

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

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

Maria Teresa Bargalló Escrivà

Reus, 1994

0072-59660

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

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

+ 31

MARIA TERESA BARGALLÓ ESCRIVÀ

TESI DOCTORAL

DESEMBRE 1994



Als meus pares i a la meva germana

A la Rosa

AGRAÏMENTS

Al Dr. Josep Laporte i Salas,

Al Dr. Claude Motta,

Al Dr. Isidre Casals Ribes,

Al Dr. Josep Maria Olivé Plana,

Al Dr. Jordi Salas Salvadó,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

i de manera molt especial,

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

LLISTA DE FIGURES

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

LLISTA DE TAULES

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

LLISTA D'ABREVIATURES

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

ÍNDEX

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

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

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

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

INTRODUCCIÓ

1.1.- Bases de l'arteriosclerosi

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

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

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

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

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

1.2.- Factors de risc de l'arteriosclerosi

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

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

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

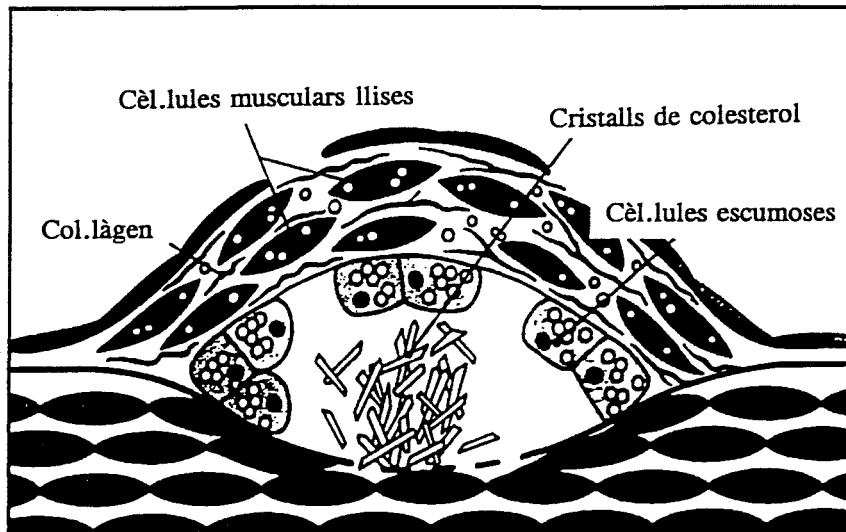


Figura 1.- Esquema d'una placa d'ateroma constituïda per un cor central, que conté cèl·lules escumoses i cristalls de colesterol, i una zona perifèrica formada per col·làgen i cèl·lules musculars llises (Extreta de Thompson GR. Handbook of hyperlipidemias, 1989; p. 94).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.- Lipoproteïnes i metabolisme lipoproteic

