---	---	
C22:5,n-3	---	---	---	---	
C22:6,n-3	0.63 ± 0.27	0.83 ± 0.25	1.04 ± 0.43	+ 31.7 % / + 65.1 %	
C24:0	---	---	---	---	
C24:1,n-9	---	---	---	---	
Σ AGS	13.55 ± 0.67	17.73 ± 1.63	27.81 ± 4.60	+ 30.8 % / + 105.2 %	
Σ AGPI	64.42 ± 2.86	58.24 ± 2.61	49.01 ± 2.33*	- 9.6 % / - 23.9 %	
Σ AGMI	22.12 ± 2.58	24.11 ± 2.60	23.18 ± 3.24	+ 9.0 % / + 4.8 %	

AGS: àcids grassos saturats; AGPI: àcids grassos poliinsaturats; AGMI: àcids grassos monoinsaturats. (Extreta de resultats del nostre laboratori). Els resultats s'expressen com mitjana ± ES. *: $p < 0.05$ en referència a les HDL natives.

Taula 12.- Comparació entre la composició en àcids grassos de les HDL natives i oxidades 12 i 24 h en la fracció dels fosfolípids

Àcids grassos	HDL natives	HDL oxidades 12 h	HDL oxidades 24 h	Canvi en relació a les natives	
				HDL oxidades 12 h / HDL oxidades 24 h	HDL oxidades 12 h / HDL oxidades 24 h
C14:0	0.57 ± 0.22	0.52 ± 0.08	0.94 ± 0.27*	- 8.8 % / + 64.9 %	
C16:0	25.57 ± 1.07	27.58 ± 0.92*	25.46 ± 4.81	+ 7.9 % / - 0.4 %	
C16:1	0.59 ± 0.21	0.39 ± 0.11	4.18 ± 3.81	- 33.9 % / + 608.5 %	
C18:0	12.16 ± 0.73	12.80 ± 1.01	13.56 ± 2.81	+ 5.3 % / + 11.5 %	
C18:1,n-9	12.76 ± 1.56	12.69 ± 1.55	14.18 ± 2.21	- 0.5 % / + 11.1 %	
C18:2,n-6	23.55 ± 1.83	22.98 ± 1.89	21.62 ± 2.35	- 2.4 % / - 8.2 %	
C18:3,n-6	0.14 ± 0.04	0.20 ± 0.05	0.36 ± 0.26	+ 42.9 % / + 157.1 %	
C18:3,n-3	0.14 ± 0.02	0.40 ± 0.25	3.20 ± 3.14	+ 185.7 % / + 2185.7 %	
C20:0	0.48 ± 0.11	0.78 ± 0.25	0.40 ± 0.24	+ 62.5 % / - 16.7 %	
C20:1,n-9	0.23 ± 0.01	0.35 ± 0.17	2.25 ± 2.17	+ 52.5 % / + 878.3 %	
C20:2,n-6	0.49 ± 0.08	0.71 ± 0.17	0.15 ± 0.09	+ 44.9 % / - 69.4 %	
C20:3,n-6	2.74 ± 0.27	2.57 ± 0.23	1.78 ± 0.56	- 6.2 % / - 35.0 %	
C20:4,n-6	11.48 ± 0.58	10.41 ± 0.34	7.07 ± 2.05*	- 9.3 % / - 38.4 %	
C20:5,n-3	0.55 ± 0.05	0.48 ± 0.05	0.31 ± 0.11	- 12.7 % / - 43.6 %	
C22:0	1.20 ± 0.17	1.41 ± 0.25	1.07 ± 0.42	+ 17.5 % / - 10.8 %	
C22:5,n-3	0.65 ± 0.06	0.40 ± 0.17	0.24 ± 0.15	- 38.5 % / - 63.1 %	
C22:6,n-3	3.80 ± 0.22	2.30 ± 0.56*	1.51 ± 0.70*	- 39.5 % / - 60.3 %	
C24:0	1.06 ± 0.14	1.15 ± 0.14	0.59 ± 0.26	+ 8.5 % / - 44.3 %	
C24:1,n-9	1.80 ± 0.21	1.88 ± 0.25	1.13 ± 0.57	+ 4.4 % / - 37.2 %	
Σ AGS	41.04 ± 2.18	44.24 ± 1.09*	42.02 ± 7.56	+ 7.8 % / + 2.4 %	
Σ AGPI	43.54 ± 2.51	40.45 ± 1.74	36.24 ± 3.67	- 7.1 % / - 16.8 %	
Σ AGMI	15.42 ± 4.05	15.31 ± 1.65	21.74 ± 7.74	- 0.7 % / + 41.0 %	

AGS: àcids grassos saturats; AGPI: àcids grassos poliinsaturats; AGMI: àcids grassos monoinsaturats. (Extreta de resultats del nostre laboratori). Els resultats s'expressen com mitjana ± ES. * : $p < 0.05$ en referència a les HDL natives.

Taula 13.- Comparació entre la composició en àcids grassos de les HDL natives i oxidades 12 i 24 h en la fracció dels triglicèrids

Àcids grassos	HDL natives	HDL oxidades 12 h	HDL oxidades 24 h	Canvi en relació a les natives	
				HDL oxidades 12 h / HDL natives	HDL oxidades 24 h / HDL natives
C14:0	2.09 ± 0.15	2.97 ± 0.30	3.28 ± 0.27*	+ 42.1 % / + 56.9 %	
C16:0	26.46 ± 0.57	27.02 ± 0.22	31.70 ± 2.65*	+ 2.1 % / + 19.8 %	
C16:1	2.02 ± 0.52	2.12 ± 0.44	1.69 ± 0.57	+ 5.0 % / - 16.3 %	
C18:0	10.04 ± 1.46	12.27 ± 1.72*	19.36 ± 7.94*	+ 22.2 % / + 92.8 %	
C18:1,n-9	37.68 ± 2.50	34.24 ± 2.72	29.86 ± 7.61	- 9.1 % / - 20.8 %	
C18:2,n-6	19.02 ± 1.55	19.62 ± 1.44	14.11 ± 3.67	+ 3.1 % / - 25.8 %	
C18:3,n-6	0.44 ± 0.13	0.23 ± 0.10	---	- 47.7 % / - 100.0 %	
C18:3,n-3	0.27 ± 0.12	0.15 ± 0.06	---	- 44.4 % / - 100.0 %	
C20:0	---	---	---	---	
C20:1,n-9	0.33 ± 0.14	---	---	- 100.0 %	
C20:2,n-6	---	---	---	---	
C20:3,n-6	---	---	---	---	
C20:4,n-6	1.13 ± 0.16	0.67 ± 0.42	---	- 40.7 % / - 100.0 %	
C20:5,n-3	---	---	---	---	
C22:0	---	---	---	---	
C22:5,n-3	---	---	---	---	
C22:6,n-3	0.52 ± 0.14	0.71 ± 0.41	---	+ 36.5 % / - 100.0 %	
C24:0	---	---	---	---	
C24:1,n-9	---	---	---	---	
Σ AGS	38.59 ± 1.52	42.26 ± 1.66*	54.34 ± 10.83*	+ 9.5 % / + 40.8 %	
Σ AGPI	21.38 ± 1.67	21.38 ± 1.47	14.11 ± 3.67	--- / - 34.0 %	
Σ AGMI	40.03 ± 2.91	36.36 ± 3.00	31.55 ± 8.10	- 9.2 % / - 21.2 %	

AGS: àcids grassos saturats; AGPI: àcids grassos poliinsaturats; AGMI: àcids grassos monoinsaturats. (Extrreta de resultats del nostre laboratori). Els resultats s'expressen com mitjana ± ES. * : p < 0.05 en referència a les HDL natives.

1.5.8.- Susceptibilitat a l'oxidació

Podríem definir la susceptibilitat o predisposició a l'oxidació com la tendència que tenen les lipoproteïnes a esdevenir oxidades *in vitro* en unes condicions fixades. Aquesta susceptibilitat va lligada a diversos factors estructurals i químics de les lipoproteïnes, com ara la grandària en relació a la densitat de la partícula, el colesterol lliure de les partícules, la composició en àcids grassos, el contingut en àcid siàlic o les diferències individuals en la capacitat per a protegir-se contra els radicals lliures de l'oxigen (Esterbauer H *et al*, 1993).

En concret, diversos estudis mostren clarament que els antioxidants (vitamina E (Esterbauer H *et al*, 1990; Jessup W *et al*, 1990) o els flavonoides (Whalley CV *et al*, 1990)) poden tenir un paper considerable perquè disminueixen la susceptibilitat i, per tant, augmenten la resistència de les LDL a l'oxidació (Steinbrecher UP *et al*, 1990). Així és lògic, doncs, el fet que el contingut d'un sol d'ells, como ara l' α -tocoferol, no correlacioni de manera completa amb la susceptibilitat a l'oxidació de la lipoproteïna (Babiy AV *et al*, 1990).

Així mateix, s'ha vist que un increment d'àcids grassos més resistents a l'agressió oxidativa, com ara els monoinsaturats i, en concret, l'àcid oleic (Parthasarathy S *et al*, 1990b), comporten una disminució de la predisposició a l'oxidació.

1.5.8.1.- Determinació de la susceptibilitat a l'oxidació

En la susceptibilitat a l'oxidació podem valorar les diverses fases i paràmetres del procés de peroxidació lipídica. Les variacions en el temps de durada d'aquestes fases i en la quantitat dels productes generats en el procés de peroxidació es consideren un reflex de la susceptibilitat a l'oxidació de la mostra.

Han estat descrits, bàsicament, dos mètodes per a avaluar la susceptibilitat a l'oxidació de les lipoproteïnes:

- 1.- Mesura dels diens conjugats que es produeixen quan s'addiciona una solució de Cu^{2+} a la mostra durant una sèrie d'hores (Parthasarathy S, 1991; Esterbauer H *et al*, 1993);
- 2.- Mesura de les TBARS quan es sotmet la mostra a diverses situacions prooxidants, al llarg d'un període fixat, com ara una solució de Cu^{2+} o una incubació amb cèl.lules endotelials o cèl.lules musculars llises soles o amb un metall com el coure o el ferro. De totes maneres, en aquesta mesura s'hauria de parlar més aviat d'oxidació a la qual ha arribat una mostra en unes condicions fixades de temps i de concentració d'oxidant (Esterbauer H *et al*, 1993).

A continuació explicarem amb detall els dos mètodes:

- 1.- Mesura dels diens conjugats produïts *in vitro*: El primer paràmetre que s'avalua és l'anomenada fase de retard, coneguda com *lag phase*, que correspon bàsicament a la iniciació de la peroxidació lipídica. La durada d'aquesta fase de retard depèn de la presència i efectivitat dels antioxidants endògens i exògens. Després d'aquesta fase inicial i quan els antioxidants ja s'han destruït completament, la partícula queda sotmesa a les reaccions en cadena autocatalítiques de la peroxidació lipídica, és a dir, a la fase de propagació. En aquest punt, la peroxidació lipídica s'accelera ràpidament d'una forma exponencial fins a un valor màxim que s'anomena velocitat màxima d'oxidació (*maximal rate of oxidation*). Es defineix també la quantitat màxima de diens formats (*maximal amount of diens formed*) i el temps que es necessita per arribar a la producció màxima de diens (Esterbauer H *et al*, 1987; Jessup W *et al*, 1990; Cominacini L *et al*, 1991; Esterbauer H *et al*, 1992; Kleinveld HA *et al*, 1992; Esterbauer H *et al*, 1993).

En resum, l'allargament de la fase de retard s'assimila a un augment de la resistència a l'oxidació. El conjunt de tots els paràmetres esmentats ens permeten avaluar la susceptibilitat a l'oxidació d'una determinada mostra.

- 2.- Mesura de les TBARS produïdes *in vitro*: Després de l'aplicació d'un oxidant *in vitro*, es pot realitzar una mesura global de la capacitat de la lipoproteïna per a resistir a l'oxidació *in vitro* en unes condicions fixades de concentració d'oxidant, temps i temperatura.

Sota aquestes condicions s'ha estudiat, sobretot, la resistència a l'oxidació de les LDL. Més recentment, però, s'han avaluat els canvis que sofreixen les HDL sota les mateixes condicions a què es sotmetien les LDL (Nagano Y *et al*, 1991; La Ville AE *et al*, 1994; Morel DW, 1994).

1.5.8.2.- Interès de la susceptibilitat a l'oxidació

Un dels atractius de les variacions de la susceptibilitat a l'oxidació és que les lipoproteïnes que són més resistents són, també, lògicament, menys oxidables. Si tenim en compte el paper fonamental que juguen les lipoproteïnes oxidades en la formació i progressió de la placa d'ateroma, això ens condueix a la hipòtesi que un augment en la resistència de les LDL i de les HDL a l'oxidació pot significar que menys partícules puguin ser modificades localment en la paret arterial al llarg del seu temps de residència en aquest punt, factor clau en el desenvolupament de les plaques d'ateroma (Esterbauer H *et al*, 1992). A més, molt recentment, s'ha trobat que les cèl.lules de la paret arterial, incloent els macròfags, són capaces d'oxidar les lipoproteïnes encara que precisen de la unió de les LDL amb el seu receptor (Aviram M *et al*, 1994).

De totes maneres, encara no s'han realitzat estudis clínics per tal d'avaluar les diferències en la susceptibilitat de les LDL o de les HDL a l'oxidació com un factor de risc per a l'arteriosclerosi.

1.6.- Relació entre oxidació lipoproteica i patogènia de l'arteriosclerosi

Seguidament detallarem una sèrie de fets que fan referència a les lipoproteïnes oxidades i que donen les bases de la teoria de l'aterogènesi.

Diversos estudis indiquen que la modificació de les lipoproteïnes, en particular l'oxidació, incrementa el seu poder aterogènic. D'una part, les LDL oxidades indueixen la formació de la cèl.lula escumosa i la progressió de les lesions arterioscleròtiques. Les plaques ateromatoses contenen partícules lipoproteïques que tenen les propietats bioquímiques de les LDL oxidades. De la mateixa manera, s'han detectat quantitats més importants de LDL oxidada en el plasma de pacients hipercolesterolèmics en relació als nivells que existeixen en pacients normolipidèmics (Masana *et al*, 1991b).

D'altra part, les HDL eliminen el colesterol de les cèl.lules perifèriques incloent les cèl.lules escumoses (Brown MS *et al*, 1979). Recentment, s'ha observat en les HDL oxidades una reducció de la capacitat per a eliminar el colesterol de les cèl.lules, la qual cosa podria contribuir al desenvolupament de l'arteriosclerosi. Així, les HDL oxidades tindrien un comportament similar a les LDL oxidades i facilitarien la formació de la cèl.lula escumosa.

Tot seguit detallarem els trets principals en referència al comportament de cadascuna d'aquestes lipoproteïnes.

1.6.1.- LDL oxidades

Cal subratllar que, com a conseqüència de la modificació oxidativa, les LDL són reconegudes més difícilment pel receptor de les apolipoproteïnes B-100 i E. Per un altre costat, aquestes LDL oxidades són internalitzades bàsicament per un receptor específic denominat receptor *scavenger*, que anomenarem a partir d'ara receptor depurador, és a dir, aquell que depura del plasma les lipoproteïnes modificades. Aquesta via d'eliminació addicional va ser proposada inicialment per Goldstein

(Goldstein JL *et al*, 1979). Uns anys després, va ser clonat i seqüenciat el receptor depurador present en els macròfags (Kodama T *et al*, 1990; Rohrer L *et al*, 1990). Aquest receptor precisa que el seu lligand tingui un acúmulo de càrregues negatives múltiples sobre regions específiques de les molècules (Haberland ME *et al*, 1985) i una sèrie de canvis conformacionals en la proteïna. Aquestes últimes característiques, presents en les lipoproteïnes oxidades, fan possible el seu reconeixement pel receptor depurador. En l'actualitat, però, sembla que més d'un receptor es troba implicat en la captació específica de les LDL modificades per oxidació (Arai H *et al*, 1989; Sparrow CP *et al*, 1989). Potser el paper d'aquests receptors és reconèixer i assistir en la degradació de proteïnes aberrants o danyades, reconeixent diferents epítops presents en la població de partícules de LDL oxidades (Sparrow CP *et al*, 1989).

Un altre aspecte interessant ha estat l'estudi dels fenòmens desencadenats a partir de la relació entre les lipoproteïnes oxidades i les cèl.lules implicades en la formació de la placa d'ateroma. Inicialment es van realitzar treballs amb lipoproteïnes que tenien oxidacions molt dràstiques encara que, actualment, s'estan analitzant oxidacions molt més lleus a fi d'atansar-nos cada vegada més a la situació fisiològica en l'home. Així, s'han realitzat oxidacions mínimes (Berliner JA *et al*, 1990; Parhami F *et al*, 1993; Kim JA *et al*, 1994) o moderades de les LDL a través de les quals només s'oxiden els lípids, mentre que la proteïna es manté íntegra. Per tant, encara que les LDL presenten una peroxidació dels àcids grassos, són reconegudes pel receptor LDL de la cèl.lula. A més a més, aquestes LDL moderadament oxidades estimulen les cèl.lules endotelials, la qual cosa desencadena la síntesi de diversos factors que poden intervenir en el procés aterogènic, com ara: la proteïna-1 quimiotàctica dels monòcits que pot atraure els monòcits vers la paret arterial; una partícula que afavoreix la fixació dels monòcits a l'endoteli; i, els factors estimuladors de les colònies, tots ells factors que intervenen en la diferenciació dels monòcits en macròfags (Hunninghake DB, 1994) (*Figura 14*).

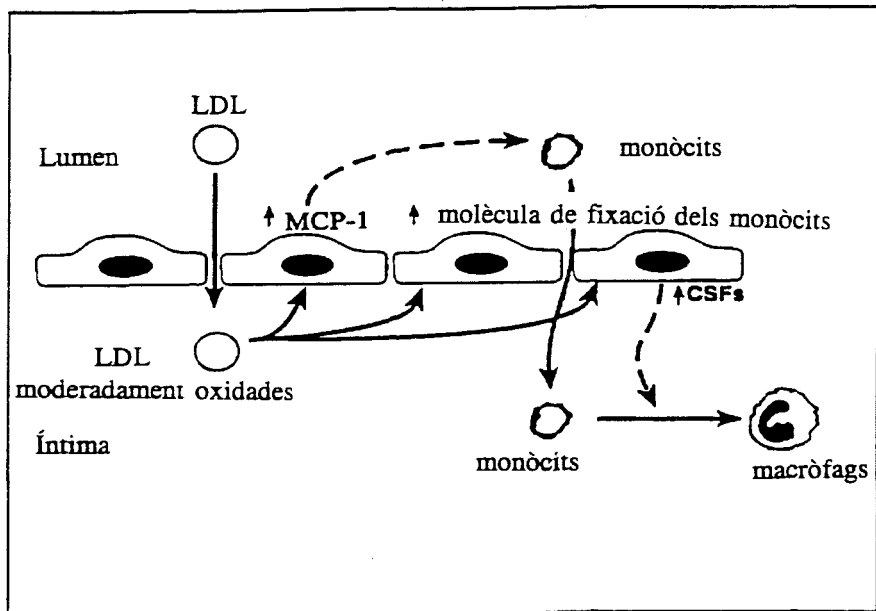


Figura 14.- La figura mostra que les LDL que tenen els àcids grassos peroxidats són encara reconegudes pels receptors cel.lulars. Aquestes LDL mitjanament oxidades estimulen les cèl.lules endotelials, la qual cosa comporta la síntesi de diversos factors aterogènics com ara: la MCP-1 (proteïna-1 quimiotàctica de monòcits) que pot atraure els monòcits cap a la paret arterial; una molècula que afavoreix la fixació dels monòcits a l'endoteli; els factors estimuladors de colònia que intervenen en la diferenciació dels monòcits en macròfags. (Extreta de Hunninghake DB. *Med Clin North Am* 1994; 78: 1-67).

Si s'augmenta el nivell de l'oxidació, s'obtenen unes LDL oxidades que no són reconegudes pel receptor cel.lular de les LDL. Aquestes LDL oxidades indueixen la trombosi per l'expressió d'un factor tissular i d'un factor inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI-1) sobre les cèl.lules endotelials, exerceixen una citotoxicitat directa sobre les cèl.lules endotelials i indueixen la formació de cèl.lules escumoses a partir dels macròfags i cèl.lules musculars llises. Les LDL oxidades estimulen la producció de factors pro-aterogènics sobre aquests dos tipus de cèl.lules (citocines i factors de creixement) (Hunninghake DB, 1994) (*Figura 15*).

La *Taula 14* relaciona alguns dels coneixements que s'han descrit i que donen les bases de la teoria de l'aterogènesi en relació a l'oxidació de les lipoproteïnes.

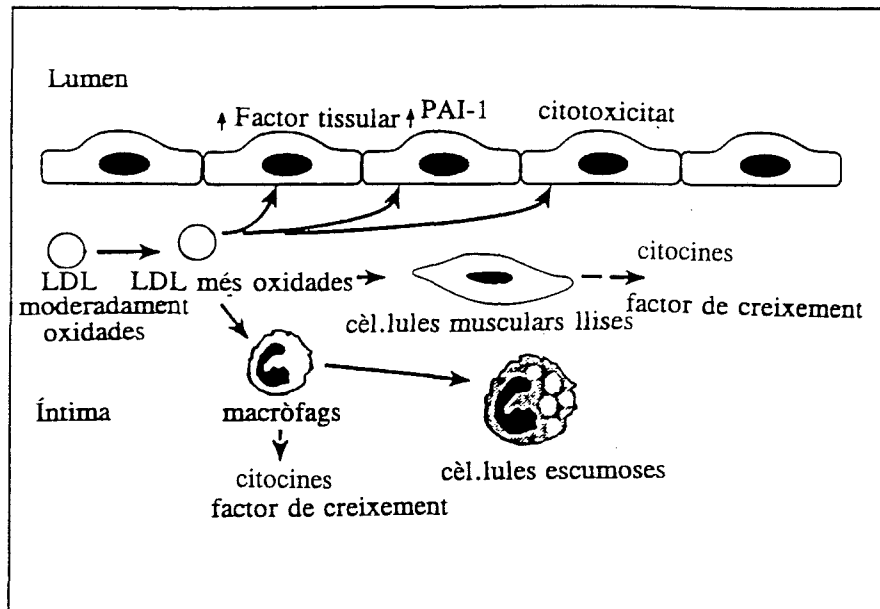


Figura 15.- Aquest esquema ens indica que les LDL més oxidades no són reconegudes pel seu receptor cel·lular i tenen efectes pro-aterogènics: a) aquestes LDL indueixen la trombosi mitjançant l'expressió d'un factor tissular i d'un factor inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI-1) sobre les cèl·lules endotelials; b) aquestes LDL tenen una citotoxicitat directa sobre les cèl·lules endotelials; c) les LDL indueixen la formació de cèl·lules escumoses a partir dels macròfags i de les cèl·lules musculars llises; d) les LDL oxidades estimulen també la producció de factors pro-aterogènics sobre aquests dos tipus de cèl·lules (citocines i factor de creixement). (Extreta de Hunninghake DB. *Med Clin North Am* 1994; 78: 1-67).

Taula 14.- Algunes de les observacions que donen les bases de la teoria de l'aterogènesi

- 1910 Windaus A va localitzar colesterol a les plaques ateroscleròtiques.
- 1952 Glavind J *et al* van trobar lípids oxidats en les plaques.
- 1954 Gofman JW *et al* van detectar alts nivells de LDL a l'aterosclerosi accelerada.
- 1961 Geer JC *et al* van observar que les cèl.lules carregades de lípids de les plaques ateroscleròtiques són principalment cèl.lules del múscul llis i macròfags.
- 1971 Cookson FB va observar que les plaques ateroscleròtiques contenen cèl.lules escumoses.
- 1973 Bailey JM va indicar que la LDL és el subministrador principal de colesterol a la cèl.lula.
- 1973 Harland WA *et al* van assenyalar que els lípids oxidats a les plaques ateroscleròtiques no són produïts per l'oxidació enzimàtica.
- 1975 Adams CWM *et al* van observar que algunes cèl.lules escumoses eren macròfags derivats de monòcits.
- 1977 Goldstein JL *et al* van localitzar apolipoproteïna B de les LDL a les plaques ateroscleròtiques.
- 1977 Goldstein JL *et al* van indicar que la captació de les LDL normals pels fibroblasts humans és regulada per un receptor.
- 1979 Goldstein JL *et al* van trobar que la captació de les LDL acetilades i malondialdehidzades pels macròfags i altres cèl.lules a través de la via del receptor *scavenger* dona una deposició massiva de colesterol.
- 1980 Fogelman AM *et al* van assenyalar els peròxids lipídics com a possible causa de la deposició de colesterol. Per tal de tenir lloc aquesta deposició, la LDL captada pels macròfags ha d'estar modificada prèviament amb malondialdehid.
- 1981 Henriksen T *et al* van observar que les cèl.lules endotelials modifiquen les LDL (LDL modificada) d'una forma reconeguda pel receptor de les LDL acetilades sobre els macròfags.
- 1983 Brown MS *et al* van detectar que la modificació de la lisina de l'apolipoproteïna B permet el lligam amb el receptor de la LDL acetilada.
- 1983 Morel DW *et al* van apuntar que els macròfags i els neutròfils oxiden les LDL per un mecanisme de radicals lliures.
- 1983 Morel DW *et al* van constatar que les LDL oxidades pels radicals lliures són tòxiques per als fibroblasts de pell humana.
- 1984 Nishigaki I *et al* van detectar que els hidroperòxids afecten la captació de les LDL per les cèl.lules del múscul llis.
- 1984 Heinecke JW *et al* van comprovar que les cèl.lules del múscul llis produeixen LDL modificada en presència de metalls.
- 1984 Morel DW *et al* van indicar que les cèl.lules del múscul llis i les cèl.lules endotelials produeixen LDL modificada a través de l'oxidació dels lípids mitjançant radicals lliures.
- 1984 Steinbrecher UP *et al* van plantejar que la modificació de les LDL per cèl.lules endotelials implica la peroxidació lipídica.
- 1985 Cathcart MK *et al* van constatar que els monòcits i neutròfils activats produeixen LDL oxidada.
- 1985 Parthasarathy S *et al* van comprovar que la fosfolipasa A₂ i els radicals lliures produïts a partir de les cèl.lules endotelials modifiquen la LDL.
- 1986 Heinecke JW *et al* van indicar que el radical lliure superòxid format a partir de les cèl.lules del múscul llis dona LDL modificada.

- 1986 Parthasarathy S *et al* van observar que les LDL oxidades pels macròfags són reconegudes pels seus receptors *scavenger*.
- 1986 Hinsbergh VWM van *et al* van detectar que la modificació de les LDL per part de les cèl.lules endotelials requereix cèl.lules viables; també van determinar que no hi estan pas implicats l'H₂O₂ o el radical superòxid.
- 1987 Gey KF *et al* van trobar una relació inversa entre els antioxidants del plasma i les malalties cardíco-vasculars.
- 1987 Esterbauer H *et al* van comprovar que l'oxidació de les LDL altera la composició de la partícula i es perden els antioxidants.
- 1987 Parthasarathy S va assenyalar que els radicals lliures provinents dels tiols produeixen LDL oxidada.
- 1988 Avogaro P *et al* van localitzar LDL modificada en el plasma humà.
- 1988 Sparrow CP *et al* van indicar que la lipooxigenasa amb fosfolipasa A₂ produeix LDL modificada.
- 1988 Steinbrecher UP va constatar que es produeix LDL oxidada pel radical superòxid a partir de cèl.lules endotelials i cèl.lules del múscul llis.
- 1989 Boyd HC *et al* van assenyalar que els anticossos monoclonals mostren LDL oxidada en les lesions d'aorta de conill.
- 1989 Arai H *et al*, Sparrow CP *et al* van mostrar que hi ha diferències en la captació de la LDL acetilada i de la LDL oxidada per part dels macròfags.
- 1989 Parthasarathy S *et al* van implicar la lipooxigenasa de les cèl.lules endotelials en la formació de LDL oxidades.
- 1989 Steinbrecher UP *et al* van comprovar que la peroxidació lipídica provoca derivatització de l'apolipoproteïna B.
- 1989 Harats D *et al* van indicar que el consum de tabac converteix les LDL en partícules susceptibles a l'oxidació.
- 1989 Cathcart MK *et al* van constatar que es produeixen LDL oxidades citotòxiques pel radical superòxid a partir de monòcits activats.
- 1989 Hoff HF *et al* van comprovar que les LDL modificades per l'hidroxinonenal són fagocitades pels macròfags.
- 1989 Esterbauer H *et al* van detectar que les LDL estan protegides pels antioxidants lipofílics.
- 1989 Bedwell S *et al* van assenyalar que les LDL oxidades produïdes pel radical hidroxil i perhidroxil, i no pel radical superòxid, no són reconegudes pel receptor depurador dels macròfags.
- 1989 Palinski W *et al* van mostrar que els anticossos monoclonals contra les LDL oxidades o LDL modificades per hidroxinonenal reconeixen material en les plaques ateroscleròtiques.
- 1989 Stringer MD *et al*, Domagala B *et al* van mostrar que els nivells de peròxids lipídics en el plasma són més elevats en les malalties cardíco-vasculars i en les malalties arterials perifèriques.
- 1990 Palinski W *et al*, Rosenfeld ME *et al* van tenyir lesions amb diversos anticossos enfront d'epítops característics de LDL oxidades.
- 1990 Jürgens G *et al* van indicar que l'anticòs enfront de la LDL modificada per hidroxinonenal reconeix VLDL, Lp(a) i LDL oxidades per coure.
- 1990 Kalyanaraman B *et al* van trobar radicals lipídics al llarg de l'oxidació amb coure de les LDL.
- 1990 Ylä-Herttuala S *et al* van localitzar a les plaques ateroscleròtiques la 15-lipooxigenasa i també la LDL oxidada.
- 1990 Berliner JA *et al* van trobar que les LDL oxidades de manera mínima estimulen la interacció endotelial dels leucòcits.
- 1990 Rohrer L *et al* i Kodama *et al* van clonar i seqüenciar el receptor *scavenger* dels macròfags.

- 1991 Berkel TJC van *et al* van mostrar que les cèl.lules Kupfer tenen un receptor per a les LDL oxidades.
- 1992 Salonen JT *et al* van indicar que els títols d'autoanticossos enfront de la LDL oxidada correlacionen amb la progressió de l'arteriosclerosi de caròtida.

