

## **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 HDL<sub>3</sub>.
3. La composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL<sub>3</sub>.
4. La fluïdesa de les LDL i HDL<sub>3</sub>.
5. La peroxidació lipídica de les HDL<sub>3</sub> natives, així com la susceptibilitat a l'oxidació de les LDL i HDL<sub>3</sub>.
6. La concentració en plasma, LDL i HDL<sub>3</sub> dels antioxidants biològics:  $\alpha$ -tocoferol i  $\beta$ -+ $\gamma$ -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 HDL<sub>3</sub> 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/m<sup>2</sup>.
- 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  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 2 ml NaOH 1N en 2 l  $\text{H}_2\text{O}$ ;
  - $d=1.239$  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  $4^\circ\text{C}$ . Es van recollir 2 ml del sobrenedant corresponent a les VLDL més IDL.

2. Per tal d'obtenir les LDL, l'infranadant 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 HDL<sub>2</sub> (densitat entre 1.063 i 1.125 g/ml) es van obtenir afegint als 2 ml de l'infranadant, 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 HDL<sub>3</sub>, es va portar l'infranadant 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 HDL<sub>3</sub>.
5. Un cop aïllades les LDL i les HDL<sub>3</sub>, cadascuna d'aquestes fraccions va ser rentada per tal d'eliminar les restes d'albumina 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' $\alpha$ -tocoferol, dels isòmers  $\beta$ -+ $\gamma$ -tocoferol i del retinol en el plasma, les LDL i les HDL<sub>3</sub>.
  - 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<sup>R</sup>, i Precinorm<sup>R</sup>. 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:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% en NaOH 0.1 N per a les lipoproteïnes i  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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  $\mu\text{l}$  d'albumina humana al 20% en 8 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  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  $\text{H}_2\text{O}$  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  $\mu\text{l}$  de lipoproteïna o 500  $\mu\text{l}$  del material obtingut de la dissolució de les cèl.lules. Es va ajustar el volum de les lipoproteïnes fins a 200  $\mu\text{l}$  amb  $\text{H}_2\text{O}$  destil.lada.
3. Es van afegir als 200  $\mu\text{l}$  de la solució de les lipoproteïnes o als 500  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub>**

---

##### **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 HDL<sub>3</sub>:**

- 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  $\mu\text{m}$ );
  - Gas vector: Heli a una pressió de 2 kg/cm<sup>2</sup>;
  - 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  $\mu\text{l}$ ;
  - 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  $\mu\text{g}$  de proteïnes de les HDL<sub>3</sub>, 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  $\mu\text{l}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$ , 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 HDL<sub>3</sub>

---

##### 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1 l d' $\text{H}_2\text{O}$  desionitzada i ajustada a pH 7.4;
- Dispersió de DPH: 50 ml de solució PBS, als quals es va addicior 25  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  de LDL o de HDL<sub>3</sub> 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.

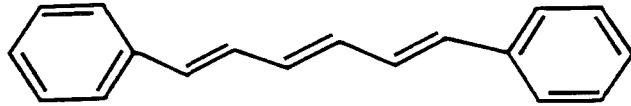


Figura 16.- Estructura de la sonda 1,6-difenil-1,3,5-hexatriè (DPH).

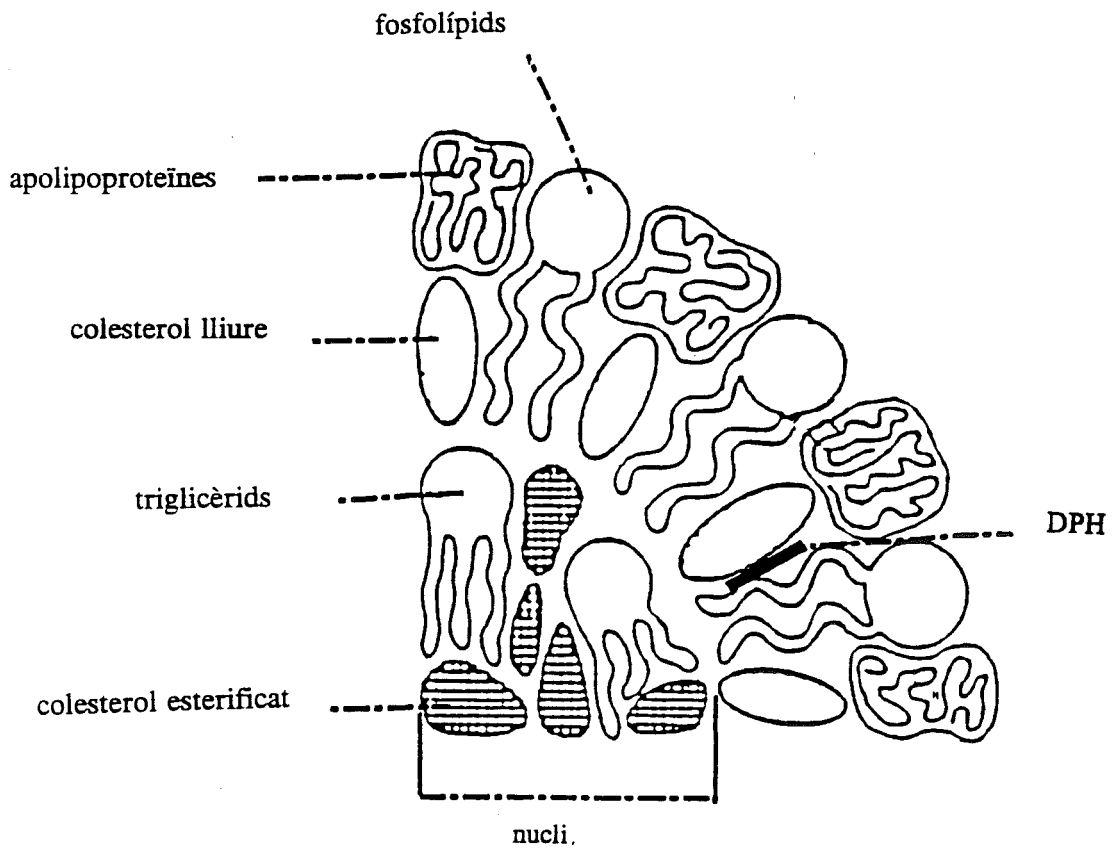


Figura 17.- Posició possible del DPH a la partícula lipoproteica.