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

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

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

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

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

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

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

1.3.2.- Estructura de les lipoproteïnes

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

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

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

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

1.3.3.- Nomenclatura de les lipoproteïnes

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

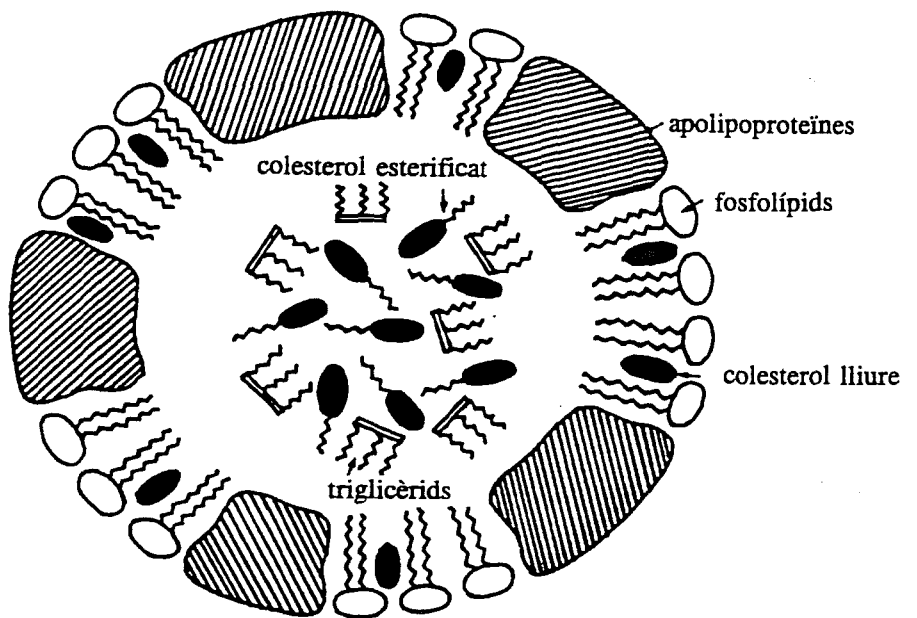


Figura 2.- Estructura d'una HDL.

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

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

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

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

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

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

1.3.4.1.- Característiques químiques

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

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

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

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

1.3.4.1.1.- Composició química global

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

1.3.4.1.2.- Composició en àcids grassos

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

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

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

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

1.3.4.1.2.1.- Definició, estructura i nomenclatura dels àcids grassos

1.3.4.1.2.1.1.- Definició

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

1.3.4.1.2.1.2.- Estructura dels àcids grassos

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

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

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

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

1.3.4.1.2.1.3.- Nomenclatura dels àcids grassos

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

Cx:y,n-m

x: nombre d'àtoms de carboni,

y: nombre de dobles enllaços,

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

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

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

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

Taula 4.- Composició en àcids grassos de les HDL₃

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

1.3.4.1.3.- Composició en apolipoproteïnes

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

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

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

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

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

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

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

1.3.4.2.- Característiques físiques

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

1.3.4.2.1.- Mobilitat electroforètica

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

La migració té lloc de la següent forma:

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

1.3.4.2.2.- Fluïdesa

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

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

Taula 6.- Fluïdesa de les lipoproteïnes humanes

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

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

1.3.4.2.2.1.- Concepte de fluïdesa *optimum*

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

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

1.3.4.2.2.2.- Moduladors de la fluïdesa

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

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

1.3.4.2.2.2.1.- Moduladors químics

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

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

Colesterol

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

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

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

Triglicèrids

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

Fosfolípids

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

Grau d'insaturació dels àcids grassos

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

Proteïnes

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

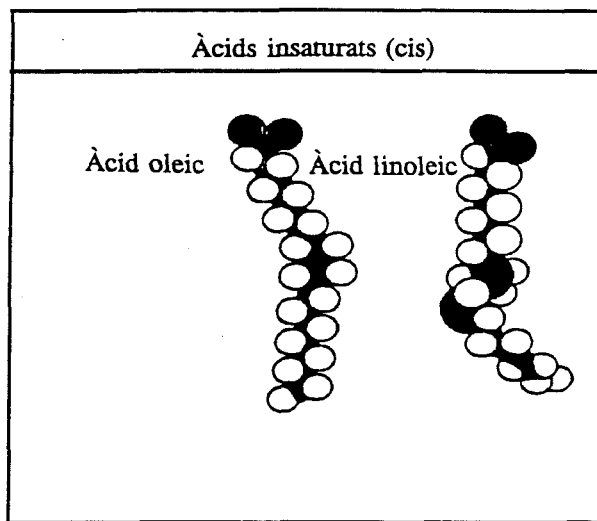


Figura 3.- L'esquema representa l'efecte de la presència d'un o dos dobles enllaços sobre la conformació a l'espai d'un àcid gras, és a dir, sobre el seu volum lliure. Per una longitud de cadena hidrocarbonada igual, els àcids grassos amb un doble enllaç ocupen un volum lliure més petit que si hi ha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

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

1.3.4.2.2.2.- Moduladors físics

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

Els principals moduladors físics són:

- temperatura
- volum.