(*Extreta d'Esterbauer H et al. Free Radic Biol Med 1992; 13: 341-390*).

Seguidament la *Taula 15* resumeix alguns dels trets més importants de la modificació oxidativa, en graus diversos, de les LDL:

Taula 15.- Algunes de les característiques biològiques més rellevants de la LDL oxidada

-
- . És captada i degradada en quantitat més gran pels macròfags.
 - . És citotòxica per a la major part de les cèl.lules.
 - . És quimiotàctica per als monòcits i per a les cèl.lules del múscul llis.
 - . Presenta una inhibició en fragments aïllats de múscul llis de la relaxació induïda per l'acetilcolina, l'òxid nítric i la nitroglicerina.
 - . Augmenta l'activitat del factor tissular d'un cultiu de cèl.lules endotelials i suprimeix l'activitat de la proteïna C (que augmenta la tromboresistència).
 - . Suprimeix la producció de l'ARNm del factor de creixement derivat de les plaquetes i la secreció d'aquest mateix factor pels macròfags-monòcits.
 - . Augmenta el contingut de glutatió en els macròfags fins a un valor quasi el doble, amb el mateix efecte que té el 4-hidroxinonenal.
 - . La seva administració sistemàtica en hámsters porta a una immediata adhesió de leucòcits a l'endoteli capil.lar.
 - . La seva modificació mínima comporta, a l'addicionar-la a un cultiu de cèl.lules endotelials, un estímul de la producció d'una sèrie de factors biològicament actius, tals com: els factors quimiotàctics de monòcits (MCP-1), els factors de creixement dels monòcits (M-CSF) i dels granulòcits (G-CSF), els factors tissulars essencials per a la coagulació i també les molècules de lligam dels monòcits (anomenades molècules d'adhesió dels leucòcits endotelials (ELAM))
 - . La seva modificació mínima comporta, quan s'injecta a un ratolí, un augment en els teixits i en el sèrum dels nivells de MCP-1 i del CSF.
 - . La modificació mínima de la LDL inhibeix la mitogènesi en SMC i estimula (a baixa concentració) o inhibeix la síntesi de PGI₂ en SMC.
-

(*Extreta d'ESTERBAUER H et al. Free Radic Biol Med 1992; 13: 341-390*).

1.6.2.- HDL oxidades

Encara que són menys conegudes les reaccions metabòliques desencadenades per la presència de HDL oxidades, detallarem les propietats biològiques d'aquestes a la *Taula 16*.

Taula 16.- Algunes de les característiques biològiques més rellevants de la HDL oxidada

-
-
- . Les HDL oxidades tenen una menor capacitat d'efusió de colesterol de les cèl.lules, la qual cosa s'associa a un increment de colesterol esterificat dins d'aquestes cèl.lules. Això ja s'observa amb HDL moderadament oxidades que només tenen modificats els lípids.
 - . Les HDL oxidades són reconegudes pel receptor depurador dels macròfags, la qual cosa s'associa a un increment del colesterol intracel.lular.
 - . Les HDL oxidades inhibeixen la síntesi de colesterol en fibroblasts.
 - . Les HDL oxidades promouen l'agregació de les plaquetes.
-
-

(Extreta de Ardlie NG et al. Atherosclerosis 1989; 76: 117-124; Nagano Y et al. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 6457-6461; La Ville AE et al. Atherosclerosis 1994; 105: 179-189 i Morel DW. Biochem Biophys Res Commun 1994; 200: 408-416).

1.7.- Dieta i aterogènesi

El paper dels àcids grassos de la dieta en el desenvolupament de l'arteriosclerosi ha estat suggerit des d'inicis de segle. És necessari, però, seguir realitzant estudis amb l'objectiu d'avançar en el coneixement de la nutrició i de la seva relació amb la patologia càrdio-vascular. L'objectiu final és, així, l'orientació dels consells nutricionals en el sentit de disminuir la morbiditat i la mortalitat càrdio-vascular (Davey-Smith G *et al*, 1992).

Fins a l'actualitat, diferents tipus d'estudis han posat en evidència una relació estreta entre la incidència de les manifestacions clíniques de l'arteriosclerosi i els hàbits alimentaris de les poblacions. Així ho confirmen les dades provinents d'estudis epidemiològics, experimentals i d'intervenció nutricional (Keys A, 1970; Shepherd J *et al*, 1978; Cortese C *et al*, 1983; Ornish D *et al*, 1990; Watts G *et al*, 1992).

L'estudi epidemiològic més important és, sens dubte, l'anomenat Estudi dels set països (*Seven Countries Study*) (Keys A, 1970). Aquesta investigació va posar en evidència un paral·lelisme estret entre la taxa de malalties càrdio-vasculars i l'excés d'àcids grassos saturats de la dieta. En efecte, el consum d'aquest tipus d'àcids grassos per individus normals comportava la presència de concentracions elevades de colesterol en el plasma. Recordem, a més a més, que existeix una correlació positiva entre les concentracions plasmàtiques de colesterol i la taxa de malalties coronàries.

Per altra part, els resultats de l'Estudi dels 7 països van permetre mostrar el paper menys important d'altres components de la dieta. Així, es va estudiar l'efecte de la quantitat total de lípids sobre la modificació de la concentració plasmàtica de colesterol i la incidència de les malalties coronàries. Per exemple, Creta amb una alimentació rica en lípids (40% de les calories), sobretot en oli d'oliva, presentava una taxa de malalties coronàries molt feble. Cal subratllar que, en aquest país,

l'esperança de vida era i és relativament elevada (Keys A, 1970; Keys A *et al*, 1986) (Taula 17).

A més, certs treballs van subratllar la petita incidència de les malalties cardiovasculars en les poblacions mediterrànies. Es va suggerir, en aquest sentit, que el consum important de greixos monoinsaturats aportats, essencialment, per l'oli d'oliva pot, almenys parcialment, explicar aquest fet (Keys A, 1970).

Cal subratllar que, en diversos països mediterranis, existeix una evolució dels hàbits alimentaris que es tradueix en un augment del consum de carns i de productes làctics i una disminució de la utilització de l'oli d'oliva coincidint amb un canvi en l'estil de vida (Kafatos AG *et al*, 1980). En conseqüència, ha estat observat un creixement de les concentracions del colesterol plasmàtic en aquests països, així com un augment del nombre de pacients que pateixen malalties coronàries. Sembla, doncs, raonable encoratjar els consumidors de les regions mediterrànies perquè mantinguin el seu règim tradicional (Masana L *et al*, 1991a).

Per un altre costat, va ser constatada al Japó una taxa feble de malalties coronàries lligada a una alimentació amb una proporció reduïda de lípids i elevada en glúcids (Keys A, 1970). Una altra observació coneguda es refereix a l'aparició, en una població d'emigrants japonesos, d'una modificació de la incidència de les malalties cardíovasculars paral·lela a un canvi de país i d'hàbits alimentaris. Així aquests japonesos, després de l'emigració, tenien un augment en la taxa de mortalitat cardíovascular. Sembla, doncs, que el canvi de l'estil de vida i la modificació dels hàbits alimentaris siguin els factors que han comportat variacions de la mortalitat coronària (Robertson TL *et al*, 1977).

Taula 17.- Estudi dels Set països (12095 homes de 40 a 59 anys de 7 països)

País	Aportacions alimentàries i colesterol plasmàtic					Colesterol plasmàtic (g/l)
	% de calories aportades pels àcids grassos					
	totals	saturats	poliinsaturats	monoiinsaturats		
U.S.A.	40	18	4	18		2.61
Finlàndia	37	21	5	11		2.40
Holanda	40	19	5	16		2.35
Itàlia	27	10	3	14		2.04
Iugoslàvia	34	11	5	18		1.87
Grècia	37	8	4	25		2.04
Japó	9	3	3	3		1.48

(*Extrata de Keys A. Circulation 1970; 41 (Suppl. 1): 163-183.*)

Un altre grup d'estudis que analitzen la influència del règim alimentari van ser dirigits a realitzar la prevenció primària de la malaltia coronària: individus normals que formen part de la població general (sense manifestacions clíniques de l'aterosclerosi) van seguir diferents tipus de règim alimentari; per un altre costat, altres projectes es van dirigir a la prevenció secundària: pacients amb malalties coronàries van seguir com a tractament una modificació del seu règim alimentari.

El conjunt de resultats ha estat avaluat recentment mitjançant la meta-anàlisi. Aquesta tècnica permet avaluar, d'una manera estadística i d'una forma crítica, els resultats de diversos estudis similars o suficientment pròxims per tal d'explotar millor totes les informacions (Davey-Smith G *et al*, 1992; Mensink RP *et al*, 1992). L'avantatge d'aquest tipus d'anàlisi és el d'eliminar les diferències significatives que poden aparèixer en els treballs avaluats, degudes a l'atzar o a la utilització de grups d'individus petits.

Una meta-anàlisi (Davey-Smith G *et al*, 1992) molt interessant va ser feta a partir de tres estudis de prevenció primària, realitzats en poblacions comparables, constituïdes per residents d'institucions mentals: Angeles Veterans Administration (Dayton S *et al*, 1969), Finnish Mental Hospital Study (Miettinen M *et al*, 1972) i Minnesota Coronary Survey (Frantz I *et al*, 1989). Els resultats van mostrar una reducció del nombre de morts deguts a les malalties coronàries. Malgrat les característiques particulars d'aquest tipus de població, aquest estudi va mostrar que el règim alimentari té efectes preventius positius.

Pel que fa als estudis de prevenció secundària, es van utilitzar solament dos treballs que investigaven aspectes clínics associats als tests angiogràfics i que van ser realitzats utilitzant un ordre a l'atzar i controlat: el Lifestyle Heart Study (Ornish D *et al*, 1990) i el St. Thomas's Atherosclerosis Regression Study (STARS) (Watts G *et al*, 1992). En aquests dos treballs, els individus van ser sotmesos a importants reduccions dels greixos alimentaris: en el Lifestyle Heart Study (Ornish D *et al*, 1990) els greixos aportaven, aproximadament, un 10% del total calòric, és a dir, el

règim era vegetarià; en el STARS (Watts G *et al*, 1992) els greixos totals constitueixen el 27% del total calòric. Els resultats d'aquests dos estudis van posar en evidència un augment del diàmetre de les artèries estenosades i, en conseqüència, una regressió de les lesions d'aterosclerosi. A més a més, l'estudi STARS va mostrar una disminució de les manifestacions clíniques de la malaltia coronària.

Existeixen, per altra banda, treballs que avaluen la influència dels nutrients sobre el metabolisme lipídic per tal de comprendre els mecanismes d'acció dels diferents components del règim, en concret, dels àcids grassos (Shepherd J *et al*, 1978; Cortese C *et al*, 1983; Baudet MF *et al*, 1984; Esteva O *et al*, 1986; Lewis B *et al*, 1986; Solà R *et al*, 1993). En resum, constatem que un règim alimentari ric en àcids grassos saturats produeix un augment del colesterol de les LDL plasmàtiques amb una reducció de l'activitat del receptor de les LDL, la qual cosa comporta una disminució de la degradació de les LDL (Cortese C *et al*, 1983; Lewis B *et al*, 1986). Per altre costat, les VLDL, menys degradades pel receptor de les LDL, poden transformar-se en LDL en una quantitat més gran (Kita T *et al*, 1982; Baudet MF *et al*, 1984; Lewis B *et al*, 1986).

Per tal d'evitar l'augment de colesterol del plasma que significava el consum d'àcids grassos saturats, es va recomanar la seva substitució per àcids grassos poliinsaturats. En la ingesta d'aquests àcids grassos s'observava, en efecte, una reducció del colesterol de les LDL degut a l'augment de l'activitat del receptor de les LDL i, en conseqüència, una eliminació més gran d'aquestes lipoproteïnes del plasma. De la mateixa manera, s'eliminava del plasma una quantitat més gran de VLDL mercès a l'activitat d'aquest receptor, la qual cosa conduïa a una producció menor de LDL (Cortese C *et al*, 1983). Al mateix temps, però, els àcids grassos poliinsaturats tenien l'inconvenient de reduir la producció de l'apolipoproteïna majoritària de les HDL, l'apolipoproteïna A-I; s'indueix, així, una disminució de les concentracions plasmàtiques del colesterol de les HDL (Shepherd J *et al*, 1978).

Quant als règims rics en àcids grassos monoinsaturats, es van trobar els mateixos efectes sobre les LDL que en el cas dels àcids grassos poliinsaturats; de totes maneres, en altres casos no es va observar modificació d'aquestes lipoproteïnes (Lewis B *et al*, 1986; Mensink RP *et al*, 1992), encara que sempre mantenien o augmentaven el colesterol de les HDL (Mattson FH *et al*, 1985; Jacotot B *et al*, 1988; Masana L *et al*, 1991a; Mata P *et al*, 1992).

Els àcids grassos monoinsaturats, al mateix temps, produïen les HDL₃ més eficaces per tal de provocar la sortida de colesterol de les cèl.lules i reduir el seu contingut de colesterol (Solà R *et al*, 1993).

En paral·lel, diversos treballs van precisar els efectes d'altres components de la dieta, com els glúcids, les fibres alimentàries i els antioxidants (Vitamines A, E et C..), en la prevenció de l'aterosclerosi (Berry EM *et al*, 1991; Riccardi G *et al*, 1991; Ulbrich T *et al*, 1991; Berry EM *et al*, 1992). Tots ells han permès, en conseqüència, de modificar els consells donats anteriorment. La perspectiva actual té en compte no solament la millora de les taxes lipídiques sinó també els efectes sobre la peroxidació lipídica, sobre la insulino-resistència i la trombosi.

Una dada més que caldria no oblidar és que la longevitat tendeix a ser més alta i les malalties coronàries menys freqüents en els països amb un consum elevat d'oleat (Keys A *et al*, 1986).

En l'actualitat, la prudència aconsella reduir calories a partir dels greixos i els àcids grassos saturats, i augmentar el consum de fruites i vegetals rics en minerals, vitamines i fibres (*Dietary Guidelines, Prudent Diets* (per a USA), *Dietary Goals* (de l'OMS)). Menjar fruita i vegetals verds sembla estar associat amb una reducció del risc d'una mort prematura per malalties cerebrovasculars. De totes maneres, independentment del mecanisme implicat, s'hauria de dir que el consum de fruita i vegetals pot oferir una forma agradable i segura de medicina preventiva per aquest tipus de malalties (Acheson RM *et al*, 1983).

1.8.- Dieta, peroxidació lipídica i arteriosclerosi

Un dels aspectes actuals de la influència de la dieta en l'arteriosclerosi es fonamenta en la seva relació amb la peroxidació lipídica de les lipoproteïnes. Aquesta hipòtesi es basa en el paper fonamental que juguen les lipoproteïnes oxidades en la patogènesi de l'arteriosclerosi. Com ja hem explicat anteriorment, les lipoproteïnes oxidades són reconegudes pel receptor depurador dels macròfags afavorint la seva transformació en cèl.lules escumoses, element clau en la formació de la placa d'ateroma (Steinberg D *et al*, 1989; Ross R, 1993).

Entre els components de la dieta, ens trobem que alguns d'ells afavoririen l'oxidació, mentre que altres, els antioxidants, protegirien de l'atac oxidatiu. A més a més, la resistència a l'oxidació de les lipoproteïnes és un altre aspecte en què podria intervenir la dieta. Així, en una situació d'oxidació suficientment agressiva per part dels radicals lliures, cada cèl.lula o lipoproteïna, en funció de la seva susceptibilitat, podria desenvolupar un grau determinat d'oxidació. Això implicaria que les lipoproteïnes més resistents i, per tant, menys oxidables, serien menys reconegudes per part del receptor depurador dels macròfags, la qual cosa no facilitaria la formació de la placa d'ateroma i, per tant, implicaria un menor poder aterogènic.

Com és conegut, hi ha una relació entre els diferents tipus d'àcids grassos de la dieta i la seva capacitat aterogènica. De totes maneres, aquest poder aterogènic no s'explica totalment pels efectes dels àcids grassos en els nivells de colesterol plasmàtic i en el de les seves subfraccions. Per això, com ja hem dit, s'han buscat altres explicacions per tal de comprendre la relació que lliga dieta i aterogènesi (Keys A *et al*, 1986).

Així, a l'analitzar els efectes dels diversos tipus d'àcids grassos, s'observen resultats beneficiosos si, en la substitució dels àcids grassos saturats de la dieta, s'utilitzen àcids grassos monoinsaturats en comptes dels àcids grassos poliinsaturats. Aquesta substitució pot donar una protecció addicional al generar unes partícules relativament

resistents a la modificació oxidativa, al mateix temps que s'optimitzen les concentracions de colesterol de les LDL i HDL (Grundy SM *et al*, 1990). Així mateix, les partícules de LDL riques en àcids grassos poliinsaturats són més fàcilment oxidables i, en principi, més aterogèniques. D'aquesta manera, l'efecte hipocolesterolemiant dels àcids grassos poliinsaturats s'hauria de veure compensat, almenys parcialment, per l'augment de la susceptibilitat de les LDL a l'oxidació (L'Abbé MR *et al*, 1991; Odeleye OE *et al*, 1991; Reaven P *et al*, 1991).

No hem d'oblidar tampoc el paper dels antioxidants en les malalties cardíco-vasculars. Així, dins dels antioxidants, hem de tenir en compte la vitamina C, la vitamina E, els polifenols i els β -carotens, sense oblidar el probucol com a fàrmac antioxidant (Masana L *et al*, 1991b).

Respecte als possibles mecanismes d'acció dels antioxidants en l'arteriosclerosi, destacarem el paper de la vitamina E. Així, s'han mostrat diverses evidències per les quals la vitamina E pot actuar prevenint tant la iniciació com la progressió de l'aterosclerosi espontània (Muckle TJ *et al*, 1989; Paul J *et al*, 1989). A més a més, s'ha trobat que el nivell de vitamina E del plasma humà està inversament correlacionat amb la mortalitat per malalties coronàries (Gey KF *et al*, 1989).

Dins d'aquesta mateixa línia, diversos treballs prospectius recents han subratllat la importància del consum habitual o de la suplementació d'altres dosis de vitamina E (>100 UI/dia) en la reducció del risc de malalties cardíco-vasculars en homes i dones, quan es compara amb ingestes molt baixes (<3 UI/dia) (Stampfer MJ *et al*, 1993). L'efecte beneficiós, però, s'observa també en el cas d'un suplement petit de vitamina E. D'altra banda, estudis transversals mostren una relació positiva entre les concentracions baixes d'antioxidants i el risc de malalties cardíco-vasculars (Riemersma RA *et al*, 1991). En aquest sentit, s'han establert nivells mínims d'antioxidants, per sota dels quals augmenta el risc de malaltia cardíco-vascular. Per a la vitamina E aquesta quantitat seria de 30 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ per a la vitamina C i 500 nmol/l per als β -carotens. De totes maneres, és important recordar que, com

a conseqüència de la interacció entre els diversos antioxidants, un dèficit, fins i tot mínim, d'una de les vitamines pot implicar la disminució de la bioactivitat de les altres.

Així sembla evident que a través de la dieta podem afavorir la peroxidació lipídica o, pel contrari, protegir les lipoproteïnes de l'atac oxidatiu.

Cal tenir en compte, a més a més, que el tractament comercial, l'emmagatzematge o la cocció dels greixos pot destruir el contingut en tocoferols. Per altra part, l'addició de vitamina E a un oli podria no tenir la mateixa activitat biològica que la vitamina E inclosa en l'estructura de forma natural perquè, possiblement, no es donarien les condicions per a la seva màxima eficàcia antioxidant (Lölinger J, 1991).

En referència als aliments que ens poden proveir d'antioxidants trobem que els β -carotens i la vitamina A són aportats, bàsicament, per les hortalisses (ex., pastanaga, espinacs) (*Taula 18*); la vitamina E, pels olis i les fruites seques i la vitamina C, pels cítrics i per altres fruites (Bays HE *et al*, 1993).

De tot l'anterior podem deduir que esdevé important l'elecció de fonts naturals d'àcids grassos monoinsaturats i de vitamines antioxidants degut a l'efecte positiu que se'ls atribueix enfront de l'oxidació. De totes maneres, en àrees com ara la mediterrània, és relativament senzill aconseguir-ho a través únicament dels aliments comuns. És a dir, resulta simple incloure en la nostra dieta aliments que siguin font dels β -carotens, de la ubiquinona i de la vitamina E tal com es veu, respectivament, en la *Taula 18, 19 i 20*. Tot això, de manera no sorprenent, configura una dieta rica en oli d'oliva, verdures i fruites i, per tant, rica en fibra, elements claus de l'anomenada dieta mediterrània.

Finalment, sembla que la dieta modula l'oxidació de les lipoproteïnes, la qual cosa dóna una visió més àmplia dels efectes dels components de la dieta en l'arteriosclerosi. Per tant, serà interessant continuar la recerca per tal de definir una

estratègia basada en les aportacions nutricionals, amb l'objectiu de millorar la prevenció de les malalties càrdio-vasculars.

Taula 18.- Aliments que són font de carotens

Aliment	Quantitat (mg de carotenoide/100 g d'aliment comestible)
Albercoc	1.5
Bròquil cuït	2.5
Espinac cuït	6.0
Mango	1.2
Meló	2.0
Moniato	12.0
Pastanaga	12.0
Préssec	1.0

(Extreta de Duthie GG. Eur J Clin Nutr 1993; 47: 759-764).

Taula 19.- Aliments que són font d'ubiquinona (coenzim Q)

Aliment	Quantitat (μg ubiquinona/100 g aliment comestible)
Ametlla	14
Avellana	17
Cacauet	27
Espinac	11
Llard	10
Nou	19
Oli de colza	73
Oli de panís	13
Oli de sèsam	32
Oli de soia	92
Pollastre	21
Porc	25
Sardina	64
Vedella	31
Verat	43

(Extreta de Duthie GG. Eur J Clin Nutr 1993; 47: 759-764).

Taula 20.- Aliments que són font de vitamina E

Aliment	Quantitat (mg vitamina E/100 g aliment comestible)
Alvocat	4
Ametlla	20
Avellana	21
Cacauet	8
Col	7
Llard	120
Llavor de blat	13
Llet	
Primavera	2
Tardor	11
Mantega de vaca	240
Móra	4
Oli de gira-sol	49
Oli de fetge de bacallà	20
Oli de palma	26
Oli de panís	17
Oli d'oliva	12
Oli de soia	10
Ous	110
Peix	
Bacallà	20
Gamba	90
Pollastre	30
Porc	50
Vedella	60

(*Extreta de Duthie GG. Eur J Clin Nutr 1993; 47: 759-764 i Machlin, LJ, ed. Vitamin E. A comprehensive treatise. New York: Marcel Dekker, 1980; p.99).*)

**INTERÈS DELS EFECTES DE LA DIETA EN
L'OXIDACIÓ, ELS ANTIOXIDANTS I EL
COMPORTAMENT METABÒLIC DE LES
LIPOPROTEÏNES. HIPÒTESI DE TREBALL**

La relació de la dieta amb l'arteriosclerosi s'ha centrat, bàsicament, en els efectes dels àcids grassos de l'alimentació sobre els nivells plasmàtics de lípids i lipoproteïnes.

Inicialment va sorgir l'interès per estudiar els efectes dels tipus d'àcids grassos de la dieta de poblacions amb nivells plasmàtics de colesterol semblants però amb una incidència de malalties cardíco-vasculars molt diferents. Així, per exemple, es va observar que els àcids grassos monoinsaturats poden no modificar o reduir les concentracions de colesterol total i colesterol LDL d'una forma semblant a com ho fan els àcids grassos poliinsaturats. Per un altre costat, els àcids grassos monoinsaturats o bé no modifiquen o bé incrementen els nivells de colesterol de les HDL del plasma (Ascaso JF *et al*, 1987; Baggio G *et al*, 1988; Jacotot B *et al*, 1988; Mensink RP *et al*, 1989). A més a més, els habitants de les àrees mediterrànies tenen una incidència menor de malalties cardíco-vasculars. Per tant, la relació entre dieta i arteriosclerosi no s'explica, solament, pels efectes sobre els nivells de colesterol de les LDL i de les HDL del plasma. D'aquesta manera, sorgeixen noves perspectives per tal de completar el coneixement de la influència del tipus d'àcid gras sobre el metabolisme lipídic.

Això va conduir a plantejar-se la modulació del comportament metabòlic de les lipoproteïnes en funció del tipus d'àcids grassos de la dieta. En concret, aquests àcids grassos exercirien la seva influència sobre la funció metabòlica de les lipoproteïnes a través de la modificació de les seves característiques físico-químiques (Baudet MF *et al*, 1984; Esteva O *et al*, 1986; Solà R *et al*, 1990; Solà R *et al*, 1993). Dins de les característiques, ens interessem per aquelles que han mostrat la seva vinculació amb la regulació del comportament metabòlic. En particular, escollim la composició química global, la composició en àcids grassos i la fluïdesa.

En aquest sentit, treballs del nostre equip han suggerit que els àcids grassos monoinsaturats aportats per l'oli d'oliva produeixen les HDL₃ més eficaces a afavorir la sortida de colesterol de les cèl.lules. Així, quan comparem dos tipus de HDL₃: les

aïllades d'individus sotmesos a dietes amb diferents tipus d'àcids grassos, i les aïllades després d'una dieta rica en oli d'oliva, veiem que aquestes últimes indueixen una sortida de colesterol cel.lular més important, en comparació amb els àcids grassos poliinsaturats i amb els saturats. Aquesta capacitat de les HDL₃ per induir la sortida de colesterol de la cèl.lula depèn de diversos factors estructurals i químics de la lipoproteïna com ara la fluïdesa, el contingut en colesterol esterificat, la relació entre els dos àcids grassos essencials presents en els fosfolípids i la grandària d'aquestes lipoproteïnes.

Un altre aspecte que cal tenir en compte és que aquests àcids grassos també tenen un paper regulador fonamental en el procés d'oxidació de les lipoproteïnes. De tot això deduïm que no podem desvincular tots aquests fenòmens i hem de contemplar-los simultàniament. L'aprofundiment de l'estudi de l'oxidació ens permetrà comprendre una mica millor resultats inesperats o contradictoris en l'anàlisi de la influència de la dieta en l'arteriosclerosi.

Dins del context de l'oxidació, els àcids grassos monoinsaturats incrementen el seu interès amb l'observació que les LDL produïdes per una dieta rica en àcid oleic són més resistents a l'estrès oxidatiu que les generades després d'una dieta rica en àcid linoleic. Aquestes LDL menys oxidades serien menys reconegudes pel receptor depurador dels macròfags i, per tant, hi hauria una reducció d'un factor clau en la formació de la placa d'ateroma. Això significaria un alentiment en la formació i progressió de l'arteriosclerosi (Parthasarathy S *et al*, 1990b; Berry EM *et al*, 1991; Reaven P *et al*, 1991).

Cal subratllar, a més a més, que l'àcid oleic en aquests treballs esmentats procedeix, en ocasions, de l'oli d'oliva i, en altres, de llavors modificades genèticament per tal d'enriquir-les en àcid oleic.

A partir d'aquests resultats ens vam preguntar:

Totes les fonts naturals d'àcids grassos monoinsaturats, fonamentalment d'àcid oleic, tenen efectes similars en les característiques físico-químiques de les lipoproteïnes i en el seu metabolisme in vitro?

Serà cert, també, aquest efecte positiu per a l'àcid oleic provinent d'una modificació genètica d'una llavor que sense modificar dona un oli ric en àcid linoleic?

Aquest oli modificat tindrà avantatges en referència a l'oli de gira-sol tradicional?

Per tot això vam comparar els efectes dels àcids grassos monoinsaturats aportats per un oli de gira-sol modificat genèticament i ric en àcid oleic, amb els efectes dels àcids grassos poliinsaturats fornits per un oli de gira-sol tradicional, ric en àcid linoleic. Aquesta comparació, a més a més, té una incidència econòmica: encara que totes les fonts d'àcids grassos monoinsaturats tinguin efectes metabòlics similars, no totes les fonts tenen el mateix cost. En concret, ens trobem que aquest oli de gira-sol ric en àcid oleic és més econòmic que l'oli d'oliva, prototipus d'aport d'àcid oleic, la qual cosa podria significar una forma alternativa i barata d'accedir a l'àcid oleic.

Per altra part, l'efecte protector dels àcids grassos monoinsaturats no pot explicar-se només pels seus efectes en les concentracions de lípids i lipoproteïnes del plasma. Així, com ja s'ha demostrat anteriorment, les LDL obtingudes després de seguir una dieta rica en àcids grassos monoinsaturats són més resistents a l'oxidació. Però, nosaltres ens preguntàrem si existia el mateix tipus d'influència sobre les HDL, a les quals s'atribuït un poder anti-aterogènic. En particular, ens vam interessar per les HDL₃ com a principal subfracció que, com ja hem esmentat, facilita la sortida de colesterol de les cèl.lules. Així volíem donar resposta a:

Els àcids grassos monoinsaturats tenen la mateixa influència en l'oxidació de les HDL₃ com s'havia observat per a les LDL?

Si observéssim una reducció de l'oxidació de les HDL₃ després del consum d'una dieta rica en àcid oleic, això suposaria, d'una part, que aquestes lipoproteïnes continuarien provocant la sortida de colesterol des de les cèl.lules perifèriques i, d'altra part, que aquestes HDL₃ serien menys reconegudes pel receptor depurador dels macròfags. Per tant, seguirien exercint el seu paper antiaterogènic.

En cas de confirmar-se aquesta influència dels àcids grassos monoinsaturats en l'oxidació de les lipoproteïnes,

Quina seria la relació entre alguns dels antioxidants presents en les lipoproteïnes i la seva oxidació?

A més a més,

L'àcid oleic realitza la seva funció beneficosa per si sol o necessita d'un conjunt de substàncies que, en conjunt, determinin l'aliment més convenient des de tots els punts de vista?

Si el resultat fos que l'element més important és l'àcid oleic i que, a més a més, és indistinta la procedència del mateix, això simplificaria els consells i les recomanacions nutricionals per a la prevenció de les malalties cardíaco-vasculars.