#### 4.4.5.- Determinació de les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric (TBARS) en HDL<sub>3</sub> natives, LDL oxidades en Cu<sup>2+</sup> i HDL<sub>3</sub> oxidades en Cu<sup>2+</sup>

---

##### 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 HDL<sub>3</sub> natives, i a les LDL i les HDL<sub>3</sub> sotmeses al procés oxidatiu en la solució de Cu<sup>2+</sup>. 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 HDL<sub>3</sub>:

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 HDL<sub>3</sub>, 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 HDL<sub>3</sub>**

#### 4.4.6.- Susceptibilitat a l'oxidació de les LDL i HDL<sub>3</sub>

##### 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'H<sub>2</sub>O destil.lada a pH 7.4;
- Solució de Cu<sup>2+</sup>: 0.17 g de CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O en 10 ml d'H<sub>2</sub>O destil.lada;
- Tampó d'oxidació: Es van diluir 0.5 ml (0.0085 g) de la solució de Cu<sup>2+</sup> anterior en 5 l de PBS (9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 47 g NaCl en 5 l d'aigua destil.lada), pH 7.4. Es va obtenir una concentració final de 10 μM en Cu<sup>2+</sup>.

El mètode emprat va ser descrit per Shoukry (Shoukry MI *et al*, 1994) per a les LDL; l'adaptació per a les HDL<sub>3</sub> va ser feta per nosaltres:

1. Les alíquotes de LDL i HDL<sub>3</sub> 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  $\mu\text{M}$ , 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' $\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -+ $\gamma$ -tocoferol i retinol en el plasma, les LDL i les HDL<sub>3</sub>

---

##### 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' $\alpha$ -tocoferol (5 g/l);
- Eluent: Metanol/H<sub>2</sub>O, 94/6.

---

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

- Bombes i controlador: Waters 600;
  - Columna: Spherisorb ODS2, 5  $\mu$ , 150 x 4.6 mm (Teknokroma);
  - Fase mòbil: Metanol/H<sub>2</sub>O, 94/6;
  - Flux: 2.5 ml/min;
  - Injecció: Automàtic: WISP 700;
  - Volum d'injecció: 50  $\mu$ 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<sub>x</sub> = 298 nm, E<sub>m</sub> = 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' $\alpha$ -tocoferol es va donar en relació al pic de l'acetat corresponent en el cromatograma; Corba estàndard externa de l'acetat de retinol, retinol,  $\alpha$ -tocoferol i acetat de tocoferol;
  - Estàndard: Acetat de retinol i acetat de tocoferol com a estàndards interns. Retinol, acetat de retinol,  $\alpha$ -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' $\alpha$ -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' $\alpha$ -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  $\mu\text{l}$  de plasma o 200  $\mu\text{l}$  de lipoproteïna, 50  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  d'etanol per tal de precipitar les proteïnes;
2. Es van afegir 100  $\mu\text{l}$  d'hexà per al plasma i 200  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  per al plasma o 150  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  de metanol agitant posteriorment;
7. Es van injectar 50  $\mu\text{l}$  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' $\alpha$ -tocoferol. El coeficient de variació inter-assaig va ser 4.0% per al retinol i del 3.1% per a l' $\alpha$ -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  $^{125}\text{I}$ .*
  - \* *Activitat de receptor depurador dels macròfags.*
- Estudis de l'efusió de colesterol.
  - \* *Obtenció de fibroblasts.*
  - \* *Obtenció de macròfags.*
  - \* *Marcatge del medi de cultiu amb  $^3\text{H}$ -colesterol lliure.*
  - \* *Marcatge de les cèl.lules amb colesterol lliure tritiat.*
  - \* *Incubació de les cèl.lules amb HDL<sub>3</sub>.*
  - \* *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 $^{125}\text{I}$ -Ox<sub>24</sub>-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  $^{125}\text{I}$ . 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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'Na<sub>2</sub>EDTA 0.01M a pH 7.4.
- 

Es va seguir la següent metodologia:

1. Després d'haver separat per ultracentrifugació seqüencial preparativa fins a les HDL<sub>3</sub>, 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 Na<sub>2</sub>EDTA 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  $\text{Cu}^{2+}$  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' $\text{H}_2\text{O}$  destil.lada a pH 7.4;
  - Solució de  $\text{Cu}^{2+}$ : 0.17 g de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 10 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  destil.lada;
  - Tampó d'oxidació: Es van diluir 0.5 ml (0.0085 g  $\text{CuCl}_2$ ) de la solució de  $\text{Cu}^{2+}$  anterior en 5 l de PBS (9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 47 g NaCl en 5 l d'aigua destil.lada), pH 7.4. Es va obtenir una concentració final de 10  $\mu\text{M}$  en  $\text{Cu}^{2+}$ .
- 

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

#### 4.4.8.1.4.- Marcatge de les LDL oxidades amb $^{125}\text{I}$

---

##### 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  $\text{NaIO}_3$ : 99 mg  $\text{NaIO}_3$  en 2 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- Solució d' $\text{ICl}$ : 150 mg NaI en 8 ml HCl 6 N;