Temperatura

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

Volum

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

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

V = Volum específic d'un fosfolípid.

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

B = Constant dependent de cada fosfolípid.

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

1.3.4.2.3.- Grandària

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

1.4.- Metabolisme de les lipoproteïnes

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

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

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

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

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

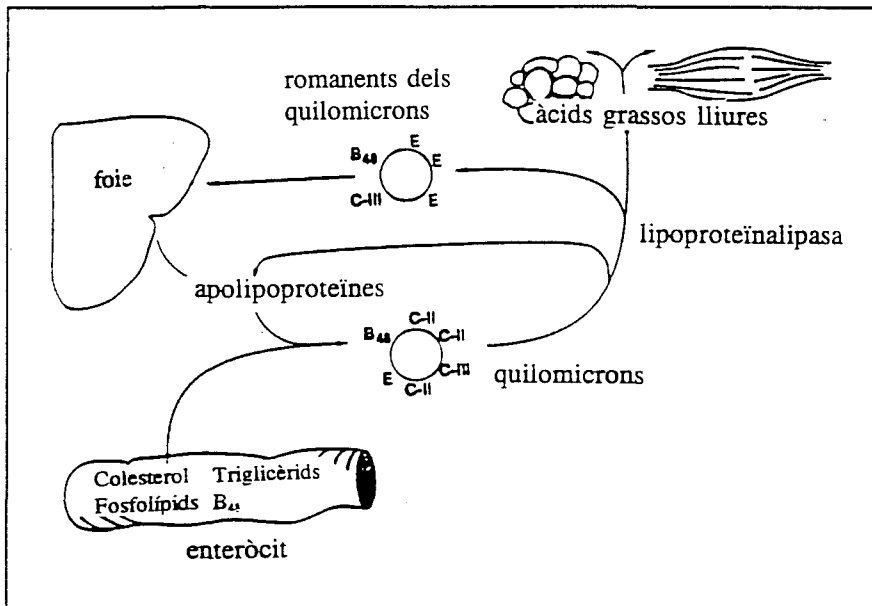


Figura 4.- Esquema del transport dels lípids exògens des de l'intestí vers els teixits perifèrics i el fetge. (Extreta de Hunninghake DB. Med Clin North Am 1994; 78: 1-67).