A fi de respondre aquestes preguntes ens vam plantejar la hipòtesi del present treball:

La ingesta de dos olis obtinguts a partir del gira-sol, un ric en àcid oleic i l'altre ric en àcid linoleic, induirà diferents graus de peroxidació lipídica de les LDL i de les HDL₃, relacionats tant amb canvis de les característiques físico-químiques, com amb el contingut d'antioxidants d'aquestes lipoproteïnes. Aquests canvis modularan el comportament metabòlic de les LDL i de les HDL₃.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE LA DIETA EN L'OXIDACIÓ, ELS ANTIOXIDANTS I EL COMPORTAMENT METABÒLIC DE LES LIPOPROTEINES

Maria Teresa Bargalló Escrivà

ISBN:978-84-691-1877-1/DL: T-340-2008

OBJECTIUS

Estudiar i comparar els efectes d'una dieta rica en àcids grassos poliinsaturats, aportats per l'oli de gira-sol i d'una dieta rica en àcids grassos monoinsaturats, subministrats per un oli de gira-sol enriquit en àcid oleic sobre:

1. Les concentracions en lípids, lipoproteïnes i apolipoproteïnes del plasma.
2. La composició química global de les fraccions LDL i HDL₃.
3. La composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL₃.
4. La fluïdesa de les LDL i HDL₃.
5. La peroxidació lipídica de les HDL₃ natives, així com la susceptibilitat a l'oxidació de les LDL i HDL₃.
6. La concentració en plasma, LDL i HDL₃ dels antioxidants biològics: α -tocoferol i β -+ γ -tocoferol i retinol.
7. La capacitat de les LDL aïllades després de les dues dietes per a ésser reconegudes pel receptor depurador dels macròfags humans.
8. La capacitat de les HDL₃ aïllades després de les dues dietes per extreure el colesterol cel.lular en fibroblasts i macròfags humans.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE LA DIETA EN L'OXIDACIÓ, ELS ANTIOXIDANTS I EL COMPORTAMENT METABÒLIC DE LES LIPOPROTEINES

Maria Teresa Bargalló Escrivà

ISBN:978-84-691-1877-1/DL: T-340-2008

MATERIAL I MÈTODES

4.1.- Individus

Els participants eren 22 religiosos normolipidèmics d'una comunitat rural de Bellefontaine (França).

Els criteris d'inclusió van ser:

- Edat de menys de 50 anys.
- Colesterolèmia < 5.60 mmol/l (< 220 mg/dl).
- Trigliceridèmia < 2.25 mmol/l (< 200 mg/dl).

Els criteris d'exclusió de l'estudi van ser:

- Sobrepès de BMI > 27 kg/m².
- Tabaquisme.
- Hipercolesterolèmia.
- Hipertrigliceridèmia.
- Diabetis.
- Insuficiència renal.
- Insuficiència hepàtica.
- Insuficiència cardíaca.
- Cardiopatia isquèmica.
- Prendre fàrmacs susceptibles de modificar el metabolisme lipídic.

Durant l'estudi els participants continuaven amb els seus costums.

La *Taula 21* mostra les característiques del grup.

4.2.- Pla de l'estudi

El protocol de l'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic de l'Hospital. Tots els individus van ser estudiats durant 2 períodes de 8 setmanes. Cada període consistia a seguir la seva dieta habitual encara que utilitzant en un període l'oli ric en àcid oleic i en l'altre l'oli ric en àcid linoleic.

L'oli ric en àcid linoleic era oli de gira-sol i l'oli ric en àcid oleic era un oli de gira-sol modificat genèticament i ric en àcid oleic. La *Taula 22* mostra la composició dels olis utilitzats i es compara amb la de l'oli d'oliva.

El tipus d'estudi va ser creuat 2 x 2 (Ratkowsky DA *et al*, 1993) amb un període previ d'estabilització de 8 setmanes en què van seguir amb la seva dieta habitual, rica en àcid linoleic. Després d'aquest període, els individus van ser dividits en 2 grups, en un ordre a l'atzar, i assignats a una de les dues dietes, o a la rica en àcid linoleic o a la rica en àcid oleic, durant 8 setmanes. Al finalitzar aquest primer període, tots els individus varen seguir un període de rentat (període de *wash-out*), seguint una dieta rica en àcid linoleic, per un altre període de 8 setmanes. Després de aquest període, els individus varen ser separats novament en 2 grups, seguint una dieta rica en àcid oleic els que en el primer període havien fet la dieta rica en àcid linoleic, i l'inrevès l'altre grup.

Al final de cada període d'intervenció dietètica, es va realitzar una extracció sanguínia, al mateix temps que es pesaven els individus.

4.3.- Dietes

En els darrers dies del primer període d'estabilització, els participants van omplir una enquesta alimentària que recollia la seva ingesta diària, apuntant en un formulari que se'ls havia facilitat, la quantitat i el tipus d'aliment ingerit en els diferents àpats del dia. El recull diari de 24 h, durant 3 dies, un festiu i 2 feiners consecutius, va

ser el període considerat demostratiu de la ingesta d'un individu, per tal de poder adaptar l'aportació calòrica individual durant el període d'intervenció dietètica. La valoració dietètica va permetre calcular el valor energètic dels aliments ingerits diàriament i els percentatges aportats com greixos, proteïnes i hidrats de carboni, així com els percentatges i grams diaris dels àcids grassos saturats, poliinsaturats, monoinsaturats i de colesterol. La conversió d'aliments en nutrients es va realitzar aplicant la taula de composició informatitzada de l'Inserm (França), amb algunes adaptacions per a aliments concrets.

Quant a la recollida de dades en relació a la seva dieta habitual, es va trobar que aquesta aportava unes 2400 kcal/dia, amb un 15% en forma de proteïnes, un 38% en forma de lípids i un 46% en forma d'hidrats de carboni. La ingesta de colesterol era d'uns 440 mg/dia. A partir d'aquestes dades es van elaborar, per al present estudi, dues dietes isocalòriques, la composició de les quals es detalla a la *Taula 23*. Les proteïnes significaven un 14% del total energètic ingerit i els hidrats de carboni, al voltant d'un 48%. En els dos períodes de dieta, els greixos aportaven un 38% del total energètic. Un 15% del total calòric era aportat per l'oli (40 g) a fi de modificar la composició en àcids grassos (*Taula 23*).

4.4.- Tècniques de laboratori

4.4.1.- Fraccionament lipoproteic

Principi:

Aïllament en el sèrum o en el plasma de les fraccions lipoproteiques per ultracentrifugació seqüencial preparativa.

Solucions de densitat:

- $d=1.006$ g/ml: 20.7 g NaCl, 0.2 g Na_2EDTA , 2 ml NaOH 1N en 2 l H_2O ;
 - $d=1.239$ g/ml: 328 g NaBr en 1 l $d=1.006$;
 - $d=1.019$ g/ml: 4/1 (v/v), 1.006/1.071;
 - $d=1.063$ g/ml: 4/1 (v/v), 1.019/1.239 o també 4/1 (v/v), 1.006/1.291;
 - $d=1.071$ g/ml: 13/4 (v/v), 1.019/1.239 o també 31/12 (v/v), 1.006/1.239;
 - $d=1.125$ g/ml: 4/1 (v/v), 1.063/1.373;
 - $d=1.210$ g/ml: 5 ml 1.063 + 1.1 g BrNa;
 - $d=1.495$ g/ml (solució saturada de NaBr) preparada a partir de $d=1.063$ g/ml.
-

El mateix dia de l'extracció es va iniciar l'aïllament de les lipoproteïnes per ultracentrifugació seqüencial preparativa pel mètode de Havel (Havel RJ *et al*, 1955) en una centrífuga TeKnicon T-1055 (Kontron, Suïssa) i un rotor Kontron T45.6 (Kontron, Suïssa) amb tubs de polihalòmer d'una capacitat de 6.5 ml.

A fi d'obtenir la quantitat de lipoproteïna necessària per a tots els experiments, de cada individu es van ultracentrifugar 8 ml de plasma, és a dir, un total de 4 tubs.

1. Inicialment, es van aïllar les VLDL i les IDL, per la qual cosa es van posar 2 ml de plasma més 2 ml de solució de densitat 1.006 g/ml i 1 ml de solució de densitat 1.071 g/ml, centrifugant a $105000 \times g$ (40.000 rpm) durant 18 h a 4°C . Es van recollir 2 ml del sobrenedant corresponent a les VLDL més IDL.

2. Per tal d'obtenir les LDL, l'infranedant es va incrementar a una densitat de 1.063 g/ml a l'afegir-hi 1 ml de solució de densitat 1.019 g/ml i 1 ml de solució de densitat 1.239 g/ml; així es van obtenir les LDL després de 20 h de centrifugació a 105000 x g i 4°C. Es van recollir 2 ml del sobrenedant corresponent a les LDL.
3. Les HDL₂ (densitat entre 1.063 i 1.125 g/ml) es van obtenir afegint als 2 ml de l'infranedant, 1 ml de solució de densitat 1.063 g/ml i 1 ml de solució de densitat 1.373 g/ml; es barrejaven seguidament i es centrifugaven a 105000 x g durant 40 h a 4°C.
4. Per aïllar les HDL₃, es va portar l'infranedant a 4 ml amb solució de densitat 1.125 g/ml i es va afegir 1 ml d'una solució saturada de NaBr. Després de centrifugar a 105000 x g durant 40 h a 4°C es van recollir els 2 ml del sobrenedant que contenia les HDL₃.
5. Un cop aïllades les LDL i les HDL₃, cadascuna d'aquestes fraccions va ser rentada per tal d'eliminar les restes d'albúmina i va ser concentrada a la mateixa densitat amb una centrifugació a 105000 x g, durant 24 h a 4°C.
6. Aquestes fraccions van ser utilitzades per analitzar:
 - La composició química global en colesterol total, colesterol lliure, triglicèrids, fosfolípids i proteïnes.
 - La composició en àcids grassos dels fosfolípids.
 - L'anisotropia de fluorescència.
 - L'oxidació lipoproteica.
 - La susceptibilitat a l'oxidació.
 - La quantificació de l' α -tocoferol, dels isòmers β -+ γ -tocoferol i del retinol en el plasma, les LDL i les HDL₃.
 - Els estudis en cèl.lules.

Les mostres per a realitzar l'estudi de la composició química global, anisotropia de fluorescència, i els estudis cel.lulars eren utilitzades immediatament. Les alíquotes per a determinar l'oxidació, la susceptibilitat a l'oxidació i les vitamines van ser guardades a -70°C amb els antioxidants, àcid etilendiaminotetraacètic (EDTA) i

glutatió. A més a més, les mostres per a determinar vitamines es van preservar de la llum, protegint els tubs amb paper d'alumini.

4.4.2.- Composició química global

En el plasma i en les lipoproteïnes es van determinar el colesterol total, el colesterol lliure, els triglicèrids i els fosfolípids mitjançant kits enzimàtics (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany) adaptats a un autoanalitzador Cobas Mira (Roche Pharmaceuticals, Switzerland). Els controls de qualitat van ser Precilip EL^R, i Precinorm^R. El colesterol esterificat es va obtenir de la diferència entre el colesterol total i el colesterol lliure.

El coeficient de variació intra-assaig va ser de 0.7% per al colesterol, 1.2% per als triglicèrids i 0.9% per als fosfolípids. El coeficient de variació inter-assaig va ser de 1.2% per al colesterol, 1.2% per als triglicèrids i 1.8% per als fosfolípids.

El contingut en proteïnes totals es va mesurar pel mètode de Lowry (Lowry OH *et al*, 1951). El coeficient de variació intra-assaig va ser de 0.8 % i inter-assaig va ser de 1.5%. El mètode Lowry es detalla en el següent apartat.

4.4.2.1.- Mètode de Lowry

Principi:

El mètode valora la reacció entre els enllaços peptídics i els ions cúprics presents en una solució alcalina de tartrat (reactiu del Biuret). Posteriorment s'afegeix el reactiu fenol Folin-Ciocalteu i es forma un complex de color blau-porpra, proporcional a la concentració total de proteïna. L'absorbància del complex es determina a 550-750 nm.

Solucions:

- Solució A: Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N per a les lipoproteïnes i Na_2CO_3 2% per a les proteïnes de les cèl.lules;
- Solució B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%;
- Solució C: $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2%;
- Solució de 20 μl d'albumina humana al 20% en 8 ml d' H_2O destil.lada;
- Reactiu alcalí de coure: 100/1/1, A/B/C (recordem que la solució A és diferent per a les lipoproteïnes i per a les cèl.lules);
- Solució de Folin: El reactiu de Folin diluït 1/1 (v/v) en H_2O destil.lada.

La metodologia seguida va ser:

1. Es va preparar una corba estàndard amb la solució d'albumina humana.
2. Es va utilitzar una quantitat de 20 μl de lipoproteïna o 500 μl del material obtingut de la dissolució de les cèl.lules. Es va ajustar el volum de les lipoproteïnes fins a 200 μl amb H_2O destil.lada.
3. Es van afegir als 200 μl de la solució de les lipoproteïnes o als 500 μl de solució cel.lular, 2 ml de solució alcalina de coure.
4. Es van barrejar i es van deixar en repòs a temperatura ambient durant 10 min.
5. Es van afegir 200 μl de la solució de Folin i es van barrejar al vòrtex.
6. Es va deixar la solució resultant a temperatura ambient com a mínim 30 min i com a màxim 60 min.
7. Es va llegir a 650 nm.

En el plasma es van determinar les apolipoproteïnes A-I, A-II i B, l'apolipoproteïna B a les LDL i l'apolipoproteïna A-I a les HDL₃ mitjançant kits Immunoturbidimètrics (Orion Pharmaceutica, Finlàndia), amb un coeficient de variació intra-assaig de 1.3 i 1.2%, respectivament. El coeficient de variació inter-assaig va ser de 2.5% per a totes les apolipoproteïnes.

4.4.3.- Separació i composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL₃

Principi:

Prèvia extracció dels lípids, es realitza la identificació dels fosfolípids mitjançant cromatografia en capa fina. Posteriorment es realitza la metilació dels àcids grassos dels fosfolípids i, per últim, la quantificació dels àcids grassos per cromatografia gasosa.

Solucions:

- Solució de Folch: cloroform/metanol (2/1, v/v);
- NaCl 0.9%;
- Solució de rodamina al 0.05% en etanol;
- Àcid heptadecanoic (1 mg/ml) en cloroform;
- Solució de metanol/benzè/àcid sulfúric (100/0.2/2; v/v/v);
- Solució heptà/aigua destil.lada (2/2;v/v);

Condicions que ha de complir la mostra de HDL₃:

- Utilitzar, com a mínim, 800 µg de proteïna.

Cromatografia en fase gasosa. Aparell i condicions de treball:

Cromatògraf de gasos Carlo Erba 4100 amb les següents característiques:

- Columna: Chrompack CP Sil 88 (tipus capil·lar de longitud de 50 m, diàmetre interior de 0.22 mm);
 - Fase estacionària: Cianopropilpolixilona (gruix de fase de 0.2 μm);
 - Gas vector: Heli a una pressió de 2 kg/cm²;
 - Temperatura: Programat de 145 a 205°C amb un augment de 4.5°C/min i després a 205°C durant 20 min. L'injector i el detector d'ionització de flama es van graduar a una temperatura de 260°C;
 - Injecció: Injector amb divisor;
 - Volum d'injecció: 1-2 μl ;
 - Detecció: Detector de flama. Es van utilitzar, per al detector, l'hidrogen i l'aire sintètic com a gasos auxiliars;
 - Integrador: Etnica 10 (Delsi);
 - Càlcul: Mètode estàndard intern, el percentatge de cada àcid gras es va donar per la relació entre l'àrea del pic de l'àcid gras i la suma total de les àrees de tots els pics;
 - Estàndard: Àcid heptadecanoic (C17:0);
 - Temps de retenció: La identificació dels àcids grassos metilats es va fer comparant els seus temps de retenció amb els de l'estàndard intern. Prèviament es va realitzar un cromatograma amb els patrons dels àcids grassos que es van determinar per tal de fixar el seu temps de retenció;
 - Temps de duració del cromatograma: 35 min.
-

1. *Extracció lipídica:*

- 1.1. Les extraccions lipídiques es van realitzar afegint a una mostra que contenia 800 μg de proteïnes de les HDL₃, 20 ml de la solució de Folch (Folch J *et al*, 1951). La barreja es va agitar manualment i enèrgica. Posteriorment, es va incubar durant 18 h a temperatura ambient.
- 1.2. Es van addicionar 10 ml de solució de NaCl 0.9% i es va agitar novament. Es va centrifugar a 4°C i 4500 rpm, durant 20 min. La fracció lipídica es va separar i es va evaporar en un corrent de nitrogen a 37°C.
- 1.3. L'extracte es va redissoldre en unes gotes de cloroform.

2. *Separació de les tres fraccions lipídiques (fosfolípids, triglicèrids i colesterol esterificat):*

Els lípids de l'extret es van separar en les tres fraccions (fosfolípids, triglicèrids i colesterol esterificat) per cromatografia en capa fina mitjançant plaques de silicagel 0.5 mm (Schleicher and Schüll G1505/LS 254)). La solució de migració que es va utilitzar era: èter de petroli/dietilèter/àcid acètic (90/30/1, v/v/v). Les fraccions es van identificar per coloració amb rodamina 0.05% en etanol i es van revelar a la llum ultraviolada amb l'ajut dels estàndards de migració.

3. *Transmetilació dels àcids grassos i la seva quantificació mitjançant cromatografia en fase gasosa (Esteva O *et al*, 1986; Solà R *et al*, 1990; Solà R *et al*, 1993):*

- 3.1. A cada fracció de fosfolípids recollida mitjançant rascat, s'hi va afegir 25 μl d'àcid heptadecanoic, utilitzat com estàndard intern en la cromatografia en fase gasosa. Les fraccions van ser transmetilades en una solució de metanol/benzè/àcid sulfúric (100/0.2/2, v/v/v), després de 2 h 30 min d'incubació a 80°C.

- 3.2. Els àcids grassos transmetilats van ser extrets per agitació en un sistema heptà/aigua destil·lada (2/2,v/v) i conservats fins a la seva determinació en fase gasosa en tubs a -20°C , després de ser tapats sota un corrent de nitrogen per a evitar l'oxidació dels àcids grassos.
- 3.3. Es va obtenir el cromatograma dels àcids grassos a partir de l'aparell i les condicions de treball ja esmentats a l'inici. La identificació dels àcids grassos metilats es va fer comparant els seus temps de retenció amb els de l'estàndard intern. La quantitat de cada àcid gras va ser calculada en relació a la de l'estàndard intern. Es mesurava el percentatge de cada àcid gras mitjançant la relació de l'àrea de cada pic dividit per l'àrea total.

4.4.4.- Anisotropia de fluorescència de les LDL i de les HDL₃

Principi:

Avaluació de l'anisotropia de fluorescència de la sonda present en la mostra. Aquesta mesura, que s'expressa com r , és la inversa de la fluïdesa de la mostra.

Solucions:

- Solució de PBS (tampó fosfat): 8 g de NaCl, 2.5 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g de KH_2PO_4 en 1 l d' H_2O desionitzada i ajustada a pH 7.4;
- Dispersió de DPH: 50 ml de solució PBS, als quals es va addicior 25 μl d'una solució de DPH de 5 mg i 10 ml de tetrahidrofurà, que van ser mesclats enèrgicament.

Seguint el mètode de Shinitzky (Shinitzky M *et al*, 1982):

1. Es van mesclar 100 μl de LDL o de HDL₃ amb 3 ml de la dispersió de DPH (Figures 16 i 17) que es van agitar a temperatura ambient durant una hora en un agitador giratori.

2. La lectura de la intensitat de la fluorescència es va efectuar directament en un espectrofluorímetre AMINCO SPI 500, proveït d'un accessori de polarització amb polaritzadors de Glan-Thompson.
3. Es van determinar triplicats de cada mostra i de cadascun d'aquests es van efectuar 4 lectures. La longitud d'ona d'excitació va ser de 360 nm i la d'emissió va ser de 460 nm.
4. Les lectures van ser efectuades entre 15° C i 45° C. Una calculadora acoblada a l'aparell va donar l'anisotropia de fluorescència.
5. La mesura de la fluïdesa es va obtenir com la inversa de l'anisotropia de fluorescència.

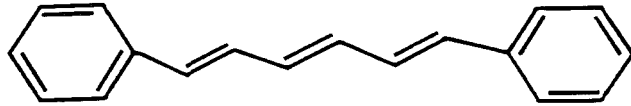


Figura 16.- Estructura de la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatriè (DPH).

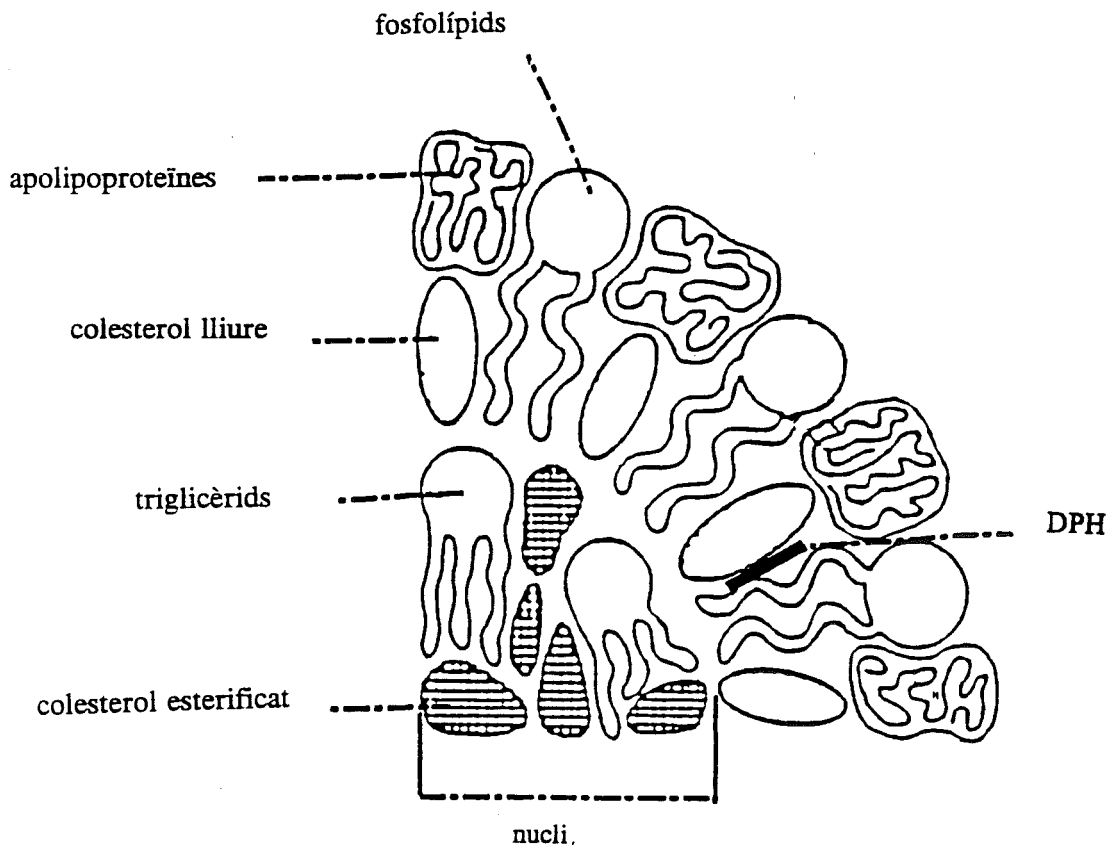


Figura 17.- Posició possible del DPH a la partícula lipoproteica.

4.4.5.- Determinació de les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (TBARS) en HDL₃ natives, LDL oxidades en Cu²⁺ i HDL₃ oxidades en Cu²⁺

Principi:

Avaluació de les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric com un índex de la peroxidació lipídica.

Solucions:

- Solució aquosa d'àcid tiobarbitúric (solució TBA) al 0.5%;
 - Solucions aquoses d'àcid tricloroacètic al 70% i 35%.
-

La determinació de les substàncies reactives amb l'àcid tiobarbitúric es va realitzar a les HDL₃ natives, i a les LDL i les HDL₃ sotmeses al procés oxidatiu en la solució de Cu²⁺. El mètode emprat va ser el de Lee (Lee DM, 1980) modificat per Berry (Berry EM *et al*, 1991) per a les LDL i adaptat per nosaltres per a les HDL₃:

1. En tubs de vidre Pyrex de 15 ml, es van addicionar a 250 µl de plasma, o un volum equivalent a 50 µg de proteïna de LDL o HDL₃, la solució de PBS necessària per a completar un volum de 1 ml i després 0.5 ml de solució d'àcid tricloroacètic al 35%.
2. Després d'agitació amb vòrtex es van afegir 0.5 ml de solució TBA i després d'una nova agitació amb vòrtex es van incubar, en un bany en moviment constant, a 60°C durant 90 min.
3. Un cop finalitzada la incubació es van afegir 0.5 ml d'àcid tricloroacètic al 70% i 2 ml de cloroform i els tubs van ser centrifugats a 3000 rpm durant 20 min a 24°C, després d'una agitació amb vòrtex de 20 s.
4. Per a preparar la corba patró es va utilitzar solució aquosa de tetraetoxipropà que en medi àcid aquós va donar malondialdehid. Les concentracions d'aquest van ser 0.041, 0.082 i 0.164 nmol/ml. Un volum idèntic de PBS va substituir a la mostra en els blancs.

5. Es va utilitzar plasma oxidat en les mateixes condicions com a estàndard intern.
6. El coeficient de variació inter-assaig fou del 4.5%, i el coeficient de variació intra-assaig va ser de 2.2%.
7. La intensitat de la fluorescència es va determinar a una excitació de 515 nm i d'emissió de 553 nm en un espectrofluorímetre LS50 Perkin Elmer connectat a un FL Data Manager, Beaconsfield, Buckinghamshire, England.
8. Els resultats es van expressar com:

**contingut equivalent a malondialdehid:
nmol MDA/mg de proteïna de LDL o HDL₃**

4.4.6.- Susceptibilitat a l'oxidació de les LDL i HDL₃

Principi:

Mesura de la resistència o predisposició a l'oxidació sota unes determinades condicions d'oxidació.

Solucions:

- Solució de diàlisi: 0.9% NaCl (43.9 g) i 0.01 M EDTA (2.0 g) en 5 l d'H₂O destil.lada a pH 7.4;
- Solució de Cu²⁺: 0.17 g de CuCl₂·2H₂O en 10 ml d'H₂O destil.lada;
- Tampó d'oxidació: Es van diluir 0.5 ml (0.0085 g) de la solució de Cu²⁺ anterior en 5 l de PBS (9 g Na₂HPO₄, 6 g NaH₂PO₄, 47 g NaCl en 5 l d'aigua destil.lada), pH 7.4. Es va obtenir una concentració final de 10 μM en Cu²⁺.

El mètode emprat va ser descrit per Shoukry (Shoukry MI *et al*, 1994) per a les LDL; l'adaptació per a les HDL₃ va ser feta per nosaltres:

1. Les alíquotes de LDL i HDL₃ conservades a -70°C amb EDTA i glutatió van ser descongelades, introduïdes en membranes de diàlisi i dialitzades en 2 l de

solució de PBS, a 4°C, durant 24 h, per a eliminar en la seva pràctica totalitat els antioxidants i les sals d'ultracentrifugació.

2. Una vegada acabada aquesta diàlisi, les mostres es van extreure i es van submergir en un altre flascó de diàlisi de 5 l amb una solució idèntica a l'anterior, a la qual se li va afegir abans $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ fins a una concentració final de 10 μM , durant 24 h a 37°C en un bany termostatitzat amb agitació suau. Al mateix temps les mostres van ser protegides de la llum.
3. Per a suprimir el procés d'oxidació les membranes de diàlisi es van col·locar immediatament, durant 12 h, en una solució de PBS a 4°C. Es van extreure les mostres de les bosses de diàlisi i es van centrifugar a 3000 rpm, durant 20 min a 4°C.
4. Les mostres es van filtrar i esterilitzar i després es van conservar en una atmosfera d'argó a 4°C fins a la determinació de les TBARS.

4.4.7.- Determinació de l' α -tocoferol, β -+ γ -tocoferol i retinol en el plasma, les LDL i les HDL₃

Principi:

Determinació de les vitamines liposolubles A i E, de manera simultània, per HPLC en fase reversa.

Solucions:

- Solució estàndard d'acetat de retinol en etanol (100 mg/l);
- Solució estàndard d'acetat de tocoferol en etanol (5 g/l);
- Solució d'àcid ascòrbic (1 g/l);
- Solució estàndard de retinol (100 mg/l);
- Solució estàndard d' α -tocoferol (5 g/l);
- Eluent: Metanol/H₂O, 94/6.

Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC) Waters Millipore amb les següents característiques:

- Bombes i controlador: Waters 600;
 - Columna: Spherisorb ODS2, 5 μ , 150 x 4.6 mm (Teknokroma);
 - Fase mòbil: Metanol/H₂O, 94/6;
 - Flux: 2.5 ml/min;
 - Injecció: Automàtic: WISP 700;
 - Volum d'injecció: 50 μ l;
 - Detecció: Detector d'absorbància (Waters 480 UV-Vis): Fins al minut 6 de l'inici del cromatograma, longitud d'ona a 313 nm. Després i fins al minut 15 es va utilitzar la longitud d'ona de 280 nm. Detector de fluorescència (Kontron SFM 25): E_x = 298 nm, E_m = 325 nm, sensibilitat: 625 V.
 - Integrador: Tractament de dades realitzat amb el PC Integration Pack (Kontron);
 - Càlcul: Mètode estàndard intern, la concentració de retinol o d' α -tocoferol es va donar en relació al pic de l'acetat corresponent en el cromatograma; Corba estàndard externa de l'acetat de retinol, retinol, α -tocoferol i acetat de tocoferol;
 - Estàndard: Acetat de retinol i acetat de tocoferol com a estàndards interns. Retinol, acetat de retinol, α -tocoferol i acetat de tocoferol com a estàndards externs. Per tal de preparar les solucions de treball es van diluir amb etanol: 200 vegades les solucions estàndards de retinol i acetat de retinol i 100 vegades les d' α -tocoferol i acetat de tocoferol.
 - Temps de retenció: De manera aproximada va ser:
1.7 min per al retinol; 2.6 min per a l'acetat de retinol; 6.9 min per a l' α -tocoferol i 10.4 min per a l'acetat de tocoferol;
 - Temps de duració del cromatograma: 12 min.
-

Segons el mètode de Catignani (Catignani GL *et al*, 1983) per al plasma i adaptat per a les lipoproteïnes:

1. Es van afegir a 100 μl de plasma o 200 μl de lipoproteïna, 50 μl dels estàndards acetat de retinol i acetat de tocoferol en un tub Eppendorf de plàstic. En aquesta solució etanòlica d'estàndards es va afegir una solució d'àcid ascòrbic (1 g/l) per tal d'evitar la destrucció del retinol i del tocoferol. Es va agitar vigorosament durant 10 s. En el cas de les lipoproteïnes va ser necessari afegir 100 μl d'etanol per tal de precipitar les proteïnes;
2. Es van afegir 100 μl d'hexà per al plasma i 200 μl per a les lipoproteïnes i es van posar al vòrtex de manera intermitent i vigorosa durant 45 s;
3. Es van centrifugar durant 5 min amb una centrífuga de tubs Eppendorf de sobretaula a 12500 rpm;
4. Es van transferir 75 μl per al plasma o 150 μl en el cas de les lipoproteïnes de la capa d'hexà a un altre tub de plàstic;
5. Es va evaporar a sequetat l'hexà sota un corrent de nitrogen;
6. Es va dissoldre el residu en 100 μl de metanol agitant posteriorment;
7. Es van injectar 50 μl de la solució en el cromatògraf.