Preparació: La solució aquosa de iodat sòdic ( $\text{NaIO}_3$ ) 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  $\mu$ l de tampó glicina i 1  $\mu$ l de  $^{125}I$ .
2. Es va remenar bé i seguidament es van afegir, tot agitant al mateix temps, 200  $\mu$ l d' $ICl$ .
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  $\mu\text{m}$  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% estreptomycina (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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub>. L'efusió es va avaluar com la relació entre la radioactivitat present en el medi que contenia les HDL<sub>3</sub> 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 1 l d'H<sub>2</sub>O desionitzada i ajustada a pH 7.4;
  - Solució tripsina/EDTA: Tripsina 0.05% (Difco, USA) i Na<sub>2</sub>EDTA 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 mm<sup>2</sup>). 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% CO<sub>2</sub> 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 [<sup>3</sup>H]-colesterol lliure

---

##### Solucions:

- Acetona;
  - [7(n)-<sup>3</sup>H]-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)-<sup>3</sup>H]-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 [<sup>3</sup>H]-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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 1 l d'H<sub>2</sub>O 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 [<sup>3</sup>H]-colesterol lliure (5-8 μCi/mmol colesterol).
3. Es van incubar durant 5 dies a 37°C amb 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.4.8.2.5.- Incubació de les cèl.lules amb HDL<sub>3</sub>

---

##### Principi:

Sortida de colesterol lliure tritiat provinent de les cèl.lules, provocada per la presència d'un acceptor extracel.lular de colesterol, com les HDL<sub>3</sub>.

##### Solucions:

- Solució PBS (tampó fosfat): 8 g de NaCl, 2.5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en 1 l d'H<sub>2</sub>O 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> es van filtrar amb un filtre Millex-GV 0.22  $\mu\text{m}$  i es va realitzar la determinació de les proteïnes en una mostra de 20 $\mu\text{l}$ .
4. Es van afegir 50  $\mu\text{g}$  proteïna de HDL<sub>3</sub> 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 CO<sub>2</sub>.

#### 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 cm<sup>3</sup> 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/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 trasferir 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  $\beta$ .

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 HDL<sub>3</sub>. 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  $2 \times 2$ . 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 HDL<sub>2</sub> i HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub>**

Les *Taules 25 i 26* presenten els percentatges dels lípids i apolipoproteïnes de les LDL i de les HDL<sub>3</sub>. Els resultats mostren que no s'observen diferències significatives.

### **5.4.- Composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL<sub>3</sub>**

La *Taula 27* mostra la composició en àcids grassos dels fosfolípids de les HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> obtingudes després de la dieta rica en àcid linoleic ( $p < 0.01$ ). Per altra part, les HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> aïllades després de la dieta rica en àcid oleic mostraven elevacions significatives de l'àcid linolènic, de l'àcid dihomo- $\gamma$ -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 HDL<sub>3</sub>**

Els valors de l'anisotropia de fluorescència ( $r$ ) de les LDL i de les HDL<sub>3</sub>, 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 HDL<sub>3</sub> aïllades després d'ambdues dietes són iguals.

### **5.6.- Concentració de les substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric de les HDL<sub>3</sub> natives**

La *Taula 30* i la *Figura 18* presenta els valors de les mitjanes ( $\pm$  ES) de les TBARS de les HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> i per a la dieta rica en àcid linoleic de 0.42 ( $\pm$  0.08) nmol MDA/mg proteïna HDL<sub>3</sub> ( $p < 0.01$ ).

### **5.7.- Susceptibilitat a l'oxidació de les LDL i de les HDL<sub>3</sub>**

La *Taula 31* mostra les mitjanes ( $\pm$  ES) de les concentracions de les TBARS de les LDL incubades amb Cu<sup>2+</sup> 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 HDL<sub>3</sub> aïllades després de la dieta rica en àcid oleic, quan s'incuben amb Cu<sup>2+</sup>, tenen una mitjana ( $\pm$  ES) de les concentracions de TBARS més baixes que les HDL<sub>3</sub> obtingudes amb la dieta rica en àcid linoleic: 0.75 ( $\pm$  0.06) i 0.95 ( $\pm$  0.07) nmol MDA/mg proteïna HDL<sub>3</sub>, respectivament ( $p < 0.01$ ).

### **5.8.- Nivells de $\alpha$ -tocoferol, $\beta$ -+ $\gamma$ -tocoferol i retinol en plasma, LDL i HDL<sub>3</sub>**

La *Taula 33* dona les concentracions de  $\alpha$ -tocoferol i retinol per al plasma, LDL i HDL<sub>3</sub>. Al mateix temps també dona el percentatge d'isòmers  $\beta$ - i  $\gamma$ - que coelueixen, expressats com a percentatge del pic corresponent a l' $\alpha$ -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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> i les concentracions de peroxidació lipídica de les HDL<sub>3</sub> natives**

Quan es valoren les HDL<sub>3</sub> obtingudes després de les dues dietes, observem que les concentracions de les TBARS de les HDL<sub>3</sub> 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 <sup>125</sup>I-Ox<sub>24</sub>-LDL control**

La *Figura 19* mostra la mitjana ( $\pm$  ES) del percentatge de desplaçament de les <sup>125</sup>I-Ox<sub>24</sub>-LDL control del receptor depurador. La incubació de les LDL de cadascun dels individus després de les dues dietes mostrava un desplaçament similar, 26% ( $\pm 4$ ), de les <sup>125</sup>I-Ox<sub>24</sub>-LDL del receptor depurador de macròfags humans control.