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

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

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

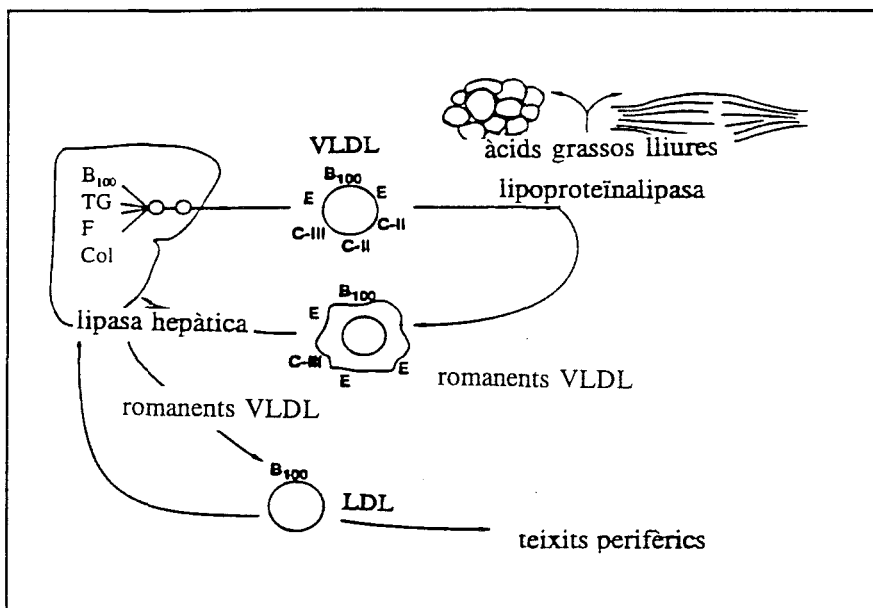


Figura 5.- Esquema del transport endogen dels lípids: en el fetge, els lípids s'associen a les apolipoproteïnes i formen les VLDL. Aquestes VLDL es transformen en romanents de VLDL o en IDL i després en LDL. (Extreta de Hunninghake DB. Med Clin North Am 1994; 78: 1-67).

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

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

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

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

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

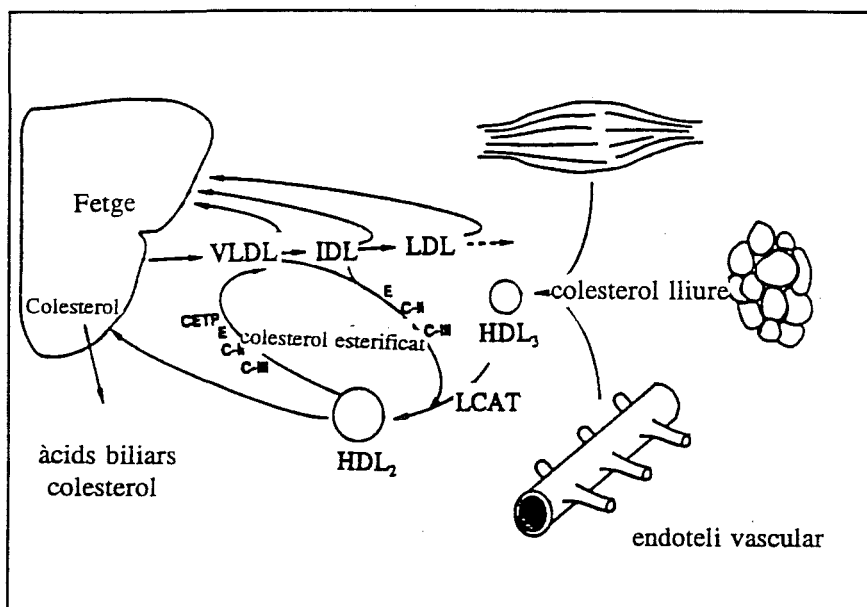


Figura 6.- Esquema del metabolisme de les HDL i del paper d'aquestes lipoproteïnes en el transport invers de colesterol: el colesterol lliure cel.lular es transfereix a les HDL₃. Després de l'esterificació produïda per l'acció de l'enzim LCAT, el colesterol es pot transferir directament a les lipoproteïnes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

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

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

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

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

1.5.- Oxidació lipoproteica

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

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

1.5.1.- Radicals lliures

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

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

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

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

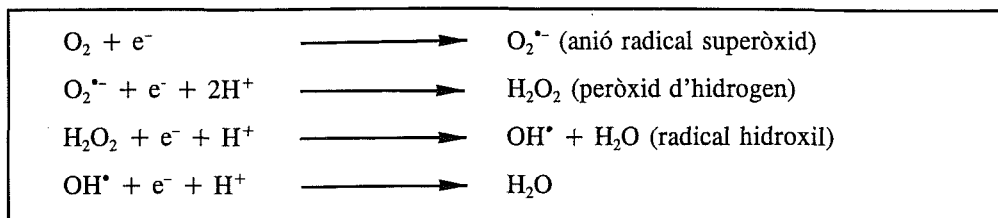
condicions fisiopatològiques, com ara en el trencament o la mort de teixits vius, es poden originar radicals lliures de l'oxigen. Aquests, a diferència de l'oxigen molecular, reaccionen fàcilment amb les molècules que es troben en la seva àrea d'influència (Kanner J *et al*, 1987).