El coeficient de variació intra-assaig va ser del 4.1% per al retinol i del 4.8% per a l' α -tocoferol. El coeficient de variació inter-assaig va ser 4.0% per al retinol i del 3.1% per a l' α -tocoferol.

4.4.8.- Estudis cel.lulars

Veurem els següents apartats:

- Estudi de l'efecte de les LDL en l'activitat del receptor depurador dels macròfags. Efectes en el desplaçament competitiu de $^{125}\text{I-Ox}_{24}$ -LDL control.
 - * *Obtenció dels macròfags.*
 - * *Obtenció de sèrum deficient en lipoproteïnes (LPDS).*
 - * *Oxidació de les LDL.*
 - * *Marcatge de les LDL oxidades amb ^{125}I .*
 - * *Activitat de receptor depurador dels macròfags.*
- Estudis de l'efusió de colesterol.
 - * *Obtenció de fibroblasts.*
 - * *Obtenció de macròfags.*
 - * *Marcatge del medi de cultiu amb ^3H -colesterol lliure.*
 - * *Marcatge de les cèl.lules amb colesterol lliure tritiat.*
 - * *Incubació de les cèl.lules amb HDL₃.*
 - * *Obtenció del medi i de les cèl.lules.*
 - * *Extracció del colesterol lliure.*

4.4.8.1.- Estudi de l'efecte de les LDL en l'activitat del receptor depurador dels macròfags. Efectes en el desplaçament competitiu de ^{125}I -Ox₂₄-LDL control.

Principi:

Estudi del reconeixement de les LDL pel receptor depurador dels macròfags, mitjançant estudis de competició entre les LDL obtingudes després de les dietes i unes LDL control oxidades marcades amb ^{125}I . Aquestes LDL oxidades i radioactives eren les mateixes per a cadascuna de les sèries d'experiments.

Solucions:

Detallades a cadascun dels subapartats.

4.4.8.1.1.- Obtenció dels macròfags

Principi:

Aïllament de cèl.lules perifèriques portadores de receptors depuradors, utilitzant un gradient de densitat que permet separar cèl.lules segons la seva grandària.

Solucions:

- Solució d'heparina sòdica (10 U/ml);
 - Ficoll Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden);
 - Solució PBS: 9 g Na₂HPO₄, 6 g NaH₂PO₄, 47 g NaCl en 5 l d'aigua destil.lada, pH 7.4;
 - Medi de cultiu RPMI 1640 (Gibco, UK) suplementat amb 100 U/ml de penicil.lina (Gibco, UK), 100 µg/ml d'estreptomicina (Gibco, UK), 200 mM de glutamina (Gibco, UK) enriquit en LPDS al 10%.
-

La metodologia és la següent:

1. Es va treballar amb una població de cèl.lules mononuclears de la sang de donants sans, pel què va ser necessari separar-les de la resta de cèl.lules

sanguínies. Es va seguir el mètode de Böyum (Boyüm A, 1964), basat en una separació per gradient de densitat.

- 1.1. Es van recollir 800 ml de sang amb heparina sòdica (10 U/ml).
- 1.2. Es van centrifugar a una velocitat de 800 x g (2500 rpm), a 4°C durant 30 min.
- 1.3. Es va agafar la capa de leucòcits i els eritròcits.
- 1.4. Es va diluir a la meitat amb medi de cultiu RPMI 1640 (Gibco, UK).
- 1.5. Es va dipositar la suspensió cel.lular en capa sobre el Ficoll Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). La proporció va ser de 3 volums de Ficoll i 7 volums de suspensió cel.lular.
- 1.6. Es va centrifugar a 800 x g, a 4°C i 30 min.
- 1.7. Amb una pipeta Pasteur i amb molta cura, es va aspirar la capa dels leucòcits mononuclears, intermèdia entre la capa inferior que conté els glòbuls rojos i la capa superior que conté el medi. Aquesta capa de cèl.lules mononuclears van ser en un 95-98% limfòcits.
- 1.8. Es van rentar les cèl.lules del Ficoll i de les plaquetes resuspenent-les amb PBS i es van centrifugar a 100 x g, 20°C i 10 min; es va repetir el rentat 3 vegades.
- 1.9. Finalment, es va resuspendre l'acúmul cel.lular amb 5 ml de medi de cultiu enriquit amb 10% de LPDS.
- 1.10. Es va agafar una alíquota per a fer un recompte de cèl.lules.
- 1.11. Es va ajustar la suspensió cel.lular a una concentració de $2 \cdot 10^6$ cèl.lules/ml, afegint medi RPMI 1640 amb antibiòtics.
- 1.12. Es van distribuir les cèl.lules en plaques de Petri de plàstic de 60 mm de diàmetre.
- 1.13. Es va fer una incubació de 24 h a 37°C i atmòsfera de 5% CO_2 (Haereus Corporation, Germany), per a aconseguir l'adherència dels monòcits-macròfags a la superfície de la placa.
- 1.14. El medi contenint els limfòcits va ser aspirat i eliminat.
- 1.15. La capa de cèl.lules de la superfície de la placa es va rentar diverses vegades per a purificar els monòcits-macròfags.

- 1.16. Després de 4-5 dies, aquestes cèl.lules ja van poder ser utilitzades per als experiments.

4.4.8.1.2.- Obtenció de sèrum deficient en lipoproteïnes (LPDS)

Principi:

Obtenció del sèrum deficient en lipoproteïnes (*Lipoprotein Deficient Serum*, LPDS) després d'aïllar totes les lipoproteïnes per ultracentrifugació seqüencial preparativa (Goldstein JL *et al*, 1983).

Solucions:

- Trombina (10 U/ml);
 - Sèrum fisiològic 0.15 M (0.9%);
 - Solució d'Na₂EDTA 0.01M a pH 7.4.
-

Es va seguir la següent metodologia:

1. Després d'haver separat per ultracentrifugació seqüencial preparativa fins a les HDL₃, es va haver de desfribinar el plasma per tal d'obtenir sèrum. Aquesta operació es va realitzar afegint trombina (10 U/ml) i deixant-la actuar tota la nit a 4°C. De totes maneres, sempre que es pugui s'ha d'utilitzar sèrum.
2. Al dia següent es va centrifugar a 18000 rpm, durant 2h a 4°C, per a sedimentar el quall de fibrina.
3. Les mostres es van dialitzar en sèrum fisiològic 0.15 M (0.9%) NaCl i 0.01 M Na₂EDTA a pH 7.4.
4. Es van ajustar les proteïnes a una concentració de 50 mg/ml i, posteriorment, es van esterilitzar a través d'un filtre Millex-GV de 0.45 µm.

4.4.8.1.3.- Oxidació de les LDL

Principi:

Modificació de les LDL per oxidació en posar-les en contacte amb una solució de Cu^{2+} en unes condicions fixades.

Solucions:

- Solució de diàlisi: 0.9% NaCl (43.9 g) i 0.01 M EDTA (2.0 g) en 5 l d' H_2O destil.lada a pH 7.4;
 - Solució de Cu^{2+} : 0.17 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 10 ml d' H_2O destil.lada;
 - Tampó d'oxidació: Es van diluir 0.5 ml (0.0085 g CuCl_2) de la solució de Cu^{2+} anterior en 5 l de PBS (9 g Na_2HPO_4 , 6 g NaH_2PO_4 , 47 g NaCl en 5 l d'aigua destil.lada), pH 7.4. Es va obtenir una concentració final de 10 μM en Cu^{2+} .
-

Les LDL es van oxidar *in vitro* amb Cu^{2+} durant 24 h, segons el mètode abans descrit. Aquesta lipoproteïna l'anomenarem Ox_{24} -LDL.

4.4.8.1.4.- Marcatge de les LDL oxidades amb ^{125}I

Principi:

Marcatge radioactiu dels residus de lisina de l'apolipoproteïna, el que permet la seva identificació. Es fa la hipòtesi que el comportament de l'apolipoproteïna és paral.lel al de la lipoproteïna.

Solucions:

- Tampó de glicina: Glicina 1 M, pH=9;
- Solució aquosa de NaIO_3 : 99 mg NaIO_3 en 2 ml H_2O ;
- Solució d' ICl : 150 mg NaI en 8 ml HCl 6 N;

Preparació: La solució aquosa de iodat sòdic (NaIO_3) es va injectar a pressió a la de l'iodur (NaI) per evitar la precipitació del iode. La barreja es va haver de diluir amb aigua fins a 40 ml. Per a treure el iode lliure es va haver de fer una extracció amb cloroform, de tal manera que es va obtenir una fase orgànica de color rosa mentre hi havia iode lliure. En

absència de color, es va airejar la fase aquosa durant una hora per tal d'eliminar les restes de cloroform. Després d'ajustar el volum a 45 ml, la solució va ser de 33 mM en I^+ i aproximadament 1N respecte al Cl^- . Es va haver de guardar a $4^\circ C$ en una botella fosca, durant un màxim de 3 mesos. Immediatament abans d'utilitzar el NaI es va diluir 1:16 amb aigua destil·lada;

- Solució de NaCl 0.15 M;
 - Solució de diàlisi: NaCl 0.15 M + Na_2EDTA 0.25 mM, a pH 7.4;
 - Solució ^{125}I Na: 10 mCi en 0.1 ml de NaOH 0.1 N (Amersham, UK);
 - Solució de Sephadex: 5 g de Sephadex G10 (Pharmacia, Sweden) en 25 ml de NaCl 0.15 M.
-

Les LDL aïllades d'un *pool* de plasma per ultracentrifugació seqüencial preparativa, rentades de l'albumina, concentrades i oxidades durant 24 h, com s'ha descrit anteriorment, i portades a una concentració de 2-4 mg/ml, es van marcar pel mètode del monoclòrid d'iode amb isòtop ^{125}I (^{125}I Na (Amersham, UK)), original de McFarlane (McFarlane AS, 1957) i modificat per Langer (Langer T *et al*, 1972).

La metodologia és la següent:

1. Es va barrejar 1 ml de LDL amb 200 μ l de tampó glicina i 1 μ l de ^{125}I .
2. Es va remenar bé i seguidament es van afegir, tot agitant al mateix temps, 200 μ l d' I Cl.
3. Es va fer passar per una columna de cromatografia, carregada prèviament amb Sephadex G10 (Pharmacia, Sueden). El Sephadex es va preparar amb 5 g en 25 ml de NaCl 0.15 M.
4. Es va eluir la columna amb solució salina fisiològica i es van recollir entre 1.5 i 2 ml de LDL marcada.
5. Per a eliminar l'iode lliure de la mostra es va dialitzar exhaustivament mitjançant 6 canvis de 5 l cadascun durant 24 h. Cal tenir en compte que més del 90% del iode lliure va quedar retingut en la columna.

-
6. Al finalitzar la diàlisi, es va esterilitzar per filtració amb filtres de 0.45 μm Millex-GV (Millipore, France).
 7. Tot el procediment es va fer prenent les màximes condicions de seguretat.
 8. La lipoproteïna marcada reunia tres condicions:
 - L'activitat específica (radioactivitat en cpm/ng de proteïna) va mostrar un valor comprès entre 200 i 600;
 - Més del 98% de l'activitat radioactiva va quedar unida a la proteïna;
 - Menys del 5% es trobava a la part lipídica de la lipoproteïna.Aquesta lipoproteïna marcada va conservar la seva activitat a 4°C un temps màxim de 2 setmanes.

A partir d'ara aquesta lipoproteïna oxidada i marcada l'anomenarem $^{125}\text{I-Ox}_{24}\text{-LDL}$ control.

4.4.8.1.5.- Activitat de receptor depurador dels macròfags

Principi:

Les $^{125}\text{I-Ox}_{24}$ -LDL control són reconegudes pel receptor depurador dels macròfags. La presència en el mateix medi d'altres LDL implica una competició pel mateix receptor, la qual cosa ens permet valorar el reconeixement de les LDL estudiades pel receptor depurador. L'activitat del receptor es mesura com la degradació de $^{125}\text{I-Ox}_{24}$ -LDL control, és a dir, la radioactivitat en el medi de cultiu.

Solucions:

- Medi de cultiu RPMI 1640: 10% Sèrum fetal de vedella), 1% penicil.lina (100 U/ml de medi de cultiu), 1% estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$ de medi de cultiu), 1% Amfotericina B (50 $\mu\text{g/ml}$ de medi de cultiu), 200 mM de glutamina (Gibco, UK);
 - Solució aquosa de àcid tricloroacètic (TCA) al 30% en pes;
 - NaOH 0.5 N;
 - Solucions del mètode de Lowry descrit anteriorment a l'apartat de composició química global.
-

L'activitat del receptor depurador dels macròfags es va determinar seguint el mètode descrit per Pitas (Pitas RE *et al*, 1979):

1. A cadascuna de les plaques amb els macròfags en medi de cultiu RPMI fresc, s'hi va addicionar $^{125}\text{I-Ox}_{24}$ -LDL control, a una concentració de 50 $\mu\text{g/ml}$.
2. Posteriorment s'hi van afegir 50 $\mu\text{g/ml}$ de les LDL aïllades de cadascun dels participants després de cada període de dieta.
3. Després de 5 h d'incubació de les cèl.lules a 37°C, es van separar aquestes cèl.lules del medi.
4. Els productes de degradació de la $^{125}\text{I-Ox}_{24}$ -LDL control es van mesurar en el medi de cultiu com la fracció soluble en TCA, que es pot extraure amb cloroform i en què la radioactivitat no es troba lligada al iode.

5. Es va rentar l'acúmulo de cèl.lules que es va dissoldre en NaOH 0.5 N, durant una nit a temperatura ambient.
6. Es va determinar el contingut en proteïnes a través del mètode descrit per Lowry.
7. Els resultats van ser expressats com:

ng lipoproteïna degradada/mg proteïna cel.lular/5 h

Els blancs van ser obtinguts a través de la incubació de cèl.lules sense lipoproteïna. Els càlculs van ser fets considerant que el 100% de l'activitat del receptor depurador corresponia als valors obtinguts amb $^{125}\text{I-Ox}_{24}\text{-LDL}$ sense afegir-hi altres lipoproteïnes.

Els resultats finals es van expressar com:

Percentatge de desplaçament de $^{125}\text{I-Ox}_{24}\text{-LDL}$ control del receptordepurador degut a la presència de la LDL nativa.

4.4.8.2.- Estudis de l'efusió de colesterol

Principi:

Valoració de la capacitat de sortida de colesterol de les cèl.lules en presència d'un acceptor extracel.lular. Utilització de fibroblasts, com a representants de les cèl.lules perifèriques o extrahepàtiques de fàcil obtenció i maneig, i de macròfags, com a cèl.lules més directament implicades en la placa d'ateroma.

Solucions:

Detallades a cada subapartat.

Per avaluar la capacitat de les HDL₃ per a induir la sortida del colesterol de les cèl.lules, aquestes es van marcar amb colesterol tritiat. Després de 5 dies, temps considerat suficient per a aconseguir la repartició del colesterol radiactiu entre els diferents compartiments intracel.lulars, es van incubar amb HDL₃. L'efusió es va avaluar com la relació entre la radioactivitat present en el medi que contenia les HDL₃ i la radioactivitat total considerada com la del medi més la de les cèl.lules (Bates SR *et al*, 1974).

4.4.8.2.1.- Obtenció de fibroblasts

Principi:

Obtenció de fibroblasts a partir de la pell de donants humans sans.

Solucions:

- Solució salina: Solució aquosa de NaCl al 9%;
 - Medi de cultiu RPMI 1640: 10% Sèrum fetal de vedella, 1% penicil.lina (100 U/ml de medi de cultiu), 1% estreptomycina (100 µg/ml de medi de cultiu), 1% Amfotericina B (50 µg/ml de medi de cultiu), 200 mM de glutamina (Gibco, UK);
 - Solució PBS (tampó fosfat): 8 g de NaCl, 2.5 g de Na₂HPO₄·2H₂O, 0.2 g de KH₂PO₄ en 1 l d'H₂O desionitzada i ajustada a pH 7.4;
 - Solució tripsina/EDTA: Tripsina 0.05% (Difco, USA) i Na₂EDTA 0.01% (50 mg/100 ml en solució salina de Puck (Sigma)).
-

La metodologia és la següent:

1. A partir d'una biòpsia de pell, recollida asèpticament en una solució salina, es va extreure la capa grassa que hi pogués romandre. Es va trossejar la biòpsia per obtenir explants (mostres de teixit de 1 mm²). Amb una pipeta pasteur de plàstic es va posar una gota de medi de cultiu sobre els explants, i es van incubar les plaques a 37°C i 5% CO₂ durant un mínim de 24 h, fins que els explants es van adherir a la superfície de la placa de Petri.

Posteriorment es van afegir 2 ml de medi de cultiu i es van incubar en les condicions prèvies.

2. Passats 7-10 dies, els fibroblasts es van adherir a la placa i van començar a proliferar; els explants necrosats es van retirar quan es van desenganxar de les plaques de Petri.
3. Es va canviar el medi de cultiu 3 cops per setmana fins que es va formar una monocapa de cèl.lules, aproximadament en unes 3 setmanes.
4. En aquell moment, les cèl.lules es van passar a flascons T-75 (o T-25, en funció de la quantitat necessària de cèl.lules). Aquesta transferència de cèl.lules és la que s'anomena "passatge" (generació). Quan les cèl.lules eren confluents, en unes 2 setmanes, es van passar a un altre flascó.
5. Per a la transferència, es va retirar el medi de cultiu i es va rentar dues vegades amb PBS. Després es va afegir Tripsina/EDTA per tal de desenganxar les cèl.lules del plàstic i es van incubar 10 min a 37°C.
6. Quan es va finalitzar la incubació es van afegir 2 ml de medi a la placa, seguidament es van recollir en un tub estèril i es van centrifugar a 100 x g, durant 10 min, a temperatura ambient.
7. Es va descartar el sobrenedant i es van resuspendre les cèl.lules en medi de cultiu.

Les cèl.lules van ser utilitzades a partir del cinquè passatge.

4.4.8.2.2.- Obtenció de macròfags

El procediment va ser el mateix que l'explicat a l'apartat anterior per a determinar el desplaçament de $^{125}\text{I-Ox}_{24}\text{-LDL}$ del receptor depurador dels macròfags.

4.4.8.2.3.- Marcatge del medi de cultiu amb [³H]-colesterol lliure

Solucions:

- Acetona;
 - [7(n)-³H]-colesterol (1μCi/μl) (Amersham, UK);
 - Sèrum fetal de vedella.
-

El marcatge es va fer segons el mètode descrit per Stein (Stein Y *et al*, 1975):

1. Es van barrejar en un tub de vidre 18 μl d'acetona i 7 μl de [7(n)-³H]-colesterol (1μCi/μl).
2. Aquests 25 μl es van afegir a 15 ml de sèrum fetal de vedella inactivat de l'acció de la LCAT (56°C, 30 min).
3. Es va esterilitzar la barreja amb un filtre de 0.45 μm i es va deixar incubar posteriorment a 37°C durant 1 nit.
4. La concentració final de [³H]-colesterol lliure va ser de 5-8 μCi/mmol colesterol.

4.4.8.2.4.- Marcatge de les cèl.lules amb colesterol lliure tritiat

Principi:

Càrrega de les cèl.lules amb colesterol lliure radioactiu.

Solucions:

- Solució PBS (tampó fosfat): 8 g de NaCl, 2.5 g de Na₂HPO₄·2H₂O, 0.2 g de KH₂PO₄ en 1 l d'H₂O desionitzada i ajustada a pH 7.4;
 - Medi de cultiu RPMI 1640 marcat amb colesterol lliure tritiat, especificat a l'apartat següent.
-

El marcatge de les cèl.lules es va fer segons el mètode descrit per Stein (Stein Y *et al*, 1975) i modificat a partir dels treballs recents de Rothblat (Rothblat GH *et al*, 1992), previ marcatge del medi de cultiu com s'indica a l'apartat anterior.

El procediment va ser igual tant per a marcar fibroblasts com per als macròfags.

1. Es va eliminar el medi de cultiu de les plaques de Petri i es van rentar tres vegades amb solució PBS.
2. Es van afegir 5 ml de medi de cultiu marcat amb [³H]-colesterol lliure (5-8 μCi/mmol colesterol).
3. Es van incubar durant 5 dies a 37°C amb 5% de CO₂.

4.4.8.2.5.- Incubació de les cèl.lules amb HDL₃

Principi:

Sortida de colesterol lliure tritiat provinent de les cèl.lules, provocada per la presència d'un acceptor extracel.lular de colesterol, com les HDL₃.

Solucions:

- Solució PBS (tampó fosfat): 8 g de NaCl, 2.5 g de Na₂HPO₄.2H₂O, 0.2 g de KH₂PO₄ en 1 l d'H₂O desionitzada i ajustada a pH 7.4;
- Solució de Lowry descrita a l'apartat sobre la composició química global;
- Medi de cultiu RPMI 1640 amb antibiòtics i albúmina en comptes de sèrum fetal de vedella.

El mètode descrit a continuació correspon a una adaptació de la tècnica de Stein (Stein Y *et al*, 1975) tal com figura en treballs d'Esteva (Esteva O *et al*, 1986).

1. Es va separar el medi marcat i les cèl.lules. Aquestes cèl.lules es van rentar tres vegades amb PBS.
2. Les HDL₃ van ser inactivades de l'acció de la LCAT i es van incubar a 56°C durant 30 min i després es van dialitzar.

3. Les HDL₃ es van filtrar amb un filtre Millex-GV 0.22 μm i es va realitzar la determinació de les proteïnes en una mostra de 20 μl .
4. Es van afegir 50 μg proteïna de HDL₃ per ml de medi de cultiu.
5. En cada flascó es va arribar a un volum total de 2 ml amb medi de cultiu que contenia albúmina en comptes de sèrum fetal de vedella.
6. Els flascons es van incubar a 37°C durant 24 h amb 5% de CO₂.

4.4.8.2.6.- Obtenció del medi i de les cèl.lules

Principi:

Separació del medi que contenia les cèl.lules per tal de determinar el colesterol radioactiu present en cadascun d'ells.

Solucions:

- Solució Tris: 12.1 g en 100 ml de sèrum fisiològic;
 - Solució Tris/albúmina bovina (0.02%): 2 g d'albúmina bovina en 1 l de solució Tris;
 - Solució de tripsina descrita a l'apartat d'obtenció de fibroblasts dins d'aquest mateix mètode;
 - Medi de cultiu RPMI 1640 amb antibiòtics i sèrum fetal de vedella al 10%;
 - NaOH 0.2N.
-

Es va seguir la següent metodologia:

1. Es va aspirar el medi i es va guardar a 4°C, fins a l'extracció de la radioactivitat.
2. Per a obtenir les cèl.lules, es van rentar les plaques de Petri dues vegades amb solució Tris.

3. Seguidament es van rentar tres vegades amb Tris/albúmina bovina, deixant el tercer rentat durant 10 min.
4. Posteriorment, però, encara es van rentar dues vegades més amb Tris.
5. Es van afegir 2 ml de tripsina en cada flascó i es van incubar a 37°C durant 10 min. Es va tenir precaució amb l'activitat de la tripsina, doncs si hagués estat menys activa hauria calgut més temps d'incubació per tal d'eliminar les cèl.lules del flascó i poder-les recollir.
6. Es van recollir les cèl.lules i es van rentar els flascons amb 2 ml de medi de cultiu amb sèrum fetal de vedella (10%). Es va posar tot aquest contingut en el mateix tub.
7. Es van centrifugar a 800 x g a 4°C durant 4 min.
8. Es va rentar l'acúmulo de cèl.lules amb 4 ml de solució de Tris i es va centrifugar a 800 x g a 4°C durant 4 min.
9. L'acúmulo cel.lular es va dissoldre amb 2 cm³ de NaOH 0.2N, a temperatura ambient durant tota una nit.
10. L'endemà es va utilitzar aquesta dissolució per a fer l'extracció del colesterol radioactiu i per a determinar les proteïnes cel.lulars.

4.4.8.2.7.- Extracció del colesterol lliure

Principi:

Separació dels lípids i les proteïnes.

Solucions:

- Solució de Dole: Alcohol isopropílic/heptà/H₂SO₄ 1N (40/10/1; v/v/v);
 - Heptà.
-

Es va realitzar l'extracció de la radioactivitat del medi de cultiu i de les cèl.lules.

1. Es va posar 1 ml de medi o de les cèl.lules en tubs de vidre de 20 ml als quals es va afegir 5 ml de solució de Dole (Dole VP, 1955).

2. Es va barrejar el contingut durant 1 min amb vòrtex i es va deixar reposar posteriorment durant 10 min a temperatura ambient.
3. Es van afegir 2 ml d'heptà i es va barrejar la mescla amb vòrtex 1 min més.
4. Es van afegir 3 ml d'aigua destil.lada i es va tornar a barrejar un altre minut.
5. Es va aïllar la fase superior (fase aquosa) i es va transferir a un altre tub de vidre.
6. Es va barrejar 1 ml de la fase aquosa amb 10 ml de líquid de centelleig en un vial per aquest fi i es va mesurar la radioactivitat en un comptador β .

Els resultats es van expressar com:

$\frac{\text{radioactivitat del medi (cpm)} \times 100}{\text{radioactivitat total (medi + cèl.lules (cpm))}$

Els blancs van ser cèl.lules incubades sense lipoproteïnes i els seus valors es van restar dels valors obtinguts en presència de HDL₃. L'estàndard va formar-se amb apolipoproteïnes de HDL i fosfolípids. El coeficient de variació inter-assaig va ser inferior al 3.5%.

4.5.- Anàlisi estadística

Els resultats es donen com a mitjana \pm ES (error estàndard de la mitjana).

El mètode estadístic que hem utilitzat en el nostre treball per tal de posar de manifest les diferències significatives que recolzen les nostres hipòtesis consisteix en un estudi creuat (*cross-over*) 2 x 2. El disseny 2 x 2, que s'aplica a estudis clínics i altres tipus d'experiments, es pot representar per:

		Període	
		1	2
Seqüència (grup individus)	1	A	B
	2	B	A

a on A i B representen els dos tractaments que s'apliquen, en seqüències distintes, a cadascun dels dos grups. L'elecció d'aquests grups es realitza adscribint, a l'atzar, a cadascun dels individus a una de les dues seqüències, fins a la formació de dos grups d'igual nombre d'individus. Així, els subjectes corresponents a la primera seqüència reben el tractament A en el primer període de temps i després el tractament B en el segon període de temps. Pel contrari, els individus adscrits a la segona seqüència reben els tractaments en l'ordre invers, és a dir, B en el primer període de tractament i A en el segon període de tractament. En definitiva, cada individu actua com el seu propi control: l'individu rep dos tractaments A i B, successivament i en un ordre a l'atzar.

L'anàlisi estadística inclou tests *t* per a la comparació de canvis en resposta a la dieta i a la seqüència concreta (Ratkowsky DA. *et al*, 1993). L'aplicació concreta en el nostre cas d'aquest mètode estadístic consisteix en un estudi creuat 2 x 2 en què els tractaments són dues dietes, una rica en àcid oleic i l'altra rica en àcid linoleic. A més, les seqüències amb les dues dietes esmentades inclouen un període previ amb una dieta d'estabilització i un període d'eliminació dels efectes de la dieta precedent (període de rentat o de *wash-out*). Per als individus que van començar amb la dieta

rica en àcid oleic (O) en el període 1 i que van canviar a la dieta rica en àcid linoleic (L) en el període 2, D_{OL} mesura el canvi en la resposta del període 1 al període 2. Aquest valor inclou una mesura de la diferència de l'efecte dels dos olis independentment de la seqüència, més la tendència del temps independentment de les dietes. De manera semblant, D_{LO} representa el canvi en la resposta dels individus en el grup 2 que van seguir el mateix procediment però en ordre invers. La hipòtesi d'igualtat en l'eficàcia de les dues dietes va ser avaluada a través d'un test t en què es comparaven les dues mitjanes, D_{OL} i D_{LO} . La suma de D_{OL} i D_{LO} i el seu error estàndard eren utilitzats per avaluar l'existència d'un efecte de la seqüència. El mètode, tanmateix, calcula la interacció entre les dues dietes i seqüències. En el cas que aquesta interacció entre la dieta i la seqüència fos significativa, donat que l'efecte de la dieta estaria lligat a la seqüència en què s'hagués donat aquella, no seria possible analitzar aquesta variable aplicant les tècniques d'un estudi creuat 2×2 . De totes maneres, hi ha algun autor (Everitt BS, 1989) que suggereix, en cas d'interacció significativa entre la dieta i la seqüència, utilitzar els valors que corresponen a la primera fase o període de l'estudi.