### **5.11.- Efectes de les HDL<sub>3</sub> 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 [<sup>3</sup>H]-colesterol lliure dels fibroblasts, produït per la presència de HDL<sub>3</sub> en el medi de cultiu. Les mitjanes ( $\pm$  ES) de l'efusió provocada per les HDL<sub>3</sub>, 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 [<sup>3</sup>H]-colesterol lliure dels macròfags provocat per les HDL<sub>3</sub> aïllades després de les dues dietes. Com observem, els resultats són semblants, d'un 29% ( $\pm$  5%). Per tant, aquestes HDL<sub>3</sub> 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 <sup>2</sup> )				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**

<b>Àcids grassos</b>	<b>Oli d'oliva</b>	<b>Oli de gira-sol ric en àcid oleic</b>	<b>Oli de gira-sol ric en àcid linoleic</b>
<b>C16:0</b>	10.0	2.0	7.0
<b>C18:0</b>	2.5	2.0	5.0
<b>C18:1,n-9</b>	78.9	86.0	19.0
<b>C18:2,n-6</b>	5.8	8.0	67.0
<b>C18:3,n-3</b>	0.6	0.2	0.2
<b>C20:0</b>	0.4	0.5	0.4
<b>C22:0</b>	0.1	1.0	0.9
<b>C24:0</b>	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
<b>Energia (kcal/dia)</b>	2391.1 ± 116.1	2442.3 ± 108.5	ns	ns	ns
<b>Proteïnes (%)</b>	14.5 ± 0.4	14.4 ± 0.4	ns	ns	ns
<b>Greixos (%)</b>	37.0 ± 1.1	38.9 ± 1.2	ns	ns	ns
<b>Dieta rica en àcid linoleic</b>			ns	ns	ns
<b>AGPI</b>	14.3 ± 0.8	14.6 ± 0.8	ns	ns	ns
<b>AGMI</b>	8.7 ± 0.2	9.1 ± 0.3	ns	ns	ns
<b>AGS</b>	11.4 ± 0.3	12.5 ± 0.8			
<b>Dieta rica en àcid oleic</b>			ns	ns	ns
<b>AGPI</b>	6.5 ± 0.3*	6.1 ± 0.3*	ns	ns	ns
<b>AGMI</b>	17.6 ± 0.8†	18.9 ± 0.7†	ns	ns	ns
<b>AGS</b>	10.4 ± 0.2	11.4 ± 0.8			
<b>Hidrats de carboni (%)</b>	48.5 ± 1.1	46.6 ± 1.1	ns	ns	ns
<b>Colesterol (mg)</b>	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
<b>Colesterol total</b>	176.0 ± 4.7	176.3 ± 4.5	182.6 ± 5.0	ns	ns	ns
<b>Colesterol lliure</b>	48.4 ± 1.3	48.6 ± 1.6	50.6 ± 1.7	ns	0.0001	ns
<b>Colesterol esterificat</b>	127.6 ± 3.5	127.6 ± 3.2	132.1 ± 3.7	ns	ns	ns
<b>Colesterol LDL</b>	110.2 ± 4.6	113.5 ± 4.5	117.0 ± 4.2	ns	0.05	ns
<b>Colesterol HDL</b>	53.9 ± 3.1	52.0 ± 3.0	52.3 ± 3.0	ns	ns	ns
<b>Colesterol HDL<sub>2</sub></b>	14.6 ± 1.1	12.9 ± 0.7	12.5 ± 1.1	ns	0.0001	ns
<b>Colesterol HDL<sub>3</sub></b>	39.4 ± 2.3	39.1 ± 2.4	39.8 ± 2.2	ns	0.0001	ns
<b>Triglicèrids</b>	59.5 ± 3.1	59.0 ± 6.3	67.0 ± 7.0	ns	0.01	ns
<b>Fosfolípids</b>	193.6 ± 5.9	192.9 ± 5.6	204.5 ± 6.0	0.01	ns	ns
<b>Apolipoproteïna A-I</b>	118.2 ± 3.7	142.2 ± 4.0	147.5 ± 4.1	0.05	ns	ns
<b>Apolipoproteïna A-II</b>	26.9 ± 1.0	30.7 ± 0.8	32.1 ± 0.7	0.05	0.001	ns
<b>Apolipoproteïna B</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
<b>Colesterol total</b>	41.30 ± 3.66	40.72 ± 2.93	ns	0.0001	ns
<b>Colesterol lliure</b>	13.73 ± 0.86	12.86 ± 1.50	ns	ns	ns
<b>Colesterol esterificat</b>	27.57 ± 3.20	27.85 ± 2.71	ns	0.0001	ns
<b>Triglicèrids</b>	5.63 ± 0.92	5.86 ± 0.92	ns	0.0001	ns
<b>Fosfolípids</b>	23.60 ± 1.98	23.84 ± 2.25	ns	0.0001	ns
<b>Proteïnes</b>	29.48 ± 2.54	29.59 ± 1.88	ns	ns	ns
<b>Apolipoproteïna B</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 HDL<sub>3</sub>**

(%)	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
<b>Colesterol total</b>	11.62 ± 1.69	11.20 ± 1.56	ns	ns	ns
<b>Colesterol lliure</b>	1.72 ± 0.31	1.73 ± 0.31	ns	ns	ns
<b>Colesterol esterificat</b>	9.92 ± 1.41	9.47 ± 1.31	ns	ns	ns
<b>Triglicèrids</b>	2.28 ± 0.67	2.33 ± 0.54	ns	ns	ns
<b>Fosfolípids</b>	18.74 ± 2.36	18.81 ± 2.02	ns	ns	ns
<b>Proteïnes</b>	67.36 ± 3.88	67.65 ± 3.50	ns	ns	ns
<b>Apolipoproteïna A-I</b>	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 HDL<sub>3</sub>**