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

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

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

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



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

1.5.3.- Fonts biològiques dels radicals lliures

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

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

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

1.5.4.- Altres fonts de radicals lliures

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

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

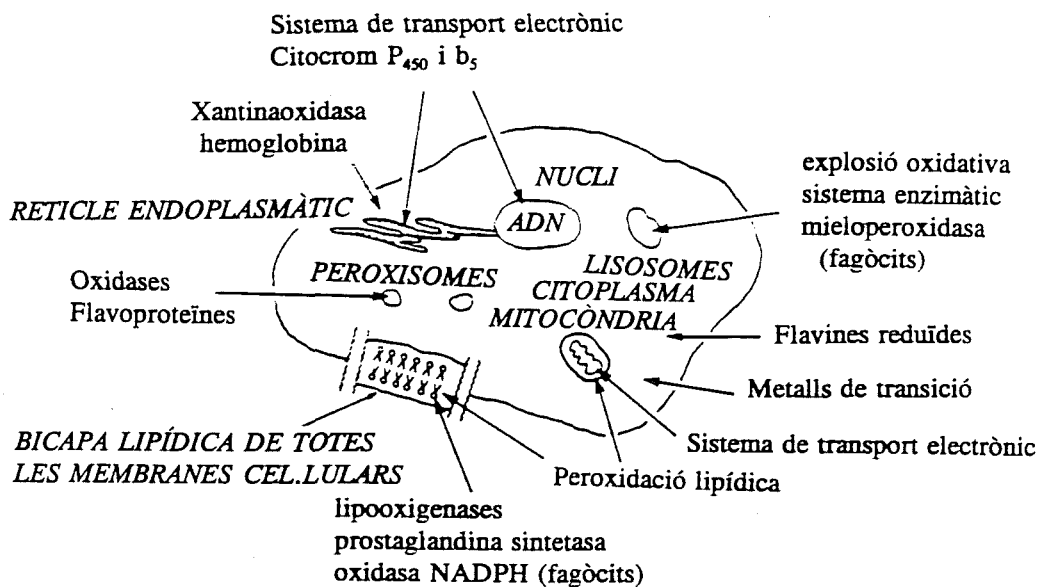


Figura 7.- Fonts intracel·lulars de radicals lliures. (Extreta de Machlin LJ et al. FASEB J 1987; 1: 441-445).

1.5.5.- Punts d'atac dels radicals lliures

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

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

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

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

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

1.5.6.- Estrès oxidatiu

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

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

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

1.5.6.1.- Radicals lliures i cadena de peroxidació lipídica

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

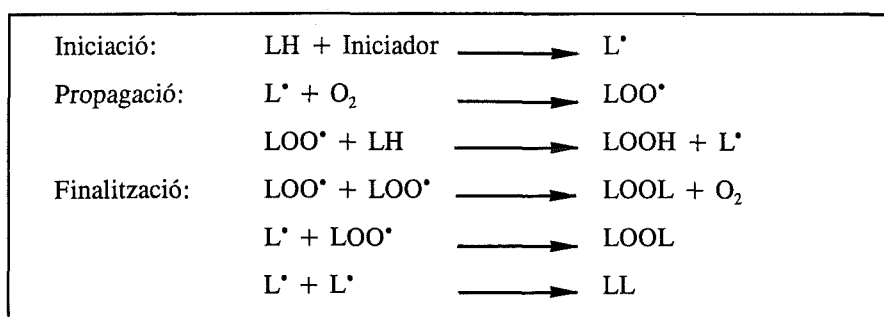
Per un altre costat, la gran reactivitat del radical hidroxil impedeix que el cos l'utilitzi com a substrat. Aquest és el motiu pel qual tots els esforços de la cèl.lula van adreçats a prevenir la seva formació. Això no impedeix que el radical hidroxil es formi, en més o menys quantitat, en la reacció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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