Per altre costat, amb l'ajut del paquet estadístic SPSS/PC+ (Norusis MJ, 1986), vam calcular el grau de dependència entre dues variables mitjançant el coeficient de correlació de Spearman degut al petit nombre d'individus de la mostra.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE LA DIETA EN L'OXIDACIÓ, ELS ANTIOXIDANTS I EL COMPORTAMENT METABÒLIC DE LES LIPOPROTEINES

Maria Teresa Bargalló Escrivà

ISBN:978-84-691-1877-1/DL: T-340-2008

RESULTATS

5.1.- Dietes

En els dos períodes d'intervenció els greixos aportaven un 38% del total calòric, tal com es mostra en la *Taula 23*. En la dieta rica en àcid oleic, els àcids grassos monoinsaturats eren un 9.3% més elevats que en la dieta rica en àcid linoleic; per altra banda, els àcids grassos poliinsaturats eren un 8.2% més alts en la dieta rica en àcid linoleic que en la dieta rica en àcid oleic. Els àcids grassos saturats eren un 1.1% més alts en la dieta rica en àcid oleic que en la rica en àcid linoleic.

El consum de colesterol estava comprés entre 350 i 400 mg/dia.

Com era d'esperar, donat que la dieta era isocalòrica, no s'observaren canvis significatius en el pes dels individus.

5.2.- Lípids, lipoproteïnes i apolipoproteïnes del plasma

La *Taula 24* mostra la mitjana (\pm ES) dels valors plasmàtics dels lípids, lipoproteïnes i apolipoproteïnes basals i al final dels períodes d'intervenció dietètica. En elles s'observen que no hi havia diferències significatives entre els valors basals i els finals dels lípids, lipoproteïnes i apolipoproteïnes. A més a més, quan es valoren els resultats dels nivells de colesterol total, de colesterol LDL, de colesterol HDL total, de colesterol de les subfraccions HDL₂ i HDL₃ i els triglicèrids, no s'observen diferències significatives després de les dues dietes. Les concentracions de fosfolípids eren 6.0% (\pm 0.8) ($p < 0.01$) més elevades en la dieta rica en àcid oleic que en la dieta rica en àcid linoleic.

Els nivells d'apolipoproteïna B tampoc eren diferents entre les dues dietes, però les concentracions d'apolipoproteïnes A-I i A-II eren un 4.0% (\pm 0.5) i 4.6% (\pm 0.5) ($p < 0.05$, en els dos casos) més altes després de la dieta rica en àcid oleic.

5.3.- Composició en lípids, proteïnes i apolipoproteïnes de les LDL i de les HDL₃

Les *Taules 25 i 26* presenten els percentatges dels lípids i apolipoproteïnes de les LDL i de les HDL₃. Els resultats mostren que no s'observen diferències significatives.

5.4.- Composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL₃

La *Taula 27* mostra la composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL₃ després de les dues dietes. Les lipoproteïnes aïllades després de la dieta rica en àcid oleic tenien un 5.2% més alt aquest àcid gras que les HDL₃ obtingudes després de la dieta rica en àcid linoleic ($p < 0.01$). Per altra part, les HDL₃ aïllades després de la dieta rica en àcid linoleic mostraven un 5.2% més d'aquest àcid gras en relació a les lipoproteïnes obtingudes després de la dieta rica en àcid oleic ($p < 0.01$). Així mateix, les HDL₃ aïllades després de la dieta rica en àcid oleic mostraven elevacions significatives de l'àcid linolènic, de l'àcid dihomo- γ -linolènic, de l'àcid eicosapentanoic i una reducció significativa de l'àcid esteàric, però cap d'elles superava el 0.5%, si ho comparem amb la dieta rica en àcid linoleic.

5.5.- Fluïdesa de les LDL i HDL₃

Els valors de l'anisotropia de fluorescència (r) de les LDL i de les HDL₃, tant a 24°C com a 37°C, es mostren a les *Taules 28 i 29*, respectivament. Les mesures per a les LDL i les HDL₃ aïllades després d'ambdues dietes són iguals.

5.6.- Concentració de les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric de les HDL₃ natives

La *Taula 30* i la *Figura 18* presenta els valors de les mitjanes (\pm ES) de les TBARS de les HDL₃ natives obtingudes després de les dues dietes amb uns valors per a la dieta rica en àcid oleic de 0.24 (\pm 0.02) nmol MDA/mg proteïna HDL₃ i per a la dieta rica en àcid linoleic de 0.42 (\pm 0.08) nmol MDA/mg proteïna HDL₃ ($p < 0.01$).

5.7.- Susceptibilitat a l'oxidació de les LDL i de les HDL₃

La *Taula 31* mostra les mitjanes (\pm ES) de les concentracions de les TBARS de les LDL incubades amb Cu²⁺ durant 24 hores. S'aprecia que les LDL obtingudes després de la dieta rica en àcid oleic tenen els valors significativament menors que les lipoproteïnes obtingudes amb la dieta rica en àcid linoleic: 1.88 (\pm 0.13) i 2.38 (\pm 0.15) nmol MDA/mg proteïna LDL, respectivament ($p < 0.01$).

En la *Taula 32* i la *Figura 18* s'observa, igualment que per a les LDL, que les HDL₃ aïllades després de la dieta rica en àcid oleic, quan s'incuben amb Cu²⁺, tenen una mitjana (\pm ES) de les concentracions de TBARS més baixes que les HDL₃ obtingudes amb la dieta rica en àcid linoleic: 0.75 (\pm 0.06) i 0.95 (\pm 0.07) nmol MDA/mg proteïna HDL₃, respectivament ($p < 0.01$).

5.8.- Nivells de α -tocoferol, β -+ γ -tocoferol i retinol en plasma, LDL i HDL₃

La *Taula 33* dona les concentracions de α -tocoferol i retinol per al plasma, LDL i HDL₃. Al mateix temps també dona el percentatge d'isòmers β - i γ - que coelueixen, expressats com a percentatge del pic corresponent a l' α -tocoferol. Quan es compara la dieta rica en àcid oleic amb la dieta rica en àcid linoleic no s'observa cap

diferència. Cal subratllar, de totes maneres, que no s'ha pogut aplicar el test de disseny creuat al retinol de les HDL₃ perquè dóna una interacció dieta-seqüència significativa. Per això prendrem en consideració, per a comparar, els valors que corresponen al primer període, tal com proposa Everitt (Everitt BS, 1989).

5.9.- Correlacions observades entre la composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL₃ i les concentracions de peroxidació lipídica de les HDL₃ natives

Quan es valoren les HDL₃ obtingudes després de les dues dietes, observem que les concentracions de les TBARS de les HDL₃ natives es correlacionen de forma inversa tant amb el contingut en àcid oleic com en el quocient àcid oleic/àcid linoleic dels fosfolípids d'aquestes mateixes lipoproteïnes ($r = -0.436$, $p < 0.05$; $r = -0.471$, $p < 0.05$, respectivament).

5.10.- Efectes de les LDL en l'activitat del receptor depurador dels macròfags. Estudis de desplaçament de ¹²⁵I-Ox₂₄-LDL control

La *Figura 19* mostra la mitjana (\pm ES) del percentatge de desplaçament de les ¹²⁵I-Ox₂₄-LDL control del receptor depurador. La incubació de les LDL de cadascun dels individus després de les dues dietes mostrava un desplaçament similar, 26% (± 4), de les ¹²⁵I-Ox₂₄-LDL del receptor depurador de macròfags humans control.

5.11.- Efectes de les HDL₃ en l'efusió de colesterol dels fibroblasts i dels macròfags

La *Taula 34* i la *Figura 20* mostra la mitjana (\pm ES) de l'efusió de [³H]-colesterol lliure dels fibroblasts, produït per la presència de HDL₃ en el medi de cultiu. Les mitjanes (\pm ES) de l'efusió provocada per les HDL₃, obtingudes de cada participant després de les dues dietes, eren similars i d'un 26.5% (\pm 3.1%).

La *Taula 35* i la *Figura 20* dona les mitjanes (\pm ES) de l'efusió de [³H]-colesterol lliure dels macròfags provocat per les HDL₃ aïllades després de les dues dietes. Com observem, els resultats són semblants, d'un 29% (\pm 5%). Per tant, aquestes HDL₃ provoquen una efusió de colesterol lliure similar tant en fibroblasts com en macròfags.

Taula 21.- Característiques de la població estudiada

Individus	Edat (anys)	Index massa corporal (kg/m ²)				Dieta	Seqüència	Dieta ns	Seqüència
		Basal	Final	Basal	Final				
22	53.7 ± 3.16	Linoleic		Oleic		p	p	p	ns
		Basal	Final	Basal	Final				
		22.6 ± 0.7	22.8 ± 0.7	22.7 ± 0.7	22.9 ± 0.7	ns	ns	ns	ns

Els resultats s'expressen com mitjana ± ES.

Taula 22.- Composició dels olis

Àcids grassos	Oli d'oliva	Oli de gira-sol ric en àcid oleic	Oli de gira-sol ric en àcid linoleic
C16:0	10.0	2.0	7.0
C18:0	2.5	2.0	5.0
C18:1,n-9	78.9	86.0	19.0
C18:2,n-6	5.8	8.0	67.0
C18:3,n-3	0.6	0.2	0.2
C20:0	0.4	0.5	0.4
C22:0	0.1	1.0	0.9
C24:0	0.6	--	0.2

Els resultats s'expressen com percentatge del pes.

Taula 23.- Composició de la dieta

	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Període 1	Període 2	p	p	p
Energia (kcal/dia)	2391.1 ± 116.1	2442.3 ± 108.5	ns	ns	ns
Proteïnes (%)	14.5 ± 0.4	14.4 ± 0.4	ns	ns	ns
Greixos (%)	37.0 ± 1.1	38.9 ± 1.2	ns	ns	ns
Dieta rica en àcid linoleic			ns	ns	ns
AGPI	14.3 ± 0.8	14.6 ± 0.8	ns	ns	ns
AGMI	8.7 ± 0.2	9.1 ± 0.3	ns	ns	ns
AGS	11.4 ± 0.3	12.5 ± 0.8			
Dieta rica en àcid oleic			ns	ns	ns
AGPI	6.5 ± 0.3*	6.1 ± 0.3*	ns	ns	ns
AGMI	17.6 ± 0.8†	18.9 ± 0.7†	ns	ns	ns
AGS	10.4 ± 0.2	11.4 ± 0.8			
Hidrats de carboni (%)	48.5 ± 1.1	46.6 ± 1.1	ns	ns	ns
Colesterol (mg)	361.6 ± 21.7	386.5 ± 16.1	ns	ns	ns

Els resultats s'expressen com mitjana ± ES. AGPI: àcids grassos poliinsaturats; AGMI: àcids grassos monoinsaturats; AGS: àcids grassos saturats.

**: els àcids grassos poliinsaturats de la dieta rica en àcid oleic eren diferents dels obtinguts en la dieta rica en àcid linoleic (p < 0.05).*

†: els àcids grassos monoinsaturats de la dieta rica en àcid oleic eren diferents dels obtinguts en la dieta rica en àcid linoleic (p < 0.05).

Taula 24.- Lípids, lipoproteïnes i apolipoproteïnes del plasma basals i al final dels períodes d'intervenció dietètica

(mg/dl)	Basals		Dieta		Dieta vs Seqüència	
	Linoleic	Oleic	p	Seqüència	p	P
Colesterol total	176.0 ± 4.7	176.3 ± 4.5	182.6 ± 5.0	ns	ns	ns
Colesterol lliure	48.4 ± 1.3	48.6 ± 1.6	50.6 ± 1.7	ns	0.0001	ns
Colesterol esterificat	127.6 ± 3.5	127.6 ± 3.2	132.1 ± 3.7	ns	ns	ns
Colesterol LDL	110.2 ± 4.6	113.5 ± 4.5	117.0 ± 4.2	ns	0.05	ns
Colesterol HDL	53.9 ± 3.1	52.0 ± 3.0	52.3 ± 3.0	ns	ns	ns
Colesterol HDL₂	14.6 ± 1.1	12.9 ± 0.7	12.5 ± 1.1	ns	0.0001	ns
Colesterol HDL₃	39.4 ± 2.3	39.1 ± 2.4	39.8 ± 2.2	ns	0.0001	ns
Triglicèrids	59.5 ± 3.1	59.0 ± 6.3	67.0 ± 7.0	ns	0.01	ns
Fosfolípids	193.6 ± 5.9	192.9 ± 5.6	204.5 ± 6.0	0.01	ns	ns
Apolipoproteïna A-I	118.2 ± 3.7	142.2 ± 4.0	147.5 ± 4.1	0.05	ns	ns
Apolipoproteïna A-II	26.9 ± 1.0	30.7 ± 0.8	32.1 ± 0.7	0.05	0.001	ns
Apolipoproteïna B	67.0 ± 2.7	67.5 ± 4.3	72.2 ± 4.4	ns	0.001	ns

Els resultats s'expressen com mitjana ± ES.

La valoració estadística mostra la comparació dels resultats al final de les dues dietes.

No es van mostrar diferències entre les concentracions basals i al final de les dues dietes, excepte per l'apolipoproteïna A-I.

Taula 25.- Composició en lípids i proteïnes de les LDL

(%)	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
Colesterol total	41.30 ± 3.66	40.72 ± 2.93	ns	0.0001	ns
Colesterol lliure	13.73 ± 0.86	12.86 ± 1.50	ns	ns	ns
Colesterol esterificat	27.57 ± 3.20	27.85 ± 2.71	ns	0.0001	ns
Triglicèrids	5.63 ± 0.92	5.86 ± 0.92	ns	0.0001	ns
Fosfolípids	23.60 ± 1.98	23.84 ± 2.25	ns	0.0001	ns
Proteïnes	29.48 ± 2.54	29.59 ± 1.88	ns	ns	ns
Apolipoproteïna B	26.62 ± 2.03	26.93 ± 2.90	ns	ns	ns

Els resultats s'expressen com percentatge de la massa total de la lipoproteïna (mitjana ± ES).

Taula 26.- Composició en lípids i proteïnes de les HDL₃

(%)	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
Colesterol total	11.62 ± 1.69	11.20 ± 1.56	ns	ns	ns
Colesterol lliure	1.72 ± 0.31	1.73 ± 0.31	ns	ns	ns
Colesterol esterificat	9.92 ± 1.41	9.47 ± 1.31	ns	ns	ns
Triglicèrids	2.28 ± 0.67	2.33 ± 0.54	ns	ns	ns
Fosfolípids	18.74 ± 2.36	18.81 ± 2.02	ns	ns	ns
Proteïnes	67.36 ± 3.88	67.65 ± 3.50	ns	ns	ns
Apolipoproteïna A-I	42.71 ± 2.10	42.21 ± 2.30	ns	ns	ns

Els resultats s'expressen com percentatge de la massa total de la lipoproteïna (mitjana ± ES).

Taula 27.- Composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL₃

%	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
C14:0	0.37 ± 0.09	0.39 ± 0.14	ns	ns	ns
C16:0	25.51 ± 0.99	25.13 ± 1.32	ns	ns	ns
C16:1,n-9	0.31 ± 0.11	0.35 ± 0.11	ns	ns	ns
C18:0	13.21 ± 0.71	12.64 ± 0.94	0.01	ns	ns
C18:1,n-9	8.25 ± 1.20	13.48 ± 2.22	0.01	ns	ns
C18:2,n-6	29.35 ± 3.97	24.11 ± 2.38	0.01	ns	ns
C18:3,n-3	0.14 ± 0.06	0.23 ± 0.12	ns	ns	ns
C20:0	0.37 ± 0.05	0.37 ± 0.04	ns	ns	ns
C20:3,n-6	2.46 ± 1.03	2.77 ± 0.82	ns	ns	ns
C20:4,n-6	9.26 ± 2.03	9.38 ± 1.77	ns	ns	ns
C20:5,n-3	0.60 ± 0.19	0.82 ± 0.26	ns	ns	ns
C22:0	1.04 ± 0.20	0.98 ± 0.16	ns	ns	ns
C22:5,n-3	0.90 ± 0.18	0.90 ± 0.15	ns	ns	ns
C22:6,n-3	4.54 ± 1.24	4.62 ± 1.23	ns	ns	ns
C24:0	1.15 ± 0.13	1.12 ± 0.12	ns	ns	ns
C24:1,n-9	1.11 ± 0.17	1.23 ± 0.18	0.05	ns	ns

Els resultats s'expressen com percentatge del pes del total d'àcids grassos metilats (mitjana ± ES).

Taula 28.- Fluïdesa de les LDL

	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
r 24°C	0.2771 ± 0.0071	0.2745 ± 0.0078	ns	0.001	ns
r 37°C	0.2215 ± 0.0079	0.2209 ± 0.0072	ns	0.050	ns

Els valors de r són obtinguts en presència de la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatriè (DPH).

Taula 29.- Fluïdesa de les HDL₃

	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
r 24°C	0.2465 ± 0.0067	0.2400 ± 0.0092	ns	ns	ns
r 37°C	0.1951 ± 0.0064	0.1937 ± 0.0100	ns	ns	ns

Els valors de r són obtinguts en presència de la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatriè (DPH).

Taula 30.- Peroxidació lipídica de les HDL₃ natives

(nmol MDA/mg proteïna HDL ₃)	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
HDL₃ natives	0.42 ± 0.08	0.24 ± 0.02	0.01	0.05	ns

Els resultats donen les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (TBARS) i s'expressen com nmol MDA/mg proteïna HDL₃ (mitjana ± ES).

Taula 31.- Susceptibilitat a l'oxidació de les LDL

(nmol MDA/mg proteïna LDL)	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
LDL	2.38 ± 0.15	1.88 ± 0.13	0.01	0.01	ns

Els resultats donen les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (TBARS) i s'expressen com nmol MDA/mg proteïna LDL (mitjana ± ES). Les determinacions s'han realitzat després d'incubar les LDL en una solució de Cu²⁺ 10 µM, a 37°C durant 24 hores.

Taula 32.- Susceptibilitat a l'oxidació de les HDL₃

(nmol MDA/mg proteïna HDL ₃)	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
HDL₃	0.95 ± 0.07	0.75 ± 0.06	0.01	0.01	ns

Els resultats donen les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (TBARS) i s'expressen com nmol MDA/mg proteïna HDL₃ (mitjana ± ES). Les determinacions s'han realitzat després d'incubar les HDL₃ en una solució de Cu²⁺ 10 µM, a 37°C durant 24 hores.

**Taula 33.- Concentracions d' α -tocoferol, β - i γ -tocoferol i retinol en plasma,
 LDL i HDL₃**

	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
Plasma					
α -tocoferol	9.46 \pm 1.63	9.58 \pm 1.52	ns	0.05	ns
β -+ γ -tocoferol	4.15 \pm 0.62	3.54 \pm 0.56	ns	0.05	ns
retinol	369.78 \pm 12.03	408.23 \pm 20.53	ns	0.05	ns
LDL					
α -tocoferol	3.86 \pm 0.40	4.50 \pm 0.36	ns	0.05	ns
β -+ γ -tocoferol	4.54 \pm 1.52	3.68 \pm 0.60	ns	0.05	ns
retinol	128.90 \pm 7.62	127.91 \pm 11.35	ns	0.05	ns
HDL₃					
α -tocoferol	1.75 \pm 0.59	1.79 \pm 0.71	ns	0.05	ns
β -+ γ -tocoferol	4.23 \pm 1.67	3.64 \pm 1.23	ns	0.05	ns
retinol	154.10 \pm 5.09	185.87 \pm 4.52	ns	0.05	0.01*

*Els resultats s'expressen com mitjana \pm SE; les concentracions dels diversos isòmers de tocoferol venen donades en μ g/ml i les de retinol en μ g/l. * : Anàlisi de disseny creuat no aplicable.*

Taula 34.- Efectes de les HDL₃ en l'efusió de [³H]colesterol lliure dels fibroblasts

	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
HDL₃	26.3 ± 0.7	26.6 ± 0.5	ns	ns	ns

Els resultats s'expressen com mitjana ± ES.

Taula 35.- Efectes de les HDL₃ en l'efusió de [³H]colesterol lliure dels macròfags

	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
HDL₃	30.3 ± 0.6	29.5 ± 0.4	ns	ns	ns

Els resultats s'expressen com mitjana ± ES.

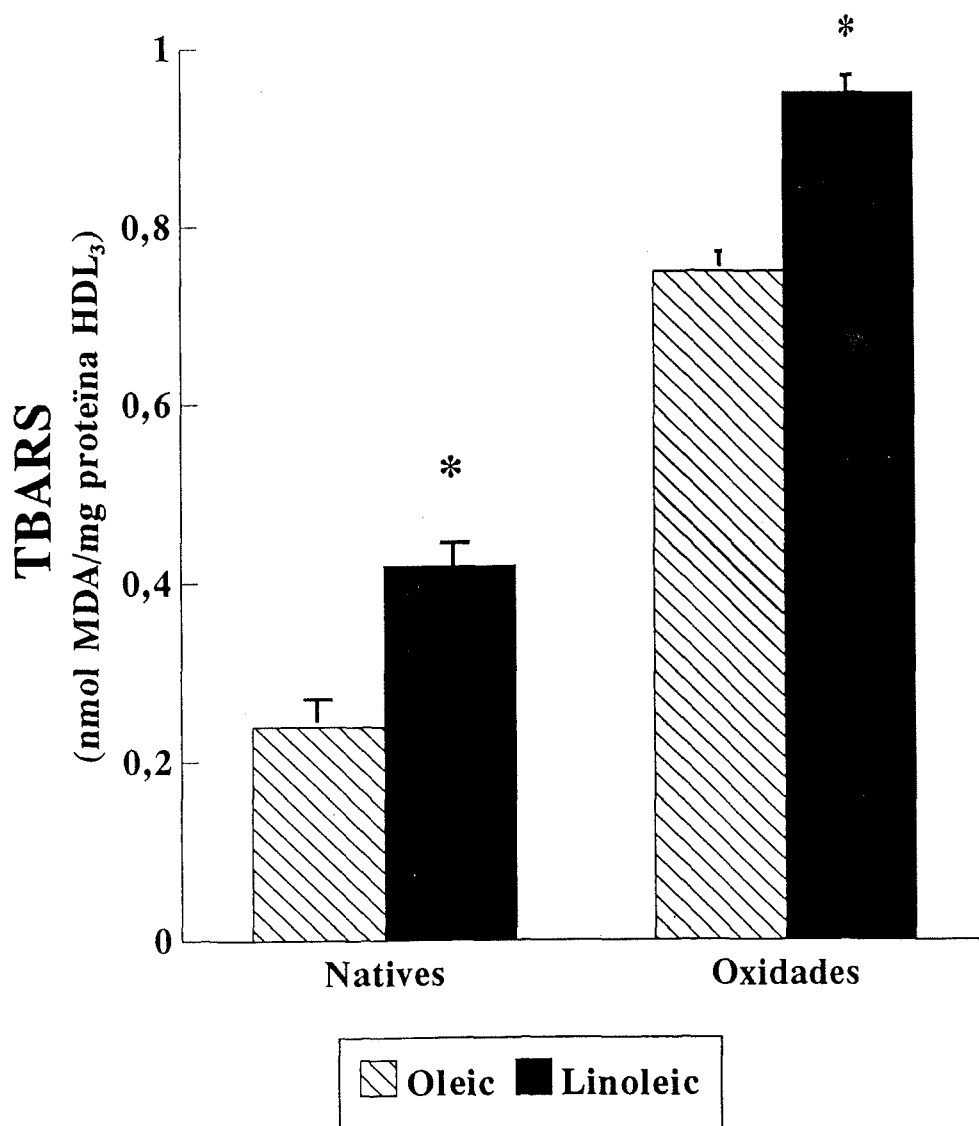


Figura 18.- El gràfic mostra els resultats de la peroxidació lipídica de les HDL₃ natives aïllades després de les dues dietes. La susceptibilitat a l'oxidació de les HDL₃ s'ha realitzat amb una incubació amb Cu²⁺ 10 µM, a 37°C durant 24 h.

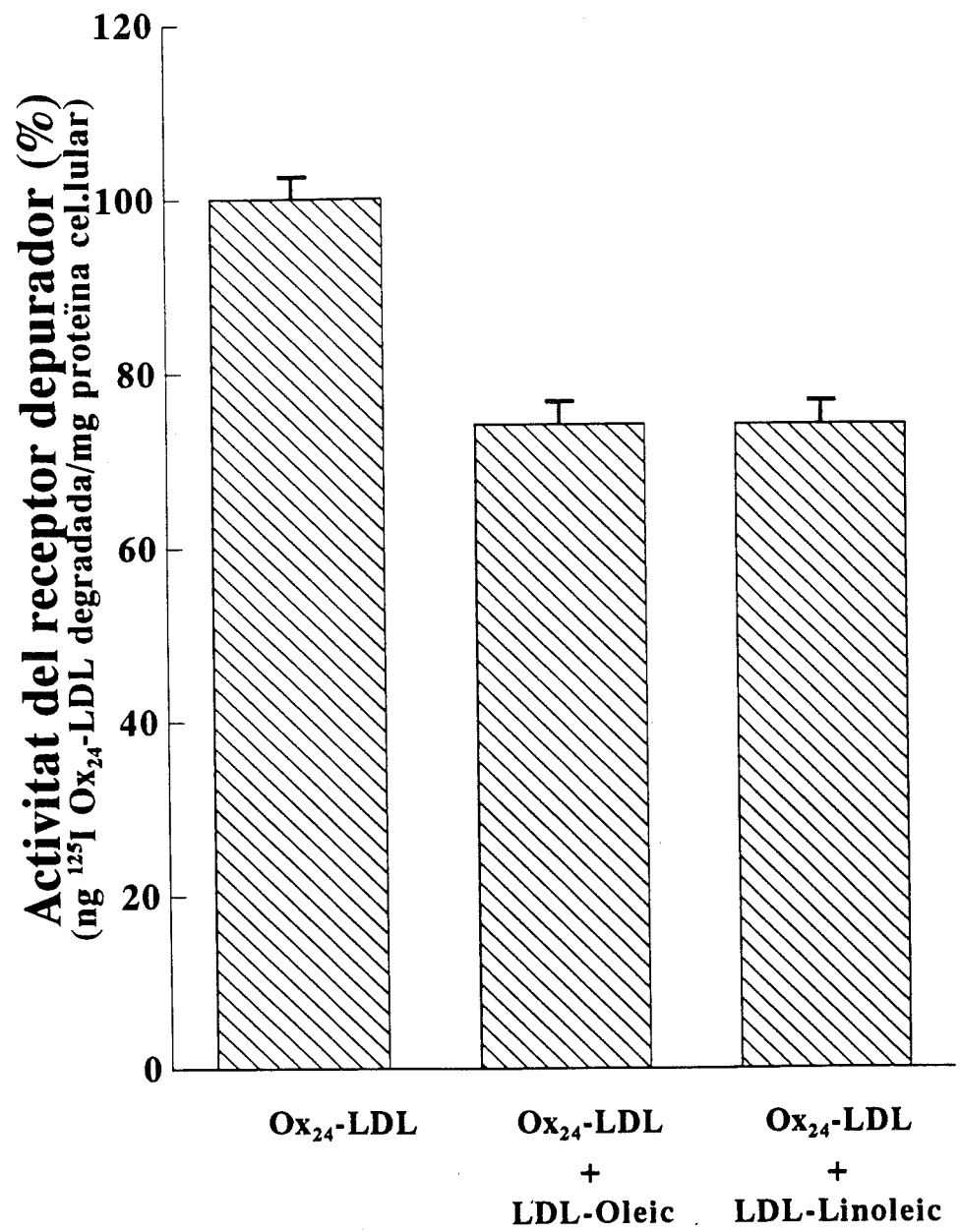


Figura 19.- La degradació de la ¹²⁵I-Ox₂₄-LDL control es considera el 100% de l'activitat del receptor depurador dels macròfags. Quan s'incuba aquesta LDL oxidada conjuntament amb les LDL obtingudes després de la dieta rica en àcid oleic o en àcid linoleic es donen variacions de la degradació de la ¹²⁵I-Ox₂₄-LDL control. Aquestes variacions es valoren com el desplaçament de les LDL oxidades del receptor depurador degut al reconeixement per part d'aquest receptor de les LDL aïllades després de les dues dietes.

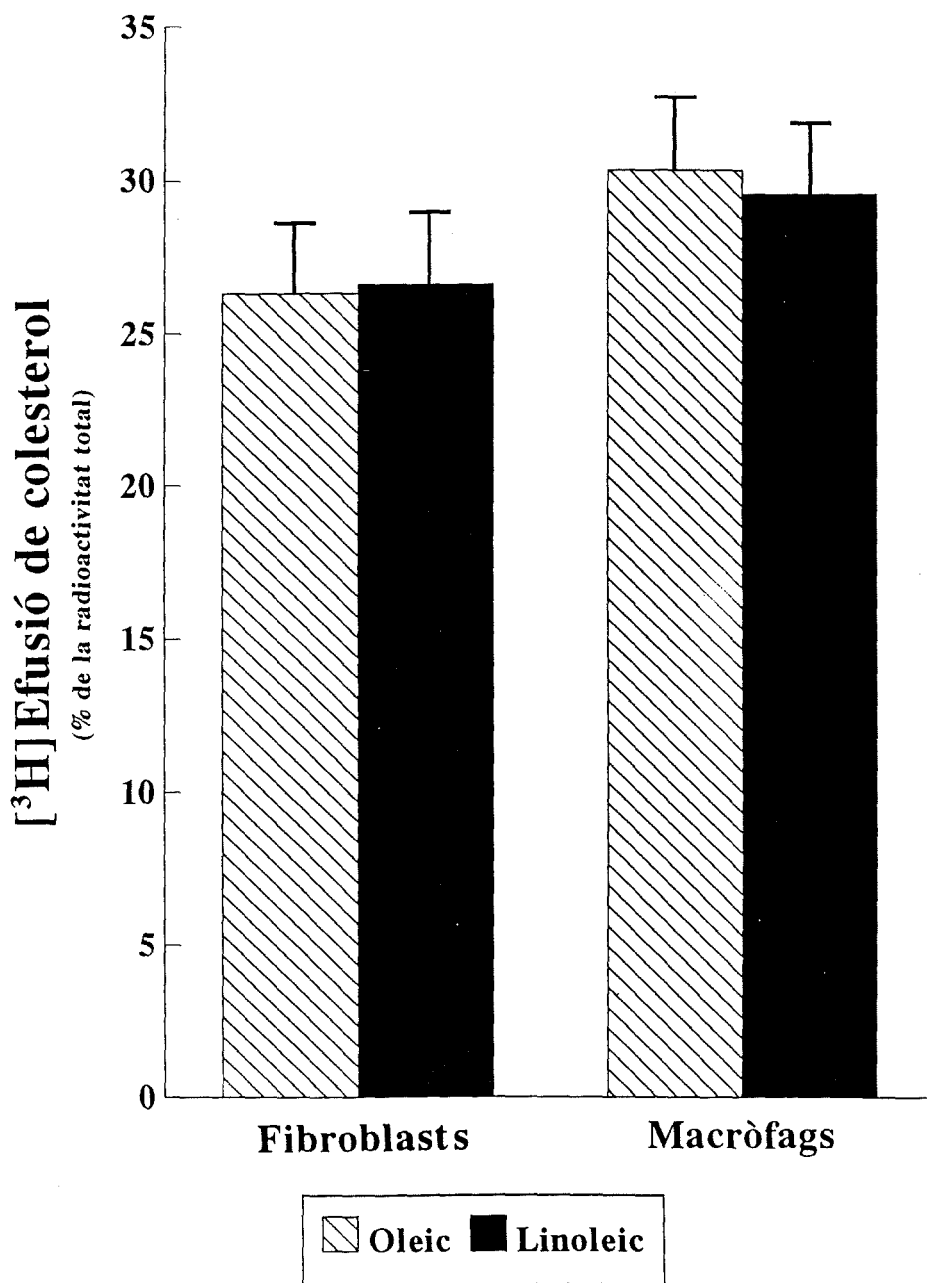


Figura 20.- El gràfic mostra els efectes de les HDL₃ sobre l'efuïó de colesterol en presència de fibroblasts i macròfags. Els resultats s'expressen com el percentatge de la radioactivitat del medi comparada amb la radioactivitat total (medi + intracel.lular).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE LA DIETA EN L'OXIDACIÓ, ELS ANTIOXIDANTS I EL COMPORTAMENT METABÒLIC DE LES LIPOPROTEINES

Maria Teresa Bargalló Escrivà

ISBN:978-84-691-1877-1/DL: T-340-2008

DISCUSSIÓ

L'estudi dels efectes de dos olis vegetals que solament difereixen en el tipus d'àcid gras majoritari, l'àcid oleic i l'àcid linoleic respectivament, ens ha permès valorar el paper d'aquests àcids grassos en diferents aspectes del metabolisme lipídic. En particular, l'interès bàsic era confirmar la nostra hipòtesi de treball, és a dir, comprovar que els dos olis induïen diferents graus de peroxidació lipídica de les LDL i de les HDL₃, relacionats tant amb canvis de les característiques físico-químiques com amb el contingut d'antioxidants d'aquestes lipoproteïnes. Alhora es tractava d'estudiar l'efecte d'aquests canvis sobre el comportament metabòlic de les LDL i de les HDL₃.