%	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
<b>C14:0</b>	0.37 ± 0.09	0.39 ± 0.14	ns	ns	ns
<b>C16:0</b>	25.51 ± 0.99	25.13 ± 1.32	ns	ns	ns
<b>C16:1,n-9</b>	0.31 ± 0.11	0.35 ± 0.11	ns	ns	ns
<b>C18:0</b>	13.21 ± 0.71	12.64 ± 0.94	0.01	ns	ns
<b>C18:1,n-9</b>	8.25 ± 1.20	13.48 ± 2.22	0.01	ns	ns
<b>C18:2,n-6</b>	29.35 ± 3.97	24.11 ± 2.38	0.01	ns	ns
<b>C18:3,n-3</b>	0.14 ± 0.06	0.23 ± 0.12	ns	ns	ns
<b>C20:0</b>	0.37 ± 0.05	0.37 ± 0.04	ns	ns	ns
<b>C20:3,n-6</b>	2.46 ± 1.03	2.77 ± 0.82	ns	ns	ns
<b>C20:4,n-6</b>	9.26 ± 2.03	9.38 ± 1.77	ns	ns	ns
<b>C20:5,n-3</b>	0.60 ± 0.19	0.82 ± 0.26	ns	ns	ns
<b>C22:0</b>	1.04 ± 0.20	0.98 ± 0.16	ns	ns	ns
<b>C22:5,n-3</b>	0.90 ± 0.18	0.90 ± 0.15	ns	ns	ns
<b>C22:6,n-3</b>	4.54 ± 1.24	4.62 ± 1.23	ns	ns	ns
<b>C24:0</b>	1.15 ± 0.13	1.12 ± 0.12	ns	ns	ns
<b>C24:1,n-9</b>	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
<b>r 24°C</b>	0.2771 ± 0.0071	0.2745 ± 0.0078	ns	0.001	ns
<b>r 37°C</b>	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 HDL<sub>3</sub>**

	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
<b>r 24°C</b>	0.2465 ± 0.0067	0.2400 ± 0.0092	ns	ns	ns
<b>r 37°C</b>	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 HDL<sub>3</sub> natives**

(nmol MDA/mg proteïna HDL <sub>3</sub> )	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
<b>HDL<sub>3</sub> natives</b>	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 HDL<sub>3</sub> (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
<b>LDL</b>	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 Cu<sup>2+</sup> 10 µM, a 37°C durant 24 hores.*

**Taula 32.- Susceptibilitat a l'oxidació de les HDL<sub>3</sub>**

(nmol MDA/mg proteïna HDL <sub>3</sub> )	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
<b>HDL<sub>3</sub></b>	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 HDL<sub>3</sub> (mitjana ± ES). Les determinacions s'han realitzat després d'incubar les HDL<sub>3</sub> en una solució de Cu<sup>2+</sup> 10 µM, a 37°C durant 24 hores.*

**Taula 33.- Concentracions d' $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ - i  $\gamma$ -tocoferol i retinol en plasma,  
 LDL i HDL<sub>3</sub>**

	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
<b>Plasma</b>					
$\alpha$ -tocoferol	9.46 ± 1.63	9.58 ± 1.52	ns	0.05	ns
$\beta$ -+ $\gamma$ -tocoferol	4.15 ± 0.62	3.54 ± 0.56	ns	0.05	ns
retinol	369.78 ± 12.03	408.23 ± 20.53	ns	0.05	ns
<b>LDL</b>					
$\alpha$ -tocoferol	3.86 ± 0.40	4.50 ± 0.36	ns	0.05	ns
$\beta$ -+ $\gamma$ -tocoferol	4.54 ± 1.52	3.68 ± 0.60	ns	0.05	ns
retinol	128.90 ± 7.62	127.91 ± 11.35	ns	0.05	ns
<b>HDL<sub>3</sub></b>					
$\alpha$ -tocoferol	1.75 ± 0.59	1.79 ± 0.71	ns	0.05	ns
$\beta$ -+ $\gamma$ -tocoferol	4.23 ± 1.67	3.64 ± 1.23	ns	0.05	ns
retinol	154.10 ± 5.09	185.87 ± 4.52	ns	0.05	0.01*

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

**Taula 34.- Efectes de les HDL<sub>3</sub> en l'efusió de [<sup>3</sup>H]colesterol lliure dels fibroblasts**

	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
<b>HDL<sub>3</sub></b>	26.3 ± 0.7	26.6 ± 0.5	ns	ns	ns

*Els resultats s'expressen com mitjana ± ES.*

**Taula 35.- Efectes de les HDL<sub>3</sub> en l'efusió de [<sup>3</sup>H]colesterol lliure dels macròfags**

	Dieta		Dieta	Seqüència	Dieta vs Seqüència
	Linoleic	Oleic	p	p	p
<b>HDL<sub>3</sub></b>	30.3 ± 0.6	29.5 ± 0.4	ns	ns	ns

*Els resultats s'expressen com mitjana ± ES.*

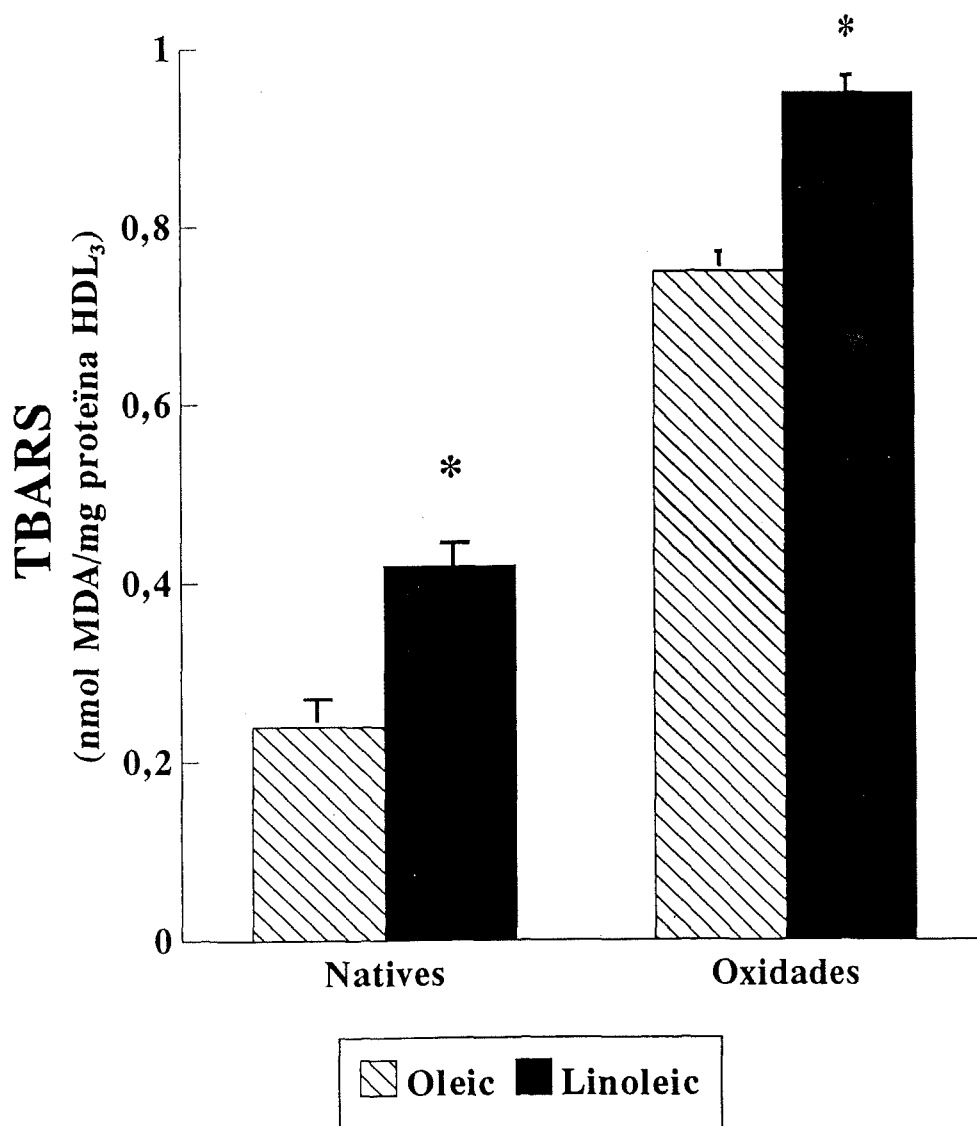


Figura 18.- El gràfic mostra els resultats de la peroxidació lipídica de les HDL<sub>3</sub> natives aïllades després de les dues dietes. La susceptibilitat a l'oxidació de les HDL<sub>3</sub> s'ha realitzat amb una incubació amb Cu<sup>2+</sup> 10 μM, a 37°C durant 24 h.



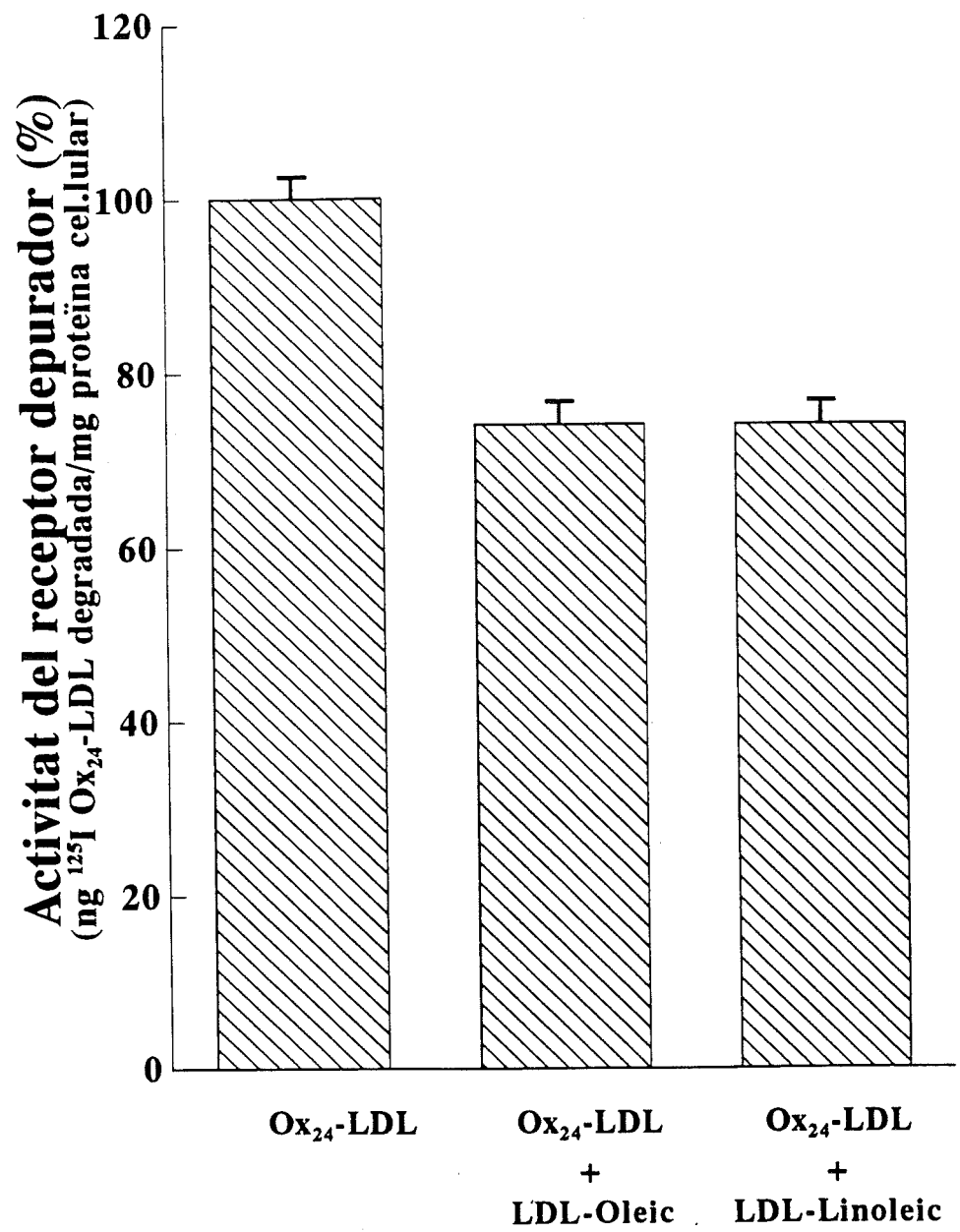


Figura 19.- La degradació de la <sup>125</sup>I-Ox<sub>24</sub>-LDL control es considera el 100% de l'activitat del receptor depurador dels macròfags. Quan s'incuba aquesta LDL oxidada conjuntament amb les LDL obtingudes després de la dieta rica en àcid oleic o en àcid linoleic es donen variacions de la degradació de la <sup>125</sup>I-Ox<sub>24</sub>-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.