Així, analitzarem els efectes d'aquests dos olis sobre:

- Els lípids, les lipoproteïnes i les apolipoproteïnes del plasma.
- L'estructura i el comportament metabòlic de les LDL i de les HDL₃ i la relació entre ambdós aspectes.
- La peroxidació lipídica de les HDL₃ i la resistència a l'oxidació de les LDL i de les HDL₃. La influència dels antioxidants naturals.
- Les implicacions per a la prevenció dietètica de l'arteriosclerosi.

6.1.- Els lípids, les lipoproteïnes i les apolipoproteïnes del plasma

Entre els resultats dels lípids, lipoproteïnes i apolipoproteïnes del plasma es pot destacar que la dieta rica en àcid oleic provoca un augment discret però significatiu de les concentracions de les apolipoproteïnes A-I (+4.0%, $p < 0.05$) i A-II (+4.2%, $p < 0.05$) del plasma, en relació a la dieta rica en àcid linoleic, la qual cosa significa un increment d'un factor considerat protector enfront de l'arteriosclerosi. Encara que són menys utilitzades les apolipoproteïnes com a marcadors de risc de l'arteriosclerosi, l'apolipoproteïna A és considerada un factor protector enfront de l'arteriosclerosi. Estudis epidemiològics recents han contribuït a mostrar que les concentracions d'apolipoproteïna A-I i A-II estan inversament relacionades amb el risc de patir infart de miocardi (Stampfer MJ *et al*, 1991; Buring JE *et al*, 1992). De

totes maneres, altres treballs han posat en dubte l'efecte protector enfront de l'arteriosclerosi de l'apolipoproteïna A-II. Així, en ratolins transgènics que expressen de manera molt important l'apolipoproteïna A-II, sense modificar les concentracions d'apolipoproteïna A-I, s'incrementen les lesions ateromatoses. Aquests animals sotmesos a una dieta normal desenvolupen lesions aterogèniques amb més facilitat que els animals normals. Per tant, aquests treballs suggereixen que l'apolipoproteïna A-II és una antagonista de l'efecte anti-aterogènic de l'apolipoproteïna A-I. En conseqüència, són necessaris altres estudis per a esbrinar els mecanismes pels quals aquestes apolipoproteïnes estarien implicades en l'arteriosclerosi (Schultz JR *et al*, 1993; Warden CH *et al*, 1993).

De totes maneres, en el moment actual, el fet que el consum de l'oli ric en àcid oleic s'associa a un augment de l'apolipoproteïna A, significa un avantatge des del punt de vista anti-aterogènic (Avogaro P *et al*, 1979; De Backer G *et al*, 1982). En referència a aquest resultat és la primera vegada, al nostre coneixement, que s'observa l'augment de les subclasses de l'apolipoproteïna A (Mensink RP *et al*, 1989; Dreon OM *et al*, 1990; Wardlaw GM *et al*, 1991).

Els nostres resultats no van mostrar diferències significatives en les concentracions de l'apolipoproteïna B; per tant, les diferències semblen restringides a les subclasses de l'apolipoproteïna A, A-I i A-II.

En relació a les concentracions dels lípids i de les lipoproteïnes del plasma, els nostres resultats han mostrat, una vegada comparats els efectes de les dues dietes, que no hi havia diferències en les concentracions de colesterol total ni en el colesterol de les fraccions LDL, HDL₂ i HDL₃ i, per tant, tampoc en el colesterol de les HDL total. Sorpren que els canvis de les concentracions de colesterol de les subfraccions HDL₂ i HDL₃ no vagi paral·lel al canvi de les concentracions de les apolipoproteïnes A-I i A-II ja que són les seves proteïnes majoritàries. Un cop més és necessari estudiar cadascuna de les variables per tal de conèixer els efectes concrets dels olis de la dieta o, de forma general, de qualsevol tractament.

Així mateix no es van observar canvis en els nivells de triglicèrids entre la dieta rica en àcid oleic i la dieta rica en àcid linoleic.

En l'anàlisi d'altres estudis comprovem que s'utilitza indistintament, per un costat, el terme àcid oleic i àcids grassos monoinsaturats, encara que no sempre l'àcid oleic és l'únic àcid gras a tenir en compte des del punt de vista quantitatiu en l'oli. Per un altre costat, s'utilitza de forma equivalent l'àcid linoleic i els àcids grassos poliinsaturats, sense que això impliqui que l'àcid linoleic sigui l'únic àcid gras important. Nosaltres, però, utilitzarem com a sinònims els termes àcid oleic i àcids grassos monoinsaturats, per una part, i àcid linoleic i àcids grassos poliinsaturats, per l'altra, ja que seran els àcids grassos majoritaris en les dues dietes.

Per tal d'establir comparacions, hem escollit entre els estudis que analitzaven els efectes de l'àcid oleic i de l'àcid linoleic, els que tenien un disseny creuat com el nostre.

Inicialment comentarem el treball de Mensink perquè la dieta d'aquest estudi tenia una composició semblant a la nostra (Mensink RP *et al*, 1989). En el treball de Mensink els lípids aportaven un 37% i en el nostre, un 38% del total calòric. En la dieta rica en àcid oleic, aportada per l'oli d'oliva, es donaven unes proporcions dels diferents tipus d'àcids grassos semblants a les nostres: saturats, 12.9%; monoinsaturats: 15.1% i poliinsaturats: 7.9%. Així mateix, la seva dieta rica en àcid linoleic també tenia unes proporcions coincidents amb les del nostre estudi: saturats: 12.6%; monoinsaturats: 10.8% i poliinsaturats: 12.7%. Així, l'estudi de Mensink (Mensink RP *et al*, 1989) va mostrar una reducció significativa del colesterol total, del colesterol LDL i de l'apolipoproteïna B en les dues dietes en relació a les concentracions basals, encara que la disminució era més important en la dieta rica en àcid oleic. En els nostres resultats no vam aconseguir reduccions semblants. Per altre costat, no es van modificar les concentracions de colesterol de les HDL. Aquestes dades podrien explicar-se, parcialment, pel fet que la dieta anomenada d'estabilització del treball de Mensink era molt rica en àcids grassos saturats (19%),

la qual cosa va implicar, com ja és conegut, un augment important del colesterol total, del colesterol de les LDL i del colesterol de les HDL del plasma. Per tant, la substitució dels àcids grassos saturats de la dieta per àcids grassos monoinsaturats o poliinsaturats provoca, en ambdós casos, reduccions del colesterol total i de les LDL, éssent més variable la resposta de les concentracions de colesterol de les HDL. Pel contrari, en el nostre estudi, la dieta d'estabilització era la seva dieta habitual i idèntica a la dieta rica en àcid linoleic i, per tant, no produïa un increment dels nivells de colesterol. Una altra dada important, com ja dèiem, és que Mensink va utilitzar oli d'oliva com a font d'àcid oleic i no sabem, amb exactitud, quin és el paper que pot jugar aquest aspecte.

Resultats en el mateix sentit que els nostres van ser observats per Bonanome (Bonanome A *et al*, 1992) que comparava els efectes d'una dieta rica en àcids grassos monoinsaturats amb una dieta rica en àcids grassos poliinsaturats. En l'estudi de Bonanome les dues dietes, tant la rica en àcids grassos monoinsaturats com la d'àcids grassos poliinsaturats, van provocar una reducció dels nivells de colesterol total, colesterol LDL i triglicèrids, en relació a la dieta basal, encara que les reduccions no eren diferents entre elles. Per altre costat, no es va modificar el nivell de colesterol de les HDL en relació a la dieta basal. Cal destacar que la dieta d'estabilització, que coincidia amb la dieta habitual dels individus, era rica en àcids grassos monoinsaturats.

Nosaltres no vàrem observar diferències en les concentracions del colesterol total i de les LDL del plasma en relació a la dieta basal i d'estabilització. A més, cal tenir en compte que Bonanome (Bonanome A *et al*, 1992) va utilitzar una dieta amb un contingut en lípids més elevat (45% del total calòric) que el del nostre estudi (38% del total calòric). A més, en l'estudi de Bonanome, en el període de dieta rica en àcids grassos monoinsaturats, aquests aportaven un 30% del total energètic i en el període de dieta rica en àcids grassos poliinsaturats aquests aportaven, també, un 30% del total calòric. En ambdós casos, aquestes aportacions eren molt més elevades que en el nostre estudi. En concret, en el present estudi, en el període ric en àcid

oleic, els àcids grassos monoinsaturats representaven el 19% del total calòric i en el període ric en àcid linoleic, els àcids grassos poliinsaturats aportaven un 15% del total calòric, just el 50% menys que en l'estudi de Bonanome. Així, sembla que quan la dieta d'estabilització és rica en àcids grassos monoinsaturats, són necessàries aportacions molt elevades d'ambdós àcids grassos, per a induir reduccions de les concentracions plasmàtiques del colesterol total, del colesterol LDL i del triglicèrids, sense provocar canvis en les concentracions de colesterol de les HDL.

Entre tots els treballs que relacionen la dieta i els lípids del plasma, cal esmentar de manera especial els estudis que van contribuir a revaloritzar el consum d'àcids grassos monoinsaturats i, en particular, la influència d'aquests àcids grassos sobre les concentracions de colesterol de les HDL (Mattson FH *et al*, 1985; Ascaso JF *et al*, 1987; Jacotot B *et al*, 1988). Cal recordar que, amb anterioritat, aquest tipus d'àcid gras es considerava neutre ja que no reduïa les concentracions de colesterol del plasma (Keys A, 1970). Per tant, no s'aconsellava el consum d'àcids grassos monoinsaturats en les dietes per a la prevenció i el tractament de les malalties cardiovasculars.

En resum, els resultats dels treballs abans esmentats mostraven que el consum d'una dieta rica en àcid oleic no modificava o provocava un augment de les concentracions de colesterol de les HDL en homes (Mattson FH *et al*, 1985; Jacotot B *et al*, 1988) o en dones (Ascaso JF *et al*, 1987), quan es comparava amb una dieta rica en àcid linoleic. De tots aquests, el treball de Mattson (Mattson FH *et al*, 1985) tenia un disseny creat com el nostre i la composició de la dieta rica en àcid oleic era semblant a la dieta habitual de Creta, descrita en l'estudi dels Set Països. En la composició de la dieta rica en àcid linoleic es va donar la mateixa proporció de poliinsaturats (29.5% del total calòric) que s'havia donat de monoinsaturats (29.4% del total calòric) en l'anterior. Per un altre costat, la proporció de monoinsaturats (6.0% del total calòric) de la dieta rica en àcid linoleic era, aproximadament, la mateixa que la d'àcids grassos poliinsaturats (7.2% del total calòric) de la dieta rica en àcid oleic. Els resultats indicaven que la dieta rica en àcids grassos

monoinsaturats, quan es comparava amb la dieta rica en àcids grassos poliinsaturats, reduïa de manera igual el colesterol total i colesterol LDL i, a més a més, la dieta rica en àcids grassos monoinsaturats presentava un avantatge addicional al produir un increment del colesterol de les HDL. De totes formes, cal remarcar que en el disseny d'aquest estudi les dietes eren líquides i, per tant, s'individualitzen més fàcilment els efectes dels diferents components. Així el treball de Mattson (Mattson FH *et al*, 1985) ha estat fonamental en subratllar els efectes beneficiosos dels àcids grassos monoinsaturats, en particular, de l'àcid oleic.

Posteriorment, aquests resultats han estat confirmats pels treballs d'altres autors (Mensink RP *et al*, 1989; Masana L *et al*, 1991a; Bonanome A *et al*, 1992).

De totes maneres, és complicat explicar el fet que diversos estudis donin resultats dispars sobre els efectes dels àcids grassos monoinsaturats i poliinsaturats, pel que creiem que cal tenir en compte un conjunt de paràmetres a l'hora d'analitzar els estudis. En qualsevol cas, és necessari comparar grups equivalents d'individus, és a dir, normolipidèmics o dislipèmics amb la mateixa alteració en relació als lípids. A més, en cas de tenir associats factors de risc cardíoc-vascular, aquests han de ser els mateixos per a tots els grups i han d'estar ben especificats. Un factor que cal considerar és el tipus de disseny de l'estudi (Mensink RP *et al*, 1992). Així, és important que el disseny intenti eliminar l'efecte del període de temps sobre les variables. Per tant, en aquest moment s'aconsellen els estudis amb un disseny en paral·lel o creuat. En el primer cas, es tracta de grups de subjectes que segueixen, cadascun d'ells, una de les diverses dietes en el mateix període de temps. En l'estudi creuat, com ja hem esmentat, cada grup segueix totes les dietes en una seqüència diferent dels altres grups (Mensink RP *et al*, 1992).

Un altre aspecte que cal tenir en compte és la durada dels estudis. Aquesta ha de ser suficientment llarga per tal que l'aliment consumit arribi a l'equilibri del seu efecte. Aquesta durada és considerada de 15 dies com a mínim (Brussaard JH *et al*, 1982).

Un paràmetre que pot ser rellevant per a la comparació dels resultats és l'aportació energètica total i a més cal especificar l'aportació de cadascun dels tipus d'àcids grassos, és a dir, dels monoinsaturats, dels poliinsaturats i dels saturats. Dins d'aportacions energètiques semblants, hauríem de tenir en compte quina fracció de l'àcid gras considerat és aportat per l'oli o per altres aliments. Això ens obliga a un estricte control dels aliments per tal que l'única variable sigui el tipus d'àcid gras. Especialment, hem de conèixer el consum de colesterol i controlar que la quantitat d'aquest sigui la mateixa en totes les dietes. Un altre aspecte fonamental és, a més a més, la font d'on prové l'oli ja que una mateixa quantitat de l'àcid gras majoritari, àcid oleic o linoleic, pot aconseguir-se a partir de fruits o llavors. Aquest origen diferent pot implicar una variació en els components que integren l'oli (ex., vitamines, oligoelements, etc). A més a més, en el cas de l'oli, s'han de considerar les manipulacions a què es sotmet el producte per tal d'elaborar-lo, perquè poden afectar els components. Així, per exemple, el refinatge d'un oli en què s'utilitzen altes temperatures provoca una reducció del seu contingut en vitamines termolàbils com la vitamina E. Per altra part, el tractament a pressions elevades, però en fred, per tal d'obtenir l'oli d'oliva verge fa que es conservin la major part dels components. La conjunció de tots els paràmetres esmentats, entre altres, podria intervenir en els efectes globals dels olis sobre els lípids.

En conclusió, dels resultats de diversos treballs on es comparen els efectes dels àcids grassos monoinsaturats enfront dels àcids grassos poliinsaturats, s'ha deduït que la substitució dels àcids grassos saturats per àcids grassos monoinsaturats o poliinsaturats tenen efectes similars sobre les concentracions del colesterol total, colesterol LDL, si bé els monoinsaturats poden incrementar o no modificar el colesterol de les HDL (Mattson FH *et al*, 1985; Ascaso JF *et al*, 1987; Baggio G *et al*, 1988; Jacotot B *et al*, 1988; Mensink RP *et al*, 1989; Berry EM *et al*, 1991).

Els nostres resultats indiquen, també, que la dieta rica en àcid oleic té efectes similars a la dieta rica en àcid linoleic en relació als lípids i a les lipoproteïnes. Però, la dieta rica en àcid oleic tindria un efecte addicional beneficiós enfront de

l'arteriosclerosi pel fet d'incrementar les concentracions de les apolipoproteïnes A del plasma.

6.2.- L'estructura i el comportament metabòlic de les LDL i de les HDL₃ i la relació entre ambdós aspectes

Quan analitzem els efectes de l'àcid oleic i linoleic de la dieta en la funció metabòlica de les lipoproteïnes, veiem que les LDL natives, aïllades després de les dues dietes i enfrontades amb macròfags humans control, són reconegudes pel receptor depurador de forma similar. En concret, aquestes dietes produeixen unes LDL que desplacen, de forma moderada i similar, les LDL oxidades control del receptor depurador dels macròfags. El fet que les LDL tinguin una activitat semblant en relació al receptor depurador ens suggereix que la capacitat d'aquestes lipoproteïnes per induir la transformació dels macròfags en cèl.lules escumoses no seria diferent entre elles. Aquest desplaçament és feble i estaria dins dels marges que han estat descrits per a les LDL natives (Keidar S *et al*, 1992; Maor I *et al*, 1994). Diferents estudis utilitzant macròfags han mostrat que les LDL natives desplacen a les LDL oxidades fins a un 30% (Keidar S *et al*, 1992; Maor I *et al*, 1994).

Així s'ha trobat també que les HDL natives desplacen un 19% a les ¹²⁵I-Ox₂₄-HDL control del receptor depurador dels macròfags (La Ville AE *et al*, 1994).

A fi d'explicar aquesta competició establerta entre lipoproteïnes natives i oxidades, s'ha suggerit diferents mecanismes. En concret, sembla que les LDL oxidades conserven una part d'epítops de la seva forma nativa que serien reconeguts pel receptor depurador dels macròfags. Per tant, les lipoproteïnes natives i les oxidades són reconegudes pel receptor depurador dels macròfags si bé és necessari tots els epítops presents en les lipoproteïnes oxidades per tal de tenir un 100% de reconeixement del receptor depurador dels macròfags (Keidar S *et al*, 1992; Maor I *et al*, 1994).

D'altra part, en el moment actual hi han diversos receptors depuradors que són candidats per a actuar en el reconeixement de les lipoproteïnes oxidades (De Rijke YB *et al*, 1994).

De totes maneres, els resultats dels efectes de les LDL natives, obtingudes després d'aquests dos tipus de dietes, sobre el receptor depurador dels macròfags es simplifiquen dient que tenen un comportament similar. Aquestes observacions són, al nostre coneixement, les primeres en relació a les LDL, aïllades després de les dietes i, per tant, no hi ha dades en la bibliografia que ens permetin comparar-les amb les d'altres estudis.

Recentment, un treball d'Aviram (Aviram M *et al*, 1993) ha posat en evidència que la suplementació de la dieta amb àcid oleic, utilitzant oli d'oliva, indueix la formació de LDL que són menys captades pels macròfags, en comparació amb les LDL obtingudes a l'inici de la dieta. De totes maneres, aquest estudi no compara aquests efectes amb els d'altres olis. Per tant, aquest resultat ens suggereix que la suplementació de la dieta amb àcids grassos monoinsaturats redueix la formació de cèl.lules escumoses, encara que no podem deduir un efecte més positiu de l'oli d'oliva en comparació amb altres olis.

Per altra banda, altres treballs mostren que les LDL obtingudes després de dietes riques en àcid oleic o en àcid linoleic són reconegudes de manera similar pel receptor de les LDL. A més a més, l'activitat del receptor de les LDL de les cèl.lules dels individus sotmesos a aquests dos tipus de dieta també és semblant. Això ens porta a pensar que tant les LDL com el receptor d'aquestes LDL, per tant, la interacció LDL-receptor, mostren uns canvis similars sota els efectes de les dues dietes (Berry EM *et al*, 1991).

A més a més, els nostres resultats permeten completar els coneixements sobre el comportament de les LDL natives, obtingudes després d'una dieta rica en àcid oleic o d'una dieta rica en àcid linoleic, doncs si bé era coneguda la seva capacitat per a

ser reconegudes pel receptor de les LDL, es desconeixia el reconeixement pel receptor depurador dels macròfags humans. Per tant, les dades del present treball afegeixen un nou aspecte: el reconeixement similar i feble, per part del receptor depurador del macròfags humans control, de les LDL obtingudes en les dues dietes.

El fet de no observar diferències en el comportament de les LDL aïllades després de les dues dietes podia ser fàcilment previsible pel fet de no haver detectat diferències en la composició global en lípids i en el contingut en l'apolipoproteïna B.

D'altra banda, la fluïdesa de les LDL no va ser diferent després de les dues dietes. Aquest fet calia comprovar-lo malgrat que les dietes no van induir canvis en els moduladors químics de la fluïdesa.

En referència a les HDL₃, vam estudiar la capacitat de les lipoproteïnes, produïdes en les dues dietes, per a facilitar la sortida de colesterol de les cèl.lules extrahepàtiques, com un pas dins del procés de retorn del colesterol dels teixits perifèrics envers el fetge. Com a exemple d'aquestes cèl.lules perifèriques, vam escollir els fibroblasts i els macròfags obtinguts de donants sans.

En el primer cas, les HDL₃ obtingudes després de les dues dietes provocaven una sortida similar de colesterol dels fibroblasts humans. Malgrat que els resultats de diversos estudis siguin difícils de comparar quan es tracta de dissenys diferents, nosaltres, en un treball previ a l'actual (Solà R *et al*, 1993), havíem observat que les HDL₃ aïllades després d'una dieta rica en àcid linoleic, aportat per l'oli de gira-sol, produeix una efusió similar de colesterol lliure a partir de fibroblasts. No obstant, les HDL₃ obtingudes després d'una dieta rica en àcid oleic, proveït en aquell treball per l'oli d'oliva, és superior. Ara bé, malgrat les limitacions de la comparació feta anteriorment, les HDL₃ obtingudes en el present estudi semblen posseir un comportament metabòlic proper al de les HDL₃ aïllades després de la dieta rica en àcid linoleic de l'anterior treball.

En el segon cas, quan realitzem els estudis posant les HDL₃ en presència de macròfags, a fi d'apropar-nos a una cèl.lula més directament implicada en la formació de la placa d'ateroma, observem també un comportament metabòlic similar entre les HDL₃ obtingudes després de les dues dietes. En ambdós casos s'obté una sortida semblant de colesterol intracel.lular dels macròfags (29%).

Sembla, doncs, que en els dos tipus de cèl.lules escollides per a valorar el comportament metabòlic de les HDL₃, fibroblasts i macròfags, s'observa la mateixa eficàcia metabòlica de les lipoproteïnes provinents de les dues dietes. Aquest comportament metabòlic similar provocat per les dues dietes, tal com hem confirmat per a les LDL, suggereix semblances en la composició química global i en la fluïdesa. Aquestes similituds s'han confirmat en les HDL₃ obtingudes després d'ambdues dietes.

Si comparem la composició química global i la fluïdesa de les HDL₃ després de les dues dietes del nostre estudi, amb les induïdes per una dieta rica en àcid linoleic i una altra rica en àcid oleic d'un treball anterior (Solà R *et al*, 1993), observem que les HDL₃ obtingudes després de les dues dietes del nostre treball són molt més semblants a les HDL₃ obtingudes després de la dieta rica en àcid linoleic i no a les de la dieta rica en àcid oleic. Puntualitzem que en el treball previ (Solà R *et al*, 1993) l'àcid linoleic era aportat per l'oli de gira-sol i l'àcid oleic ho era per l'oli d'oliva.

A més coneixem la composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL₃, la qual cosa ens permet valorar addicionalment l'adhesió dels participants a la dieta. L'esmentada composició en àcids grassos ens confirma que després de seguir una dieta rica en àcid oleic, els fosfolípids s'enriqueixen amb aquest àcid gras; de forma semblant, després d'una dieta rica en àcid linoleic, els fosfolípids incrementen el percentatge d'aquest àcid gras. Així aquestes diferències en la composició en els àcids grassos són les úniques modificacions de la composició induïdes pel consum d'aquests dos olis.

Malgrat els canvis en els àcids grassos dels fosfolípids, els nostres resultats recolzen l'ordre d'importància dels moduladors químics sobre la fluïdesa de les lipoproteïnes. Així, sembla que els factors més importants per a determinar la fluïdesa serien els continguts en lípids (colesterol, triglicèrids, fosfolípids) i en proteïnes. En grau menor, cal tenir en compte el tipus d'àcid gras dels fosfolípids, la posició del primer doble enllaç, el nombre de dobles enllaços i la longitud de la cadena hidrocarbonada, com a paràmetres que influïrien en la fluïdesa de les lipoproteïnes. Aquest ordre estaria d'acord amb el donat per Shinitzky que va obtenir-lo en liposomes i, per tant, sense tenir en compte els efectes de la dieta (Shinitzky M *et al*, 1976). En conseqüència, si solament hi ha canvis en els àcids grassos dels fosfolípids, aquests no són suficients per a provocar modificacions de la fluïdesa de les lipoproteïnes. Per tant, si amb la dieta no podem induir canvis significatius en la composició química global de les lipoproteïnes sembla difícil que es puguin donar canvis en la seva fluïdesa.

Com a resum d'aquest apartat, observem que els efectes sobre les lipoproteïnes de dues dietes, una rica en àcid oleic i l'altra rica en àcid linoleic, en què els àcids grassos són aportats per uns olis procedents d'una mateixa llavor, en la seva forma habitual o modificada genèticament, són similars. Així mateix, els canvis induïts en la composició química global i la fluïdesa, tant de les LDL com de les HDL₃ són semblants, la qual cosa implica comportaments metabòlics *in vitro* anàlegs.

6.3.- Peroxidació lipídica de les HDL₃ i resistència a l'oxidació de les LDL i de les HDL₃. Influència dels antioxidants naturals.

Una de les parts de la nostra hipòtesi de treball es basava en què els dos àcids grassos, oleic i linoleic, diferien en la seva facilitat per a oxidar-se (Parthasarathy S *et al*, 1990b; Bonanome A *et al*, 1992). El plantejament era, en concret, que la dieta rica en àcid oleic podia tenir un avantatge addicional sobre la dieta rica en àcid linoleic, pel fet de protegir a les LDL de la modificació oxidativa

(Esterbauer H *et al*, 1987). Per això, un dels nostres objectius fonamentals va ser la valoració d'aquest paràmetre, no sols en les LDL sinó també en les HDL₃, obtingudes pel consum d'aquests àcids grassos. Així mateix, aquesta facilitat per oxidar-se ve condicionada per una sèrie d'antioxidants presents en les lipoproteïnes que també intervindrien en el procés.

Els nostres resultats confirmen una major susceptibilitat a l'oxidació de les LDL provinents d'una dieta rica en àcid linoleic, en comparació amb les LDL d'una dieta rica en àcid oleic. Aquests resultats recolzen els obtinguts per diversos autors en referència a aquesta major susceptibilitat a l'oxidació de les LDL (Parthasarathy S *et al*, 1990b; Berry EM *et al*, 1991; Reaven P *et al*, 1991). En concret, aquestes observacions apareixen en estudis fets tant en conills (Parthasarathy S *et al*, 1990b) com en humans (Berry EM *et al*, 1991; Reaven P *et al*, 1991). A més a més, aquests resultats s'havien obtingut utilitzant diferents sistemes de valoració de la susceptibilitat, com ara la incubació amb una solució de Cu²⁺ per a determinar la formació de les TBARS, la durada del període de retard en la formació de diens conjugats, la facilitat per oxidar-se les LDL en presència de cèl.lules endotelials (Parthasarathy S *et al*, 1990b; Berry EM *et al*, 1991; Reaven P *et al*, 1991; Bonanome A *et al*, 1992).

La coincidència dels nostres resultats, en referència a la susceptibilitat a l'oxidació de les LDL, amb els d'altres autors ens va encoratjar a completar els efectes de les dietes que diferien en el tipus d'àcid gras majoritari en les HDL₃, observació que no havia estat estudiada amb anterioritat.

Els nostres resultats mostren que les HDL₃ obtingudes després de la dieta rica en àcid linoleic produeixen quantitats més elevades de TBARS, tant en la seva forma nativa com després de ser sotmeses a un estrès oxidatiu, si les comparem amb les HDL₃ aïllades després d'una dieta rica en àcid oleic.