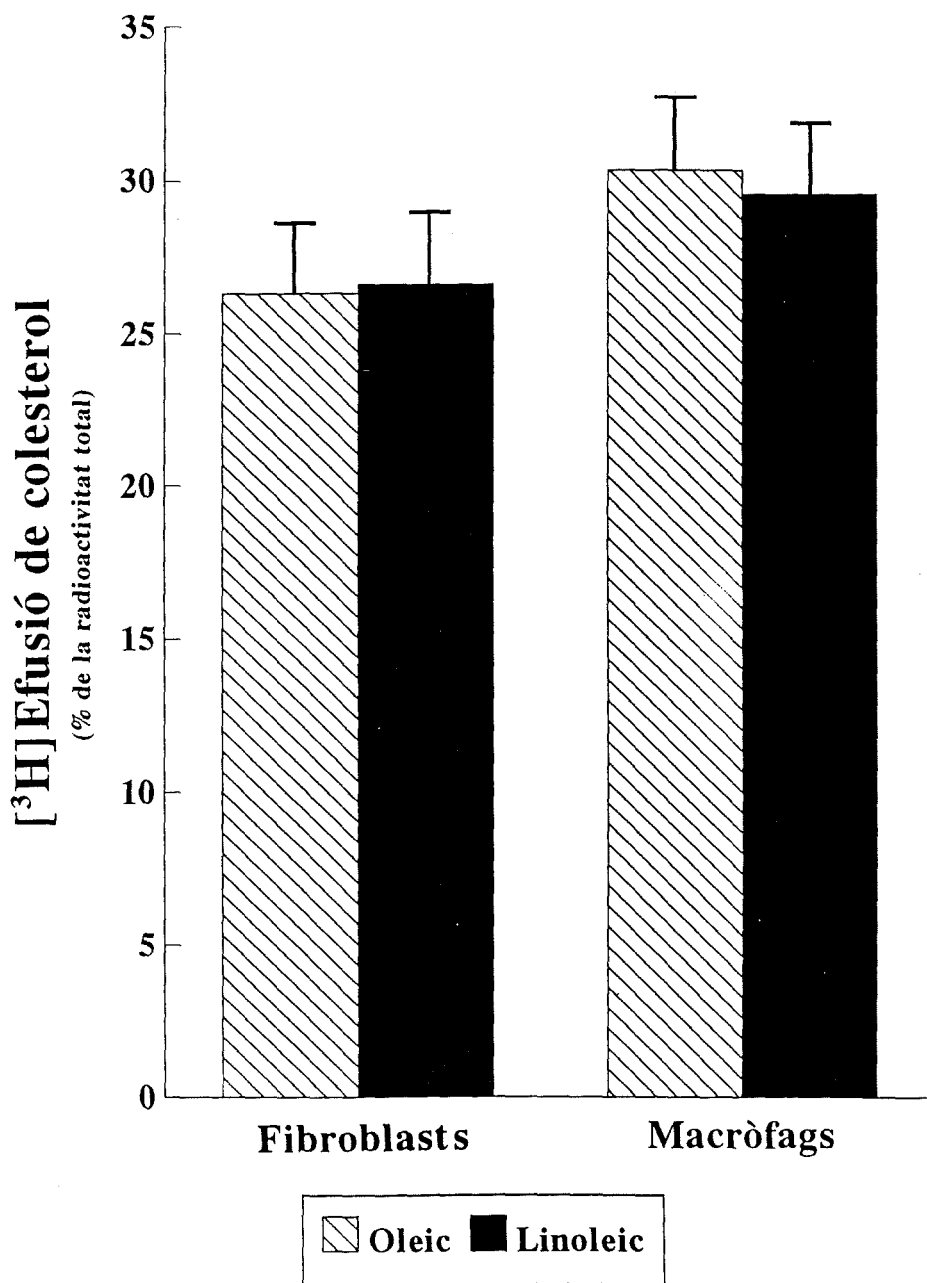


Figura 20.- El gràfic mostra els efectes de les HDL<sub>3</sub> sobre l'efuïó de colesterol en presència de fibroblasts i macròfags. Els resultats s'expressen com el percentatge de la radioactivitat del medi comparada amb la radioactivitat total (medi + intracel.lular).

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 HDL<sub>3</sub>, 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 HDL<sub>3</sub>.

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 HDL<sub>3</sub> i la relació entre ambdós aspectes.
- La peroxidació lipídica de les HDL<sub>3</sub> i la resistència a l'oxidació de les LDL i de les HDL<sub>3</sub>. 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'associï 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, HDL<sub>2</sub> i HDL<sub>3</sub> i, per tant, tampoc en el colesterol de les HDL total. Sorprèn que els canvis de les concentracions de colesterol de les subfraccions HDL<sub>2</sub> i HDL<sub>3</sub> 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 considera 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 HDL<sub>3</sub> 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 <sup>125</sup>I-Ox<sub>24</sub>-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 HDL<sub>3</sub>, 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> obtingudes en el present estudi semblen posseir un comportament metabòlic proper al de les HDL<sub>3</sub> aïllades després de la dieta rica en àcid linoleic de l'anterior treball.

En el segon cas, quan realitzem els estudis posant les HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub>, 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 HDL<sub>3</sub> obtingudes després d'ambdues dietes.

Si comparem la composició química global i la fluïdesa de les HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> obtingudes després de les dues dietes del nostre treball són molt més semblants a les HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub>, 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 HDL<sub>3</sub> són semblants, la qual cosa implica comportaments metabòlics *in vitro* anàlegs.

### **6.3.- Peroxidació lipídica de les HDL<sub>3</sub> i resistència a l'oxidació de les LDL i de les HDL<sub>3</sub>. 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 HDL<sub>3</sub>, 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 Cu<sup>2+</sup> 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 HDL<sub>3</sub>, observació que no havia estat estudiada amb anterioritat.

Els nostres resultats mostren que les HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> amb una menor oxidació en estat natiu i una major resistència a l'oxidació de les LDL i de les HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 Cu<sup>2+</sup>, 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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.

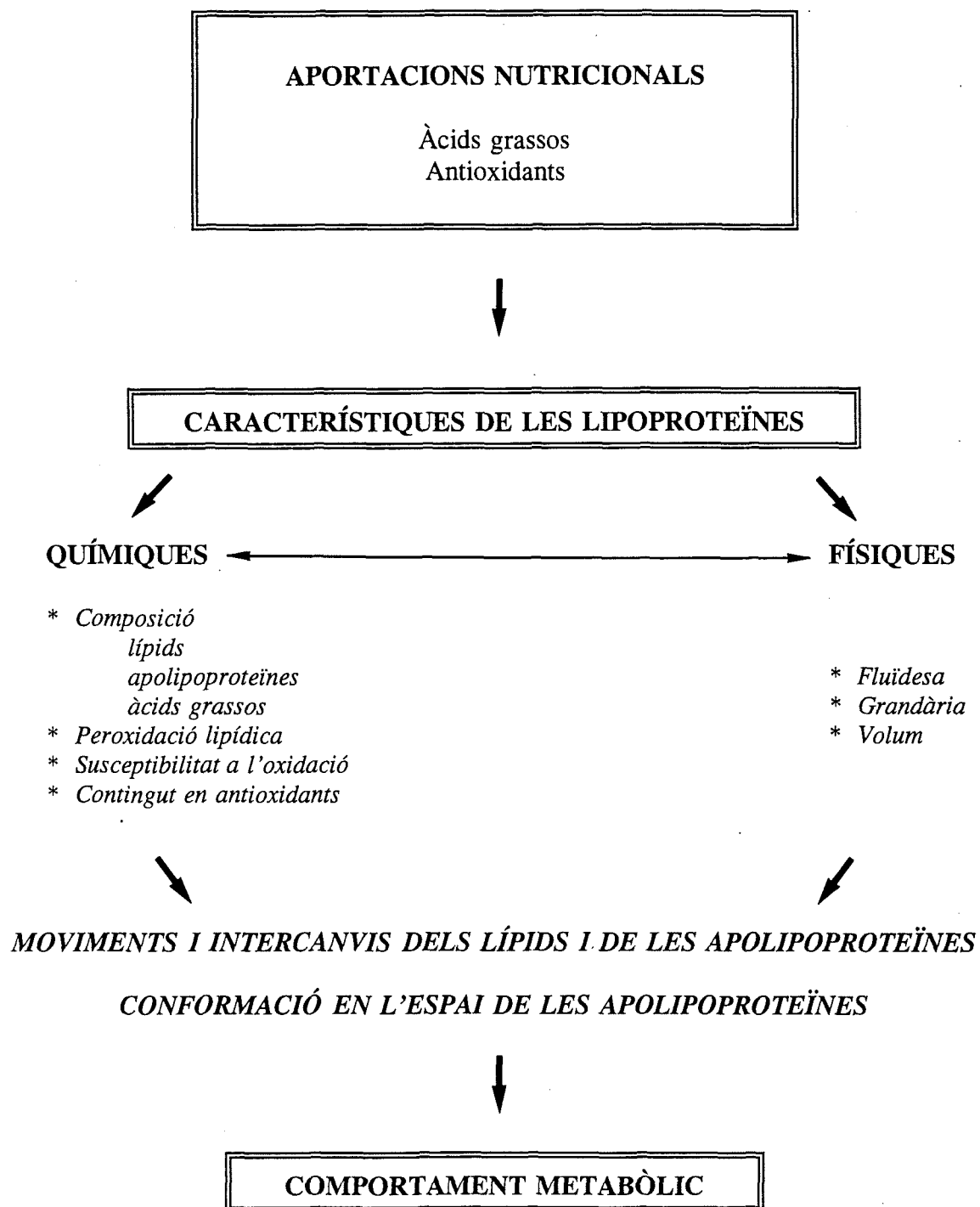


Figura 21.- Esquema d'un nou mecanisme que proposem per a explicar la intervenció de les aportacions nutricionals, tant en àcids grassos com en vitamines antioxidants en l'arteriosclerosi. Aquestes aportacions modifiquen, al mateix temps, les característiques químiques i físiques de les lipoproteïnes. 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 HDL<sub>3</sub>. 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 ( $\beta$ -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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> aïllades després del consum de l'oli de gira-sol sense modificar estan enriquides en àcid linoleic.
- 5.- Les HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> natives enriquides en àcid oleic i empobrides en àcid linoleic tenen un grau d'oxidació menor que les HDL<sub>3</sub> natives produïdes per la dieta rica en àcid linoleic.
- 7.- La dieta rica en àcid oleic dóna LDL i HDL<sub>3</sub> amb una susceptibilitat a l'oxidació més reduïda que la dieta rica en àcid linoleic.

- 8.- La susceptibilitat a l'oxidació de les HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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 HDL<sub>3</sub> 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. Sphingomyelin 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- $\beta_1$  high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL<sub>2</sub>. 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 HDL<sub>2</sub> and HDL<sub>3</sub> 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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- $\beta$ -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  $\beta$ -VLDL, chylomicron remnants, and  $\alpha_2$ -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.  $\alpha$ -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  $\text{Cu}^{2+}$  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  $\alpha$ -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 <sup>125</sup>I 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 A<sub>2</sub> 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<sub>c</sub>. *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 panel 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 HDL<sub>3</sub>. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 958-966.
  - Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A<sub>2</sub> 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  $\alpha$ -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- $\alpha$ -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.