Així sembla que l'àcid oleic és més resistent a l'oxidació que l'àcid linoleic. Aquesta oxidació té lloc, principalment, a través de la cadena de peroxidació lipídica iniciada per l'extracció d'hidrogen de l'àcid gras corresponent. Com ja dèiem, és favorable, des del punt de vista termodinàmic i energètic, l'extracció d'un àtom d'hidrogen d'una estructura que pugui establir-se posteriorment. Així amb un sol doble enllaç no es pot aconseguir aquesta estabilització i, per tant, és menys oxidable. Com recordem de la Introducció, els àcids grassos amb igual longitud de cadena (18 C) són més susceptibles a l'oxidació quan augmenta el nombre de dobles enllaços. De manera aproximada, l'augment de 1 a 2 dobles enllaços incrementa 10 vegades la susceptibilitat a l'oxidació de l'àcid gras; d'igual forma, l'augment de 1 a 3 enllaços provoca un augment de la seva susceptibilitat a l'oxidació de 30 vegades (Labuza TP, 1971). Per tant, la presència de l'àcid linoleic (C18:2,n-6), i encara més la presència de l'àcid linolènic (C18:3,n-3), afavoreix l'oxidació de la lipoproteïna que els conté, quan es compara amb l'àcid oleic (C18:1,n-9).

Més recentment, s'ha determinat l'oxidabilitat de solucions homogènies de diferents àcids grassos; així, es va trobar per l'àcid linoleic un valor de 1.22, per l'àcid linolènic de 2.44 i per l'àcid araquidònic (C20:4,n-6) de $3.45 \text{ M}^{-1/2}\text{min}^{-1/2}$. D'aquesta manera, l'increment de 2 a 4 dobles enllaços indueix una oxidabilitat triple (Cosgrove JP *et al*, 1987). De totes maneres, s'ha de seguir treballant per tal de conèixer els efectes d'aquests àcids grassos en les lipoproteïnes.

A més a més, els nostres resultats han mostrat que el quocient àcid oleic/àcid linoleic dels fosfolípids de les HDL₃ està correlacionat de forma inversa amb els nivells de peroxidació d'aquestes lipoproteïnes. Aquesta correlació ja havia estat observada en les LDL (Bonanome A *et al*, 1992). La repetició d'aquest resultat confirma el fet que un augment en el contingut d'àcid oleic d'una lipoproteïna representa un factor protector per a l'oxidació i, al contrari, un augment del seu contingut en àcid linoleic suposa un factor que afavoreix la seva oxidació. De totes maneres, la situació més favorable, és a dir, la lipoproteïna més resistent a l'oxidació, té un equilibri entre els dos àcids grassos.

Així mateix, ens vam preguntar si la resistència a la modificació oxidativa de les LDL i HDL₃ riques en àcid oleic era deguda, solament, a la seva riquesa en aquest àcid. Per això ens vam plantejar si aquestes lipoproteïnes tenien un contingut més gran d'antioxidants, com la vitamina A o la vitamina E, la qual cosa implicaria una major protecció enfront de l'estrès oxidatiu. Com s'ha suggerit anteriorment, una major protecció enfront l'estrès oxidatiu ve condicionada no sols pel tipus d'àcid gras sinó també per la presència d'antioxidants. La situació més idònia és la coincidència d'antioxidants amb una alta afinitat pels radicals lliures i d'àcids grassos amb poca afinitat pels radicals lliures. Això significaria que, davant de l'atac de radicals lliures, la presència d'un antioxidant amb alta afinitat per aquests evitaria que els lípids fossin atacats pels radicas lliures. En conseqüència, aquest fet implicaria una protecció per als lípids propers (Esterbauer H *et al*, 1987; Niki E, 1987a,b; Parthasarathy S *et al*, 1990b).

Un altre aspecte que pot ser rellevant és que els antioxidants reaccionen de forma diferent, en quant a velocitat i afinitat, amb els diversos subproductes de la peroxidació lipídica. Així, en funció de l'estructura de l'àcid gras, s'obindrà una sèrie diferent de subproductes, que determinaran la facilitat per a reaccionar amb els antioxidants o per a continuar la reacció en cadena amb els lípids (Maiorino M *et al*, 1989; Bonanome A *et al*, 1992).

En l'anàlisi del contingut en antioxidants no vam observar diferències en el contingut de vitamina E entre les LDL i les HDL₃ aïllades després de les dues dietes.

A més a més, en la primera fase de l'estudi es va observar un major contingut de vitamina A en les HDL₃ riques en àcid oleic, la qual cosa podria contribuir, en part, a l'augment de la resistència a l'oxidació observat en aquestes lipoproteïnes. No va ser possible valorar l'efecte de la vitamina A en tot l'estudi creuat a causa que es va observar un efecte d'arrossegament (*carry-over*) del primer al segon període de la dieta. Possiblement, aquest efecte sigui degut a l'acumulació hepàtica de la

vitamina A que provoca efectes més enllà del seu consum immediat o a curt termini (Machlin LJ, 1993).

A més, serà interessant completar el coneixement d'altres antioxidants i substàncies que estiguin formant part de les lipoproteïnes i que poden intervenir en la prevenció de la seva oxidació. En concret, podria plantejar-se l'estudi del paper dels fenols com a antioxidants. L'interès d'aquests antioxidants és que són, també, aportats pels olis i per altres aliments (Duthie GG, 1993).

D'altra part, ja és conegut que la susceptibilitat a l'oxidació de les lipoproteïnes no s'explica només pel contingut en antioxidants, sinó que podrien participar en aquesta susceptibilitat altres factors com el grau de glicosilació, el contingut en lípids, la grandària de la partícula lipoproteica, el contingut en esfingomielina, el contingut en peròxids, ... que haurien de ser estudiats per a completar l'anàlisi global (Esterbauer H *et al*, 1993).

De totes formes, els nostres resultats recolzen la importància de la dieta com a element modulador de l'oxidació lipoproteica. Així, respecte a àcids grassos més insaturats, el sol i únic doble enllaç de l'àcid oleic significa un element protector enfront de l'oxidació de les lipoproteïnes que el contenen, mentre siguin semblants els nivells d'antioxidants estudiats.

La relació de la dieta en la patogènia de l'arteriosclerosi podria estar relacionada amb el diferent grau d'oxidació de les lipoproteïnes. En concret, el fet que la dieta rica en àcid oleic produeixi unes HDL₃ amb una menor oxidació en estat natiu i una major resistència a l'oxidació de les LDL i de les HDL₃ és un element important per a l'alentiment de la progressió de la lesió ateromatosa. Si aquestes observacions de les lipoproteïnes realitzades *in vitro* fossin constatades *in vivo*, seria possible la reducció d'un element clau en l'inici i la progressió de les lesions de l'arteriosclerosi.

De totes maneres, les diferències observades en la peroxidació de les HDL₃ natives obtingudes després de les dues dietes no s'han acompanyat de canvis en l'efusió de colesterol induït per les mateixes lipoproteïnes. Pot ser que les diferències observades en l'oxidació no siguin suficients per a induir modificacions en el seu comportament. Així, havíem observat per a les HDL oxidades, durant 12 i 24 h en una solució de Cu²⁺, una reducció de l'efusió de colesterol del 16% i del 30%, respectivament, en referència a les HDL natives, mentre que les concentracions de TBARS augmentaven un 200% i 500%, respectivament, és a dir, d'una forma exponencial (La Ville AE *et al*, 1994). Resultats similars han estat, a més a més, confirmats per altres autors (Nagano Y *et al*, 1991; Morel DW, 1994). Per tant, encara que hem observat diferències en les concentracions de TBARS entre les HDL₃ natives aïllades després de les dues dietes, aquestes concentracions són, en ambdós casos, molt febles.

No obstant, serà interessant comprovar si les diferències en la susceptibilitat a l'oxidació de les HDL₃ podrien anar lligades a canvis en la capacitat per a induir la sortida de colesterol des de les cèl.lules.

Tot això ens permet plantejar la hipòtesi que l'enriquiment de les lipoproteïnes en àcid oleic determinarà, de forma directa o a través de l'oxidació, el seu volum, la seva configuració en l'espai i l'estabilitat de l'associació entre els lípids i les apolipoproteïnes. Tots aquests factors intervindran en el comportament metabòlic d'aquestes lipoproteïnes. A més, els canvis de conformació de les apolipoproteïnes modularan la relació de la lipoproteïna amb els receptors cel.lulars, amb les altres lipoproteïnes, amb enzims com la LCAT i amb proteïnes com la CETP (Shoukry MI *et al*, 1994). En conjunt es modularan els intercanvis dels lípids i de les apolipoproteïnes amb altres lipoproteïnes i amb les cèl.lules. La *Figura 21* mostra de forma esquemàtica aquesta hipòtesi.

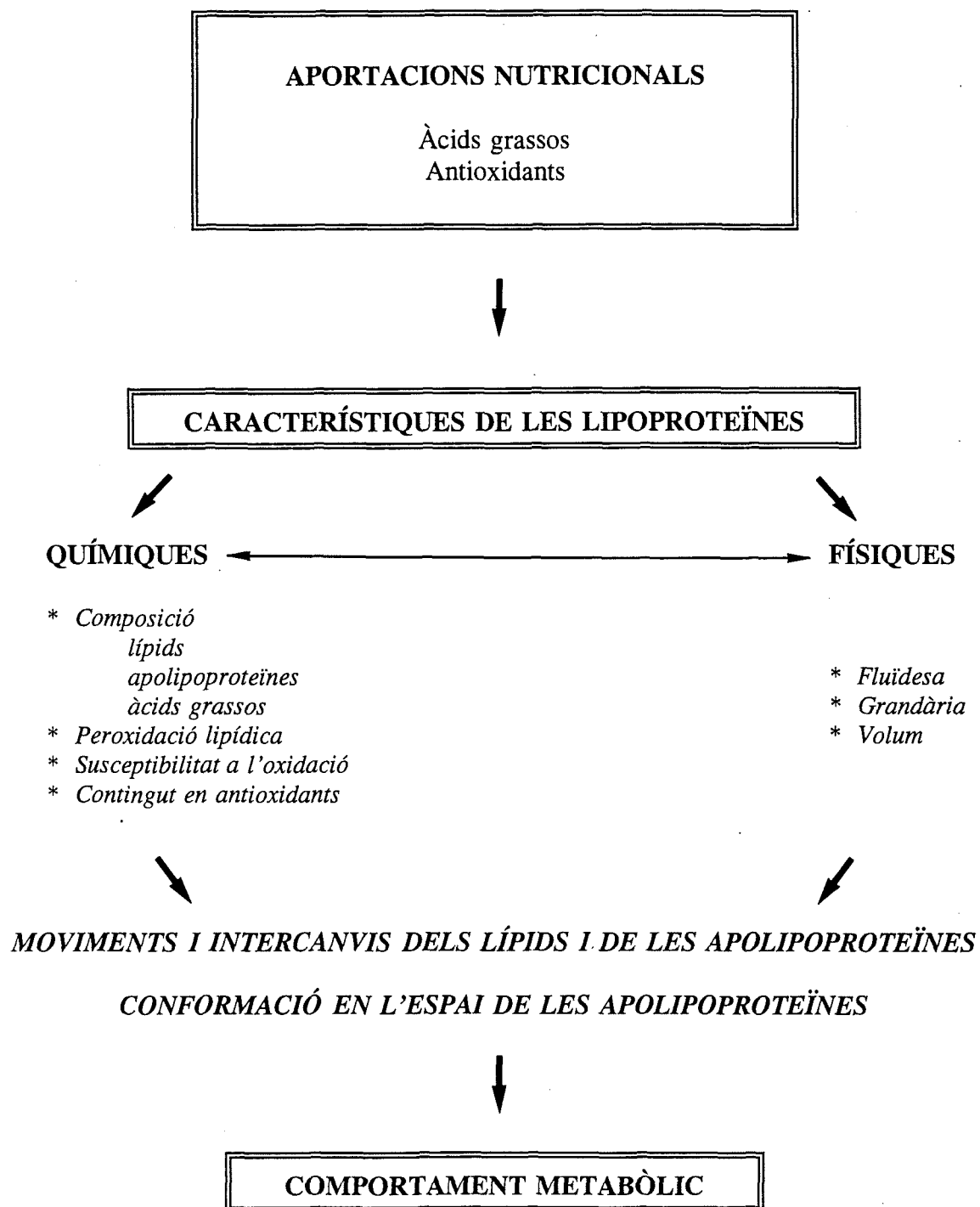


Figura 21.- Esquema d'un nou mecanisme que proposem per a explicar la intervenció de les aportacions nutricionals, tant en àcids grassos com en vitamines antioxidants en l'arteriosclerosi. Aquestes aportacions modifiquen, al mateix temps, les característiques químiques i físiques de les lipoproteïnes. Aquestes dues característiques són interdependents, per la qual cosa poden utilitzar-se de manera indistinta per tal d'estudiar el comportament metabòlic de les lipoproteïnes sobre les cèl.lules.

A més a més, no es pot descartar la influència de les lipoproteïnes oxidades sobre els fenòmens de coagulació i trombosi (Ardlie NG *et al*, 1989), factors moduladors de les complicacions de la placa d'ateroma.

Cal subratllar que hem analitzat un aspecte de la influència del tipus d'àcid gras de la dieta en el metabolisme de les lipoproteïnes i hem confirmat la influència de la dieta en l'oxidació de les lipoproteïnes. Aleshores, serà interessant que estudis posteriors analitzin al mateix temps els efectes dels àcids grassos en les cèl·lules dels individus sotmesos a aquestes dietes i, si és possible, que aquestes cèl·lules siguin les més directament implicades en la formació de la placa d'ateroma.

L'anàlisi global de tots els aspectes estudiats i de la seva repercussió a nivell fisiològic ens permetrà avançar en la comprensió de la relació entre dieta i aterogenicitat.

En relació a la nostra hipòtesi de treball, com ja hem dit, els nostres resultats han confirmat que el consum de dos olis que diferien en el tipus d'àcid gras majoritari, un oli ric en àcid oleic i un altre ric en àcid linoleic, indueixen diferents graus de peroxidació lipídica en les LDL i en les HDL₃. Aquestes diferències, però, no es corresponien amb canvis de les característiques físico-químiques ni amb canvis del contingut dels antioxidants estudiats. De totes maneres, els canvis en l'oxidació lipoproteica no són suficients per a induir diferències en els aspectes del comportament metabòlic que hem analitzat.

Per altre costat, la presència d'àcid oleic, sense tenir en compte el seu origen, provinent de l'oli d'oliva o de llavors, té un efecte protector enfront de l'oxidació de les lipoproteïnes. De totes maneres, l'origen dels àcids grassos monoinsaturats pot determinar diferències importants en algunes característiques físico-químiques i en el comportament metabòlic de les lipoproteïnes.

En conclusió d'aquest apartat, els nostres resultats suggereixen que l'àcid oleic de les lipoproteïnes té un efecte estabilitzador enfront de l'oxidació, en condicions d'igualtat del seu contingut en antioxidants.

6.4.- Implicacions per a la prevenció dietètica de l'arteriosclerosi.

Els nostres resultats contribueixen a ampliar el coneixement dels efectes dels olis en el metabolisme de les lipoproteïnes i, en particular, confirmen un efecte protector de l'àcid oleic en les lipoproteïnes enfront de la peroxidació lipídica. De totes maneres, encara que els efectes fisiològics de l'oxidació lipoproteica no són coneguts, s'ha constatat l'augment de les concentracions de peroxidació lipídica, tant en plasma com en les LDL, en individus i malalts amb risc elevat de patir malalties càrdio-vasculars (Masana *et al*, 1991b; Plana N [tesi doctoral], 1993).

A més a més, per tal de complementar les recomanacions dietètiques per a la prevenció de les malalties càrdio-vasculars aconsellarem el consum d'un oli ric en àcid oleic a fi de reduir l'oxidació de les lipoproteïnes. Si aquesta resistència a l'oxidació fos, també, independent de la font d'origen de l'oli, caldria subratllar que aquest oli de gira-sol ric en àcid oleic és econòmicament tan assequible com els altres olis rics en àcid linoleic.

Una altra manera de consumir l'àcid oleic és la suplementació de la dieta amb aliments com ara les avellanes o ametlles. Recordem que la meitat del pes d'aquestes fruites seques és àcid oleic. En concret, en un estudi realitzat per nosaltres es va trobar que el consum d'avellanes en petites quantitats va provocar reduccions dels nivells de colesterol total, de colesterol LDL i d'apolipoproteïna B. Per un altre costat, les nous són riques en àcid linoleic i s'ha mostrat que el seu consum redueix els nivells de colesterol total i colesterol de les LDL (Sabaté J *et al*, 1994). A més a més, aquestes fruites seques són riques en vitamines antioxidants (vitamina E, entre altres). De forma addicional, un estudi epidemiològic ha assenyalat els efectes

beneficiosos de totes les fruites seques en la reducció del risc càrdio-vascular (Fraser GE *et al*, 1992). Per tot això, recentment s'han incorporat en les recomanacions dietètiques per a la prevenció de les malalties càrdio-vasculars (Mata P *et al*, 1994).

De totes maneres, cal remarcar que si bé és important la presència d'àcid oleic aportat per un oli com un element d'una dieta, aquest no és l'únic element que s'ha de tenir en compte. Si analitzem les poblacions que prenen àcid oleic de forma habitual, trobem que aquest és aportat per l'oli d'oliva i que aquesta dieta és, alhora, rica en fruites i verdures fresques, que aporten, a més a més, antioxidants naturals (β -carotens, vitamines E, A i C, etc), sense oblidar-nos del peix, dels llegums, etc. Així, sembla que ja forma part d'aquesta dieta tradicional un àcid gras resistent a l'oxidació i una sèrie d'antioxidants, la qual cosa recolzaria la importància d'aquests dos elements per tal de protegir-nos de l'oxidació. Així, per tant, creiem oportú encoratjar a les poblacions que consumeixen tradicionalment olis rics en àcid oleic, perquè continuïn consumint aquest tipus d'oli a fi de contribuir a la prevenció de les malalties càrdio-vasculars (Masana *et al*, 1991a).

Per últim, la recomanació del consum d'un tipus d'àcid gras respon a un intent de simplificació i globalització dels resultats d'estudis amb diferents aliments que contenen aquest àcid gras. De totes maneres, això pot conduir a cometre un error ja que s'obliden altres factors lligats a l'aliment concret i que condicionen els resultats obtinguts. Per tant, si bé és molt interessant la globalització, en nutrició no ens podem oblidar dels aliments concrets. Aquests són un conjunt de nutrients que interactuen entre ells i, per tant, el seu efecte final no ha de ser la suma dels efectes parcials de cada nutrient. Així doncs, el millor coneixement de la composició i els efectes dels macro i micronutrients facilitarà les recomanacions dietètiques per a la prevenció de les malalties càrdio-vasculars.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE LA DIETA EN L'OXIDACIÓ, ELS ANTIOXIDANTS I EL COMPORTAMENT METABÒLIC DE LES LIPOPROTEINES

Maria Teresa Bargalló Escrivà

ISBN:978-84-691-1877-1/DL: T-340-2008

CONCLUSIONS

- 1.- L'oli de gira-sol modificat, ric en àcid oleic, i l'oli de gira-sol tradicional, ric en àcid linoleic, indueixen canvis similars de les concentracions dels lípids i de les lipoproteïnes del plasma.
- 2.- L'oli de gira-sol modificat, ric en àcid oleic, indueix un augment d'apolipoproteïnes A-I i A-II en plasma. Això implica l'increment d'un factor protector de l'arteriosclerosi.
- 3.- Les LDL obtingudes a partir de les dues dietes tenen valors semblants respecte a la seva composició química global i a la seva fluïdesa. Per tant, aquestes LDL produïdes per les dues dietes, una rica en àcid oleic i l'altra rica en àcid linoleic, són reconegudes de forma similar pel receptor depurador dels macròfags.
- 4.- Les HDL₃ obtingudes del plasma després del consum d'aquesta variant d'oli de gira-sol estan enriquides en àcid oleic i empobrides en àcid linoleic. Per un altre costat, les HDL₃ aïllades després del consum de l'oli de gira-sol sense modificar estan enriquides en àcid linoleic.
- 5.- Les HDL₃ provinents de les dues dietes són semblants en la seva composició química global i en la seva fluïdesa. Aquestes lipoproteïnes desencadenen una efusió similar de colesterol lliure procedent tant dels macròfags com dels fibroblasts.
- 6.- Les HDL₃ natives enriquides en àcid oleic i empobrides en àcid linoleic tenen un grau d'oxidació menor que les HDL₃ natives produïdes per la dieta rica en àcid linoleic.
- 7.- La dieta rica en àcid oleic dóna LDL i HDL₃ amb una susceptibilitat a l'oxidació més reduïda que la dieta rica en àcid linoleic.

- 8.- La susceptibilitat a l'oxidació de les HDL₃ depèn del quocient àcid oleic/àcid linoleic present en els fosfolípids. Un contingut més elevat en àcid oleic enfront de l'àcid linoleic protegeix a les lipoproteïnes de la modificació oxidativa.
- 9.- El contingut de vitamina A és més elevat en les HDL₃ procedents de la dieta rica en àcid oleic, però el fet de la cessió lenta per l'acumulació d'aquesta vitamina impedeix conèixer exactament la seva contribució en la protecció antioxidant.
- 10.- El contingut en vitamina E del plasma, de les LDL o de les HDL₃ és semblant després de les dues dietes, la qual cosa confirma la importància dels altres factors antioxidants enfront de l'estrès oxidatiu.

En resum,

- Els nostres resultats donen suport a la hipòtesi que la dieta rica en àcid oleic augmenta la resistència de les LDL i de les HDL₃ a l'estrès oxidatiu, a igualtat en el contingut d'antioxidants. Aquest efecte explica, almenys parcialment, la menor aterogenicitat lligada a una dieta rica en àcid oleic.
- Les dietes riques en àcid oleic o en àcid linoleic indueixen canvis estructurals i funcionals similars en les principals lipoproteïnes implicades en el transport lipídic i en la formació de la lesió ateromatosa.
- Aquests resultats confirmen els efectes de la dieta en l'oxidació i contribueixen a explicar, així, els mecanismes d'acció dels àcids grassos de la dieta en l'arteriosclerosi.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTES DE LA DIETA EN L'OXIDACIÓ, ELS ANTIOXIDANTS I EL COMPORTAMENT METABÒLIC DE LES LIPOPROTEINES

Maria Teresa Bargalló Escrivà

ISBN:978-84-691-1877-1/DL: T-340-2008

BIBLIOGRAFIA

- Acheson RM, Williams DRR. Does consumption of fruit and vegetables protect against stroke?. *Lancet* 1983; I: 1191-1193.
- Adams CWM, Bayliss OB, Turner DR. Phagocytes, lipid-removal and regression of atheroma. *J Pathol* 1975; 116: 225-238.
- Alaupovic P. Studies of the composition and structure of serum lipoproteins. *Biochemistry* 1966; 5: 4044-4053.
- Arai H, Kita T, Yokode M, Narumiya S, Kawai C. Multiple receptors for modified low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophages: different uptake mechanisms for acetylated and oxidized low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159: 1375-1382.
- Ardlie NG, Selley ML, Simons LA. Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1989; 76: 117-124.
- Ascaso JF, Serrano S, Martínez-Valls J, Arbona C, Carmena R. Efecto del aceite de oliva de la dieta sobre las lipoproteínas plasmáticas de alta densidad. *Rev Clin Esp* 1987; 180: 486-488.
- Aviram M. Platelet-modified low density lipoprotein: studies in normal subjects and in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 1987; 20: 91-95.
- Aviram M, Elias K. Dietary olive oil reduces low-density lipoprotein uptake by macrophages and decreases the susceptibility of the lipoprotein to undergo lipid peroxidation. *Ann Nutr Metab* 1993; 37: 75-84.
- Aviram M, Rosenblat M. Macrophage-mediated oxidation of extracellular low density lipoprotein requires an initial binding of the lipoprotein to its receptor. *J Lipid Res* 1994; 35: 385-398.
- Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G, Quinci GB. Are apolipoproteins better discriminators than lipids for atherosclerosis?. *Lancet* 1979; I: 901-903.

-
- Avogaro P, Bittolo BG, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 79-87.
 - Babiy AV, Gebicki JM, Sullivan DR. Vitamin E content and low density lipoprotein oxidizability induced by free radicals. *Atherosclerosis* 1990; 81: 175-182.
 - Baggio G, Pagnan A, Muraca M, Martini S, Opportuno A, Bonanome A, Ambrosio GB, Ferrari S, Guarini P, Piccolo D, Manzato E, Corrocher R, Crepaldi G. Olive-oil-enriched diet: effect of serum lipoprotein levels and biliary cholesterol saturation. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 960-964.
 - Bailey JM. Regulation of cell cholesterol content. En: *Atherosclerosis: Initiating factors*. Ciba Foundation Symposium n. 12 (New Series). Amsterdam: Elsevier, 1973; pp. 63-92.
 - Bannister JV, Thornalley PJ. The production of hydroxyl radicals by adriamycin in red blood cells. *FEBS Lett* 1983; 157: 170-179.
 - Barenholz Y, Thompson TE. Spingomyelin in bilayers and biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 1980; 604: 129-139.
 - Barrans A, Collet X, Barbaras R, Jaspard B, Manent J, Vieu C, Chap H, Perret B. Hepatic lipase induces the formation of pre- β_1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL₂. A study comparing liver perfusion to *in vitro* incubation with lipases. *J Biol Chem* 1994; 269: 11572-11577.
 - Bates SR, Rothblat GH. Regulation of cellular sterol flux and synthesis by human serum lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1974; 360: 38-55.
 - Baudet MF, Dachet C, Lasserre M, Esteva O, Jacotot B. Modifications in the composition and metabolism properties of human low density and high density lipoproteins by different dietary fats. *J Lipid Res* 1984; 25: 456-468.

-
- Bays HE, Dujovne CA. Antioxidants in the treatment and prevention of atherosclerotic cardiovascular disease. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1993; 5: 166-175.
 - Bedwell S, Dean RT, Jessup W. The action of defined oxygen-centered free radicals on human low-density lipoprotein. *Biochem J* 1989; 262: 707-712.
 - Berkel TJC van, De Rijke YB, Kruijt JK. Different fate *in vivo* of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. *J Biol Chem* 1991; 266: 2282-2289.
 - Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Ramshad B, Esterson M, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 1990; 85: 1260-1266.
 - Berry EM, Eisenberg S, Haratz D, Friedlander Y, Norman Y, Kaufmann NA, Stein Y. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins. The Jerusalem Nutrition study: High MUFAs vs High PUFAs. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 899-907.
 - Berry EM, Eisenberg S, Friedlander Y, Haratz D, Kaufmann NA, Norman Y, Stein Y. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins. The Jerusalem Nutrition Study. II: Monounsaturated fatty acids vs carbohydrates. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 394-403.
 - Bilheimer DW, Eisenberg S, Levy RI. The metabolism of very low density lipoprotein. I. Preliminary *in vitro* and *in vivo* observations. *Biochim Biophys Acta* 1972; 260: 212-221.
 - Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981; 665: 408-419.
 - Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S, Opportuno A, Sorgato F, Dorella M, Maiorino M, Ursini F. Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 529-533.

- Boyd HC, Gown AM, Wolfbauer G, Chait A. Direct evidence for a protein recognized by a monoclonal antibody against oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions from a Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol* 1989; 135: 815-825.
- Boyüm A. Separation of white blood cells. *Nature* 1964; 21:793-794.
- Bradamante S, Barenghi L, Giudici GA, Vergani C. Free radicals promote modifications in plasma high-density lipoprotein: Nuclear magnetic resonance analysis. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 193-203.
- Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 281-291.
- Brown MS, Goldstein JL, Krieger M, Ho YK, Anderson RGW. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J Cell Biol* 1979; 82: 597-613.
- Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 223-261.
- Brussaard JH, Katan MB, Groot PHE, Havekes LM, Hautvast JGAJ. Serum lipoproteins of healthy persons fed a low-fat diet or a polyunsaturated fat diet for three months. *Atherosclerosis* 1982; 42: 205-219.
- Buring JE, O'Connor GT, Goldhaber SZ, Rosner B, Herber PN, Blum CB, Breslow JL, Hennekens CH. Decreased HDL₂ and HDL₃ cholesterol, apo A-I and apo A-II, and increased risk of myocardial infarction. *Circulation* 1992; 85: 22-29.
- Burton GW, Joyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma [Letter]. *Lancet* 1982; II: 327-328.

-
- Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Bases moleculares de la posible contribución de las modificaciones oxidativas de las lipoproteínas a la aterogénesis. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1993; 5: 73-83.
 - Cao YZ, Choy PC, Chan AC. Regulation by vitamin E of phosphatidylcholine metabolism in rat heart. *Biochem J* 1987; 247: 135-140.
 - Cathcart MK, Morel DW, Chisolm GM. Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *J Leukoc Biol* 1985; 38: 341-350.
 - Cathcart MK, McNally AK, Morel DW, Chisholm GM. III. Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin. *J Immunol* 1989; 142: 1963-1969.
 - Catignani GL, Bieri JG. Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin Chem* 1983; 29: 708-712.
 - Chander R, Kapoor NK. High density lipoprotein is a scavenger of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 1663-1665.
 - Chow CK. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 215-232.
 - Clevidence BA, Lehmann J. Alpha- and gamma-tocopherol levels in lipoproteins fractionated by affinity chromatography. *Lipids* 1989; 24: 137-140.
 - Cominacini L, Garbin U, Davoli A, Micciolo R, Bosello O, Gviraghi G, Scuro LA, Pasturino AM. A simple test of predisposition to LDL oxidation based on the fluorescence development during copper-catalyzed oxidative modification. *J Lipid Res* 1991; 32: 349-358.
 - Cookson FB. The origin of foam cells in atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1971; 52: 62.

-
- Cooper RA. Abnormalities of cell membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *N Engl J Med* 1977; 297: 371-377.
 - Cortese C, Levy Y, Januse D. Modes of action of lipid-lowering diets in man: studies of apolipoprotein B kinetics in relation to fat consumption and dietary fatty acid composition. *Eur J Clin Invest* 1983; 13: 79-85.
 - Cosgrove JP, Church DF, Pryor WA. The kinetics of the autooxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 1987; 22: 299-304.
 - Davey-Smith G, Pekkanen J. Should there be a moratorium on the use of cholesterol lowering drugs?. *BMJ* 1992; 304: 431-434.
 - Davies KJA. A secondary antioxidant defense role for proteolytic systems. En: Simic MAG, Taylor KA, Ward JF, ed. *Oxygen radicals in Biology and Medicine*. New York: Plenum Press, 1988; pp. 575-585.
 - Dayton S, Pearce ML, Hashimoto S, Dixon WJ, Tomiyasu U. A controlled clinical trial of diet high unsaturated fat in preventing complications of atherosclerosis. *Circulation* 1969; 40 (Suppl. 11): 58-60.
 - De Backer G, Rosseneu M, Deslypere JP. Discriminative value of lipids and apoproteins in coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1982; 42: 197-203.
 - Deckelbaum RJ, Granot E, Oschry Y, Rose L, Eisenberg S. Plasma triglyceride determines structure-composition in low and high density lipoproteins. *Arteriosclerosis* 1984; 4: 225-231.
 - De Rijke YB, van Berkel TJC. Rat liver Kupffer and endothelial cells express different binding proteins for modified low density lipoproteins. *J Biol Chem* 1994; 269: 824-827.
 - Diplock AT. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr* 1991; 53 (Suppl. 1): 189S-193S.
 - Dole VP. A relation between nonesterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J Clin Invest* 1955; 35: 150-154.

-
- Domagala B, Hartwich J, Szczeklik A. Indices of lipid peroxidation in patients with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *Wien Klin Wochenschr* 1989; 101: 425-428.
 - Doroshov JH. Role of oxygen radical metabolism in the cardiac toxicity of anticancer quinones. En: Vigo-Pelfrey C. Membrane lipid oxidation. Vol. I. Boca Raton: CRC Press, 1990; pp. 303-314.
 - Dreon OM, Vranizan KM, Krauss RM, Austin MA, Wood PD. The effects of polyunsaturated fat vs monounsaturated fat on plasma lipoproteins. *JAMA* 1990; 263: 2462-2466.
 - Duthie GG. Lipid peroxidation. [Review]. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47: 759-764.
 - Eichenberger K, Bohni P, Winterhalter KH, Kawato S, Richter C. Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain. *FEBS Lett* 1982; 142: 59-62.
 - Esterbauer H, Jürgens G, Quehenberger O, Koller E. Autooxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res* 1987; 28: 495-509.
 - Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Res Commun* 1989; 6: 67-75.
 - Esterbauer H, Zollner H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 197-203.
 - Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Jürgens G. Biochemical, structural and functional properties of oxidized LDL. *Chem Res Toxicol* 1990; 3: 77-92.
 - Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341-390.

- Esterbauer H, Jürgens G. Mechanistic and genetic aspects of susceptibility of LDL to oxidation. *Curr Opin Lipidol* 1993; 4: 114-124.
- Esteva O, Baudet MF, Lasserre M, Jacotot B. Influence of fatty acid composition of high density lipoprotein phospholipids on the cholesterol efflux from cultured fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1986; 875: 174-182.
- Everitt BS. Statistical methods for medical investigations. London: Edward Arnold, 1989.
- Fielding PE, Shore VG, Fielding CJ. Lipoprotein lipase. Isolation and characterization of a second enzyme species from postheparin plasma. *Biochemistry* 1977; 16: 1896-1900.
- Fogelman AM, Shechter I, Saeger J, Hokom M, Child JS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2214-2218.
- Folch J, Ascoli I, Lees M, Meath JA, Le Baron FN. Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J Biol Chem* 1951; 191: 833-841.
- Frankel EN. Lipid oxidation. *Prog Lipid Res* 1980; 19: 1-22.
- Frantz I, Dawson E, Ashman P, Gatewood L, Bartsch G, Kuba K, Brewer E. Test of effect of lipid lowering by diet on cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 129-135.
- Fraser GE, Sabaté J, Beeson WL, Strahan M. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1992; 152: 1416-1424.
- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
- Friedman HI, Cardell RR Jr. Morphological evidence for the release of chylomicra from intestinal absorptive cells. *Exp Cell Res* 1972; 75: 57-62.

-
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 242-250.
 - Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 310-318.
 - Geer JC, McGill HC, Strong JP. The fine structure of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1961; 38: 263-287.
 - Gey KF, Brubacher GB, Stahelin HB. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart diseases and cancer. *Am J Clin Nutr* 1987; 45: 1368-1377.
 - Gey KF, Pushka P. Plasma vitamins E and A inversely related to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Ann NY Acad Sci* 1989; 570: 268-282.
 - Glavind J, Hartmann S, Clemmesen J, Jessen KE, Dam H. Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. *APMIS* 1952; 30: 1-6.
 - Glomset JA. The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968; 9: 155-167.
 - Gofman JW, Rubin L, McGinley JP, Jones HB. Hyperlipoproteinemia. *Am J Med* 1954; 17: 514-520.
 - Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977; 46: 897-930.
 - Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 33-37.

- Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol* 1983; 98: 241-260.
- Goldstein JL, Brown MS. Genetics and cardiovascular disease. En: Braunwald E, ed. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia: WB Saunders, 1984; pp. 1606-1640.
- Goldstein JL, Brown MS. Progress in understanding the LDL receptor and HMG CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res* 1984; 25: 1450-1461.
- Granot E, Tamir I, Deckelbaum RJ. Neutral lipid transfer protein does not regulate α -tocopherol transfer between human plasma lipoproteins. *Lipids* 1988; 23: 17-21.
- Grundy SM, Denke MA. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 1990; 31: 1149-1172.
- Gutteridge JMC. Free radical formation and antioxidant protection in extracellular fluids. En: Crastes De Paulet A, ed. *Free radicals, lipoproteins and membrane fluids*. New York: Plenum Press, 1990; p. 371-379.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 1990; 15: 129-135.
- Haberland ME, Fogelman AM. Scavenger receptor-mediated recognition of maleyl bovine plasma albumin and the demaleylated protein in human monocyte macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 2693-2697.
- Halliwell B. Oxygen radicals: a common-sense look at their nature and medical importance. *Med Biol* 1984; 62: 71-77.
- Halliwell B, Grootveld M. The measurement of free radical reactions in humans. *FEBS Lett* 1987; 213: 9-14.
- Halliwell B. Albumin, an important extracellular antioxidant. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 569-571.

-
- Harats D, Ben-Naim D, Dabach Y, Hollander G, Stein O, Stein Y. Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages. *Atherosclerosis* 1989; 79: 245-252.
 - Harland WA, Gilbert JD, Brooks CJW. Lipids of human atheroma. VIII. Oxidised derivatives of cholesteryl linoleate. *Biochim Biophys Acta* 1973; 316: 378-385.
 - Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992; 6: 2675-2683.
 - Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugation separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-1354.
 - Havel RJ, Kane JP, Kashyap ML. Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. *J Clin Invest* 1973; 52: 32-38.
 - Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984; 4: 1890-1894.
 - Heinecke JW, Baker L, Rosen H, Chait A. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1986; 77: 757-761.
 - Hennessy LK, Kunitake ST, Kane JP. Apolipoprotein A-I containing lipoproteins, with or without apolipoprotein A-II, as progenitors of pre- β -high density lipoprotein particles. *Biochemistry* 1993; 32: 5759-5765.
 - Hennig B, Enoch C, Chow CK. Protection by vitamin E against endothelial cell injury by linoleic acid hydroperoxides. *Nutr Res* 1987; 7: 1253-1259.
 - Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: Recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6499-6503.

- Hinsbergh VWM van, Scheffer M van, Havekes L, Kempen HJM. Role of endothelial cells and their products in the modification of low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1986; 878: 49-64.
- Hoff HF, O'Neill J, Chisolm GM, Cole TB, Quehenberger O, Esterbauer H, Jürgens G. Modification of LDL with 4-hydroxynonenal, a propagation product of lipid peroxidation, induces uptake of LDL by macrophages. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 538-549.
- Howard G, Burke GL, Szklo M, Tell GS, Eckfeldt J, Evans G, Heiss G. Active and passive smoking are associated with increased carotid wall thickness. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Intern Med* 1994; 154: 1277-1282.
- Huang Y, von Eckardstein A, Assmann G. Cell-derived unesterified cholesterol cycles between HDLs and LDL for its effective esterification in plasma. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 445-458.
- Hunninghake DB. Lipid disorders. *Med Clin North Am* 1994; 78: 1-67.
- Jäckle S, Huber C, Moestrup S, Gliemann J, Beisiegel U. In vivo removal of β -VLDL, chylomicron remnants, and α_2 -macroglobulin in the rat. *J Lipid Res* 1993; 34: 309-315.
- Jackson RL, Morrisett JD, Gotto AM Jr. Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol Rev* 1976; 56: 259-316.
- Jacotot B, Baudet MF, Lasserre M, Richard JL, Buxtrof JC, Boisnier C, Martin C, Maillé M, Ghembaza T. Olive oil and the lipoprotein metabolism. *Revue Française des Corps Gras* 1988; 35: 51-55.
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540.

-
- Jessup W, Rankin SM, de Whalley CV, Hoult JRS, Scott J, Leake DS. α -Tocopherol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1990; 265: 399-405.
 - Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, Hussain MM, Innerarity TL, Mahley RW. Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 10160-10167.
 - Jonas A. Microviscosity of lipid domains in human serum lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1976; 486: 10-22.
 - Jürgens G, Ashy A, Esterbauer H. Detection of new epitopes formed upon oxidation of low-density lipoprotein, lipoprotein (a) and very-low-density lipoprotein. *Biochem J* 1990; 265: 605-608.
 - Kafatos AG, Christakis G, Hsia SL, Fordyce M, Cassady J, Duncan R. Serum lipid and lipoprotein cholesterol level of 1011 urban Greek children, age 10-14. In: 3rd. International Congress on the biological value of olive oil. Canea, Crete (Grèce), 8-12/9/1980; p. 137.
 - Kalyanaraman B, Antholine WE, Parthasarathy S. Oxidation of low-density lipoprotein by Cu^{2+} and lipoxygenase-An electron spin resonance study. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1035: 286-292.
 - Kannell WB, Gordon T, Castelli WP. Role of lipids and lipoprotein fractions in assessing atherogenesis. The Framingham Study. *Prog Lipid Res* 1981; 20: 339-348.
 - Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1987; 25: 317-364.
 - Keidar S, Brook GJ, Rosenblat M, Fuhrman B, Dankner G, Aviram M. Involvement of the macrophage low density lipoprotein receptor-binding domains in the uptake of oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 484-493.

- Keys A. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 1970; 41 (Suppl. 1): 163-183.
- Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, Kromhout D, Nedeljkovic S, Punsar S, Seccareccia F, Toshima H. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 1986; 124: 903-915.
- Kim JA, Territo MC, Wayner E, Carlos TM, Parhami F, Smith CW, Haberland ME, Fogelman AM, Berliner JA. Partial characterization of leukocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 427-433.
- Kita T, Brown MS, Bilheimer DW, Goldstein JL. Delayed clearance of very low density and intermediate density lipoproteins with enhanced conversion to low density lipoprotein in WHHL rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 5693-5697.
- Kita T, Yokode M, Arai H, Iiyama M, Ueda Y, Ueyama K, Narumiya S. Cigarette smoke, LDL and cholesteryl ester accumulation in macrophages. Implications for atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1993; 686: 91-98.
- Kleinveld HA, Hak-Lemmers HLM, Stalenhoef AFH, Demacker PNM. Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin Chem* 1992; 38: 2066-2072.
- Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, Shatilina LV, Kuzmin AA, Plavinsky SL, Teryukova NP. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis* 1993; 100: 13-18.
- Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains α -helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 1990; 343: 531-535.
- Kojima T, Kikugawa K, Kosugi H. Is the thiobarbituric acid-reactivity of blood plasma specific to lipid peroxidation?. *Chem Pharm Bull* 1990; 38: 3414-3418.

- Kostner GM, Laggner P. Chemical and physical properties of lipoproteins. En: Fruchart JC, Shepherd J. Human plasma lipoproteins. Berlin: Walter De Gruyter, 1989.
- Krauss RM, Burke D. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982; 23: 97-104.
- Kruth HS. Platelet-mediated cholesterol accumulation in cultured aortic smooth muscle cells. *Science* 1985; 227: 1243-1245.
- Kunitake ST, Mendel CM, Hennessy LK. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J Lipid Res* 1992; 33: 1807-1816.
- L'Abbé MR, Trick KD, Beare-Rogers JL. Dietary (n-3) fatty acids affect rat heart, liver and aorta protective enzyme activities and lipid peroxidation. *J Nutr* 1991; 121: 1331-1340.
- Labuza TP. Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Food Technol* 1971; 2: 355-362.
- Langer T, Strober W, Levy RI. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest* 1972; 51:1528-1536.
- La Ville AE, Solà R, Balanyà J, Turner PR, Masana L. *In vitro* oxidised HDL is recognised by the scavenger receptor of macrophages: implications for its protective role *in vivo*. *Atherosclerosis* 1994; 105: 179-189.
- Lawn RM, Wade DP, Hammer RE, Chiesa G, Verstuyft JG, Rubin EM. Atherogenesis in transgenic mice expressing human apolipoprotein(a). *Nature* 1992; 360: 670-672.
- Lee DM. Malondialdehyde formation in stored plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 1663-1672.
- Lehninger A. Lipids, lipoproteins and membranes. En: Lehninger A, ed. Biochemistry. New York: Worth Pub., 1975; pp. 279-308.

- Lewis B, Mann JI, Mancini M. Reducing the risks of coronary heart disease in individuals and in the population. *Lancet* 1986; I: 956-959.
- Lewis L, ed. Handbook of electrophoresis. Boca Raton: CRC Press, 1983.
- Löliger J. The use of antioxidants in foods. En: Aruoma OI, Halliwell B. Free radicals and food additives. London: Taylor & Francis, 1991; pp. 121-150.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Lund-Katz S, Phillips MC. Packing of cholesterol molecules in human high-density lipoproteins. *Biochemistry* 1984; 23: 1130-1138.
- Lyons TJ. Oxidized low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherogenesis in diabetes?. *Diab Med* 1991; 8: 411-419.
- Machlin, LJ, ed. Vitamin E. A comprehensive treatise. New York: Marcel Dekker, 1980.
- Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; 1: 441-445.
- Machlin LJ. Vitamin E. En: Machlin LJ. Handbook of vitamins. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1991.
- Machlin LJ. Implications for the biomedical field. *Toxicol Ind Health* 1993; 9: 383-387.
- Mahley RW, Innerarity TL. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1983; 737: 197-222.
- Maiorino M, Coassin M, Roveri A, Ursini F. Microsomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids* 1989; 24: 721-726.

-
- Maor I, Aviram M. Oxidized low density lipoprotein leads to macrophage accumulation of unesterified cholesterol as a result of lysosomal trapping of the lipoprotein hydrolyzed cholesteryl ester. *J Lipid Res* 1994; 35: 803-819.
 - Marotti KR, Castle CK, Murray RW, Rehberg EF, Polites HG, Melchoir GW. The role of cholesteryl ester transfer protein in primate apolipoprotein A-I metabolism. Insights from studies with transgenic mice. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 736-744.
 - Marques-Vidal P, Azéma C, Collet X, Vieu C, Chap H, Perret B. Hepatic lipase promotes the uptake of HDL esterified cholesterol by the perfused rat liver: a study using reconstituted HDL particles of defined phospholipid composition. *J Lipid Res* 1994; 35: 373-384.
 - Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure and mortality: implications from a cohort of 361662 men. *Lancet* 1986; II: 933-936.
 - Martin W. The combined role of atheroma, cholesterol, platelets, the endothelium and fibrin in heart attacks and strokes. *Med Hypotheses* 1984; 15: 305-322.
 - Masana L, Camprubí M, Sardà P, Solà R, Joven J, Turner PR. The Mediterranean-type diet: is there a need for further modification?. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 886-889.
 - Masana L, Bargalló MT, Plana N, La Ville AE, Casals I, Solà R. Effectiveness of probucol in reducing plasma low density lipoprotein cholesterol oxidation in hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1991; 68: 863-867.
 - Mata P, Álvarez-Sala JL, Rubio MJ, Nuno J, De Oya M. Effects of long-term monounsaturated vs polyunsaturated-enriched diets on lipoproteins in healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 846-850.

- Mata P, de Oya M, Pérez-Jiménez F, Ros Rahola E. Dieta y enfermedades cardiovasculares. Recomendaciones de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1994; 6: 43-61.
- Mataix Verdú FJ, Martínez de Victoria Muñoz E. El aceite de oliva. Bases para el futuro. Jaén: Diputación Provincial, 1988.
- Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma and lipoproteins in man. *J Lipid Res* 1985; 26: 194-202.
- McFarlane AS. The behaviour of ¹²⁵I labelled plasma proteins *in vivo*. *Ann NY Acad Sci* 1957; 132: 6-13.
- Mensink RP, Katan MB. Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low-density and high-density lipoprotein cholesterol in healthy women and men. *N Engl J Med* 1989; 321: 436-441.
- Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 911-919.
- Miettinen M, Turpeinen O, Karvonen MS, Elosuo R, Paavilainen E. Effects of cholesterol lowering diet on mortality from coronary heart disease and other causes-A twelve-year clinical trial in men and women. *Lancet* 1972; 2: 835-838.
- Miller GJ, Miller NE. Plasma high density lipoprotein cholesterol and development of ischaemic heart disease. *Lancet* 1975; 1: 16-19.
- Morel DW, Cathcart MK, Chisolm GM. Cytotoxicity of low density lipoprotein oxidised by cell-generated free radicals. *J Cell Biol* 1983; 97: 427a.
- Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* 1983; 24: 1070-1076.

-
- Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984; 4: 357-364.
 - Morel DW. Reduced cholesterol efflux to mildly oxidized high density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 408-416.
 - Morrisett JD, Jackson RL, Gotto AM Jr. Lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1977; 472: 93-113.
 - Muckle TJ, Nazir DJ. Variation in human blood high-density lipoprotein response to oral vitamin E megadosage. *Am J Clin Pathol* 1989; 91: 165-171.
 - Nagano Y, Arai H, Kita T. High density lipoprotein loses its effect of stimulate efflux of cholesterol from foam cells after oxidative metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6457-6461.
 - Negre-Salvayre A, Alomar Y, Troly M, Salvayre R. Ultraviolet-treated lipoproteins as a model system for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultured cells. III. The protective effect of antioxidants (probucol, catechin, vitamin E) against the cytotoxicity of oxidized LDL occurs in two different ways. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1096: 291-300.
 - Niki E, Kawakami A, Yamamoto Y, Kamiya Y. Oxidation of lipids. VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull Chem Soc Jpn* 1985; 58: 1971-1975.
 - Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 1987; 44: 227-253.
 - Niki E. Lipid antioxidants: how they may act in biological systems. *Br J Cancer [Suppl.]* 1987; 8: 153-157.

- Nishigaki I, Hagihara M, Maseki M, Tomada Y, Nagayoma K, Nakashima T, Yagi K. Effect of linoleic acid hydroperoxide on uptake of low density lipoprotein by cultured smooth muscle cells from rabbit aorta. *Biochem Int* 1984; 8: 501-506.

- Norusis MJ. SPSS/PC+ for IBM PC/XT/AT. Chicago, III: SPSS Inc, 1986.

- O'Brien PJ. Radical formation during the peroxidase catalyzed metabolism of carcinogens and xenobiotics: the reactivity of these radicals with GSH, DNA, and unsaturated lipid. *Free Radic Biol Med* 1988; 4: 169-183.

- Odeleye OE, Watson RR. Health implications of the n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 177-178.

- Ornish D, Brown S, Scherwitz L, Billings J, Armstrong W, Ports T, McLanahan S, Kirkecide R, Brand R, Gould K. Can lifestyle changes reverse coronary heart disease?. The lifestyle heart trial. *Lancet* 1990; 336: 129-133.

- Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1372-1376.

- Palinski W, Ylä-Herttuala S, Rosenfeld ME, Butler SW, Socher SA, Parthasarathy S, Curtiss LK, Witztum JL. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 325-335.

- Parhami F, Fang ZT, Fogelman AM, Andalibi A, Territo MC, Berliner JB. MM-LDL induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cAMP. *J Clin Invest* 1993; 92: 471-478.

- Parthasarathy S, Steinbrecher UP, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Essential role of phospholipase A₂ activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3000-3004.

-
- Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 505-510.
 - Parthasarathy S, Young SG, Witztum JL, Pittman RC, Steinberg D. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoproteins. *J Clin Invest* 1986; 77: 641-644.
 - Parthasarathy S. Oxidation of low-density lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl LDL receptor. *Biochim Biophys Acta* 1987; 917: 337-340.
 - Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D. A role for endothelial cell lipooxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1046-1050.
 - Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1044: 275-283.
 - Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: Implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3894-3898.
 - Parthasarathy S. Novel atherogenic, oxidative modification of low-density lipoprotein. *Diabetes Metab Rev* 1991; 7: 163-171.
 - Paul O. Background of the prevention of cardiovascular disease. II. Arteriosclerosis, hypertension, and selected risk factors. *Circulation* 1989; 80: 206-214.
 - Paul J, Bai NJ, Devi GL. Effect of vitamin E on lipid components of atherogenic rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1989; 59: 35-39.

- Pitas RE, Innerarity KS, Arnold KS, Mahley RW. Rate and equilibrium constants for binding of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins to human fibroblasts. Evidence for multiple receptor binding of apo-E HDL_c. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2311-2315.

- Plana N. Peroxidación lipídica y factores de riesgo cardiovascular. [Tesi doctoral]. Reus: Universitat Rovira i Virgili. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Departament de Medicina i Cirurgia, 1993.

- Polonovski J, Beucler I. Structure et métabolisme des lipoprotéines plasmatiques. *Pathol Biol* 1983; 31: 225-234.

- Porter NA. Autooxidation of polyunsaturated fatty acids: Initiation, propagation, and product distribution (basic chemistry). En: Vigo-Pelfrey C. Membrane lipid oxidation. Vol. I. Boca Raton; CRC Press, 1990; pp. 33-62.

- Pryor WA, Godber SS. Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 177-184.

- Puchois P, Alaupovic P, Fruchart JC. Mise au point sur les classifications des lipoprotéines plasmatiques. *Ann Biol Clin* 1985; 43: 831-840.

- Ratkowsky DA, Evans MA, Alldredge JR. Cross-over experiments: Design, analysis and application. (Statistics: Textbooks and Monographs, 135). New York: Marcel Dekker, 1993.

- Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Alamaza F, Mattson FH, Khoo JC, Steinberg D, Witztum JL. Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification in humans. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 701-706.

- Report of the National Cholesterol Education Program Expert pannel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *Arch Intern Med* 1988; 148: 36-69.

-
- Riccardi G, Rivellese AA. Effects of dietary fiber and carbohydrate on glucose and lipoprotein metabolism in diabetic patients. *Diabetes Care* 1991; 4: 1115-1125.

 - Riemersma RA, Wood DA, Macintyre CC, Elton RA, Gey KF, Oliver MF. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C, and E and carotene [veure comentaris]. *Lancet* 1991; 337: 1-5. Comentari en: *Lancet* 1991; 337: 432-433.

 - Riemersma RA, Wood DA, Macintyre CC, Elton RA, Gey KF, Oliver MF. Anti-oxidants and pro-oxidants in coronary heart disease. *Lancet* 1991; 337: 677. Comentari sobre: *Lancet* 1991; 337: 432-433.

 - Ringer TV, DeLoof MJ, Winterrowd GE, Francom SF, Gaylor SK, Ryan JA, Sanders ME, Hughes GS. Beta-carotene's effects on serum lipoproteins and immunologic indices in humans. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 688-694.

 - Robertson TL, Kato H, Rhoads GG, Kagan A, Marmot M, Syme SL, Gordon T, Worth RH, Belsky JL, Dock DS, Mimyanishi M, Kawahoto S. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaiï and California. Incidence of myocardial infarction and death from coronary heart disease. *Am J Cardiol* 1977; 39: 239-243.

 - Rohrer L, Freeman M, Kodama T, Penman M, Krieger M. Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature* 1990; 343: 570-572.

 - Rosenfeld ME, Palinski W, Ylä-Herttuala S, Butler S, Witztum JL. Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 336-349.

 - Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.

- Rothblat GH, Mahlberg FH, Johnson WJ, Phillips MC. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. *J Lipid Res* 1992; 33: 1091-1097.

- Sabaté J, Fraser GE. Nuts: a new protective food against coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 11-16.

- Sahlin K, Ekberg K, Cizinsky S. Changes in plasma hypoxanthine and free radical markers during exercise in man. *Acta Physiol Scand* 1991; 142: 275-281.

- Salonen JT, Ylä-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyyssönen K, Palinski W, Witztum JL. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992; 339: 883-887.

- Schultz JR, Verstuyft JG, Gong EL, Nichols AV, Rubin EM. Protein composition determines the anti-atherogenic properties of HDL in transgenic mice. *Nature* 1993; 365: 762-764.

- Seelig A, Seelig J. Effect of a single cis-double bond on the structure of a phospholipid bilayer. *Biochemistry* 1977; 16: 45-50.

- Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* 1985; 5: 365-390.

- Sharfstein JM, Sharfstein SS. Campaign contributions from the American Medical Political Action Committee to Members of Congress. For or against the public health?. *N Engl J Med* 1994; 330: 32-37.

- Shepherd J, Packard CJ, Patsch JR, Gotto AM, Taunton OD. Effects of dietary polyunsaturated and saturated fat on the properties of high density lipoproteins and the metabolism of apolipoprotein A-I. *J Clin Invest* 1978; 61: 1582-1592.

- Shinitzky M, Inbar M. Microviscosity parameters and protein mobility in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 1976; 433: 133-149.

-
- Shinitzky M, Barenholz Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarisation. *Biochim Biophys Acta* 1978; 515: 367-394.
 - Shinitzky M, Yuli I. Lipid fluidity at the submacroscopic level: Determination by fluorescence polarization. *Chem Phys Lipids* 1982; 30: 261-275.
 - Shinitzky M. Membrane fluidity in malignancy adversative and recuperative. *Biochim Biophys Acta* 1984; 738: 251-261.
 - Shoukry MI, Gong EL, Nichols AV. Apolipoprotein-lipid association in oxidatively modified HDL and LDL. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1210: 355-360.
 - Skipski VP. Lipid composition of lipoproteins in normal and diseased states. En: Nelson, GJ, ed. *Blood Lipids and Lipoproteins. Quantitation, Composition and Metabolism*. New York: Wiley Interscience, 1972; pp. 471-583.
 - Smith LL. Another cholesterol hypothesis: Cholesterol as antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 47-61.
 - Smoking and Health: Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Services. US Public. Health Service Publication n° 1103, 1964.
 - Solà R, Baudet MF, Motta C, Maillé M, Boisnier C, Jacotot B. Effects of dietary fats on the fluidity of high density lipoprotein: influence of the overall composition and phospholipid fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1043: 43-51.
 - Solà R, Motta C, Maillé M, Bargalló MT, Boisnier C, Richard JL, Jacotot B. Dietary monounsaturated fatty acids enhance cholesterol efflux from fibroblasts. Relation to fluidity, phospholipid fatty acid composition, overall composition, and size of HDL₃. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 958-966.
 - Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A₂ mimics cell-mediated oxidative modification. *J Lipid Res* 1988; 29: 745-753.

- Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989; 264: 2599-2604.
- Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993; 328: 1444-1449.
- Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991; 325: 373-381.
- Stein Y, Glangeaud MC, Fainaru M, Stein O. The removal of cholesterol from aortic smooth muscle cells in culture and Landschutz ascites cells by fractions of human high-density apolipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1975; 380: 106-118.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-924.
- Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DW, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3883-3887.
- Steinbrecher UP. Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1988; 959: 20-30.
- Steinbrecher UP, Lougheed M, Kwan WC, Dirks M. Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation. *J Biol Chem* 1989; 264: 15216-15223.
- Steinbrecher UP, Zhang H, Lougheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 155-168.

-
- Stringer MD, Görög PG, Freeman A, Kakkar VV. Lipid peroxides and atherosclerosis. *Br J Med* 1989; 298: 281-284.
 - Stubbs CD, Kouyama T, Kinoshita KJr, Ikegami A. Effect of double bonds on the dynamic properties of the hydrocarbon region of lecithin bilayers. *Biochemistry* 1981; 20: 4257-4263.
 - Takenaka Y, Miki M, Yasuda H, Mino M. The effect of α -tocopherol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein thiols induced by free radicals generated in different sites. *Arch Biochem Biophys* 1991; 285: 344-350.
 - Tappel AL. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam Horm* 1962; 20: 493-510.
 - Thompson GR. Manual de hiperlipemia [traducción]. Madrid: Jarpyo Editores, 1989.
 - Traber MG, Ingold KU, Burton GW, Kayden HJ. Absorption and transport of deuterium-substituted 2R,4'R,8'R- α -tocopherol in human lipoproteins. *Lipids* 1988; 23: 791-797.
 - Traynham JG. A short guide to nomenclature of radicals, radical ions, iron-oxygen complexes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Free Radic Biol Med* 1986; 2: 191-209.
 - Ulbrich T, Southgate DAT. Coronary Heart Disease: Seven Dietary Factors. *Lancet* 1991; 338: 985-992.
 - Wang X, Liu J, Yokoi I, Kohno M, Mori A. Direct detection of circulating free radicals in the rat using electron spin resonance spectrometry. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 121-126.
 - Warden CH, Hedrick CC, Qiao JH, Castellani LW, Lusis AJ. Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-II. *Science* 1993; 261: 469-472.

-
- Wardlaw GM, Snook JT, Lin M-C, Puangco MA, Kwon JS. Serum lipid and apolipoprotein concentrations in healthy men on diets enriched in either canola oil or safflower oil. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 104-110.

 - Watts G, Lewis B, Brunt J, Lewis E, Coltart D, Smith L, Mann J, Swan A. Effects on coronary artery disease of lipid-lowering diet, or diet plus cholestyramine, in the St. Thomas' Atherosclerosis Regression Study (STARS). *Lancet* 1992; 339: 563-569.

 - Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke SJ. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett* 1985; 187: 33-37.

 - Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Barclay LRC, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-419.

 - Wefers H, Sies H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* 1988; 174: 353-357.

 - Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 1982; 47: 5-18.

 - Whalley CV de, Rankin SM, Houlst JRS, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 1743-1750.

 - Windaus A. Über den Gehalt normaler und atheromatöser Aorten an Cholesterin und Cholesterinestern. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1910; 67: 174-176.

-
- Ylä-Herttuala S, Rosenfeld M, Parthasarathy S, Glass CK, Sigal E, Witztum J, Steinberg D. Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6959-6963.

 - Ziere GJ, Bijsterbosch MK, van Berkef TJ. Removal of 14 N-terminal amino acids of lactoferrin enhances its affinity for parenchymal liver cells and potentiates the inhibition of beta- very low density lipoprotein binding. *J Biol Chem* 1993; 268: 27069-27075.