1.5.6.2.- Sistemes antioxidants

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

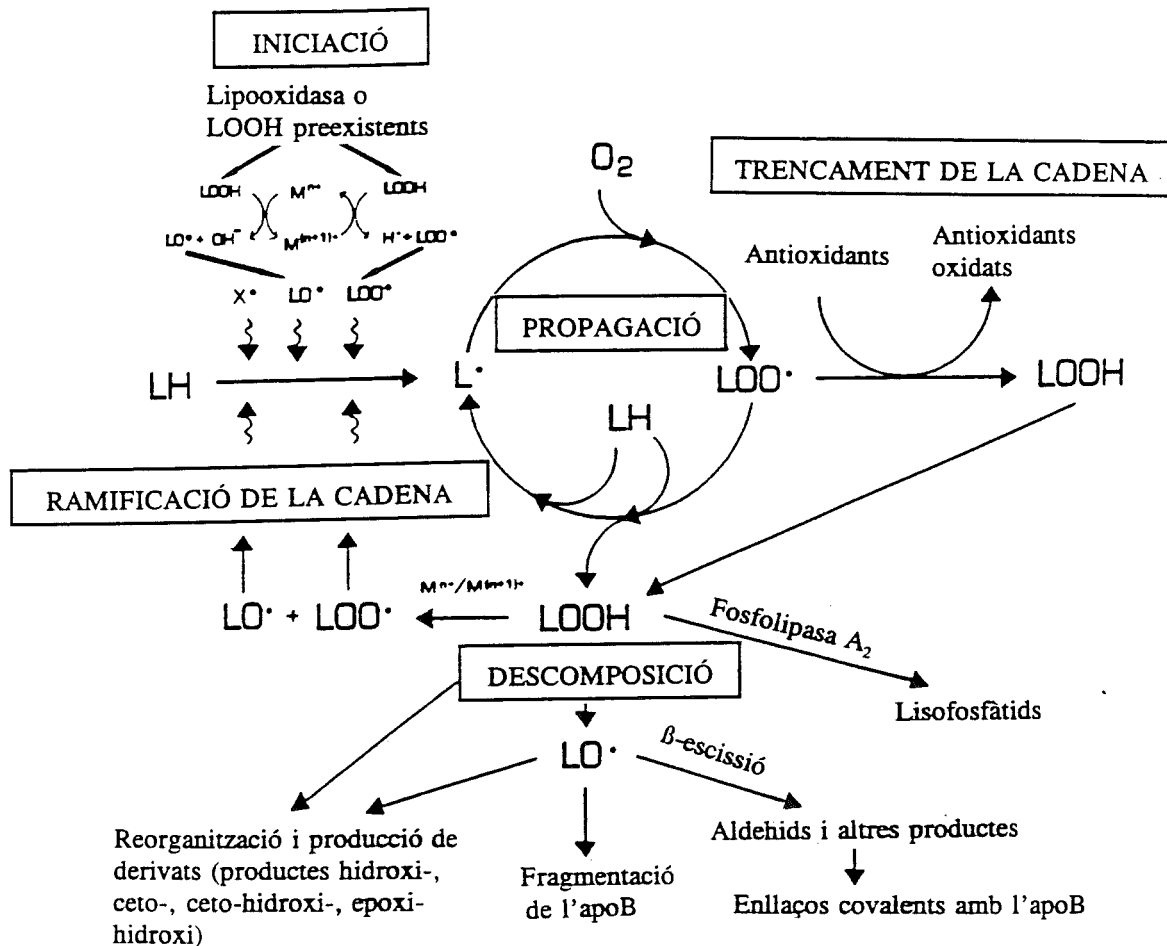


Figura 8.- Esquema que mostra de forma més detallada les diferents fases de la peroxidació lipídica: iniciació, propagació i finalització. L'esquema s'aplica a una LDL però sembla, segons els coneixements actuals, que també correspondria a una HDL. (Extreta de Esterbauer H et al. Free Radic Biol Med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

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

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

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

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

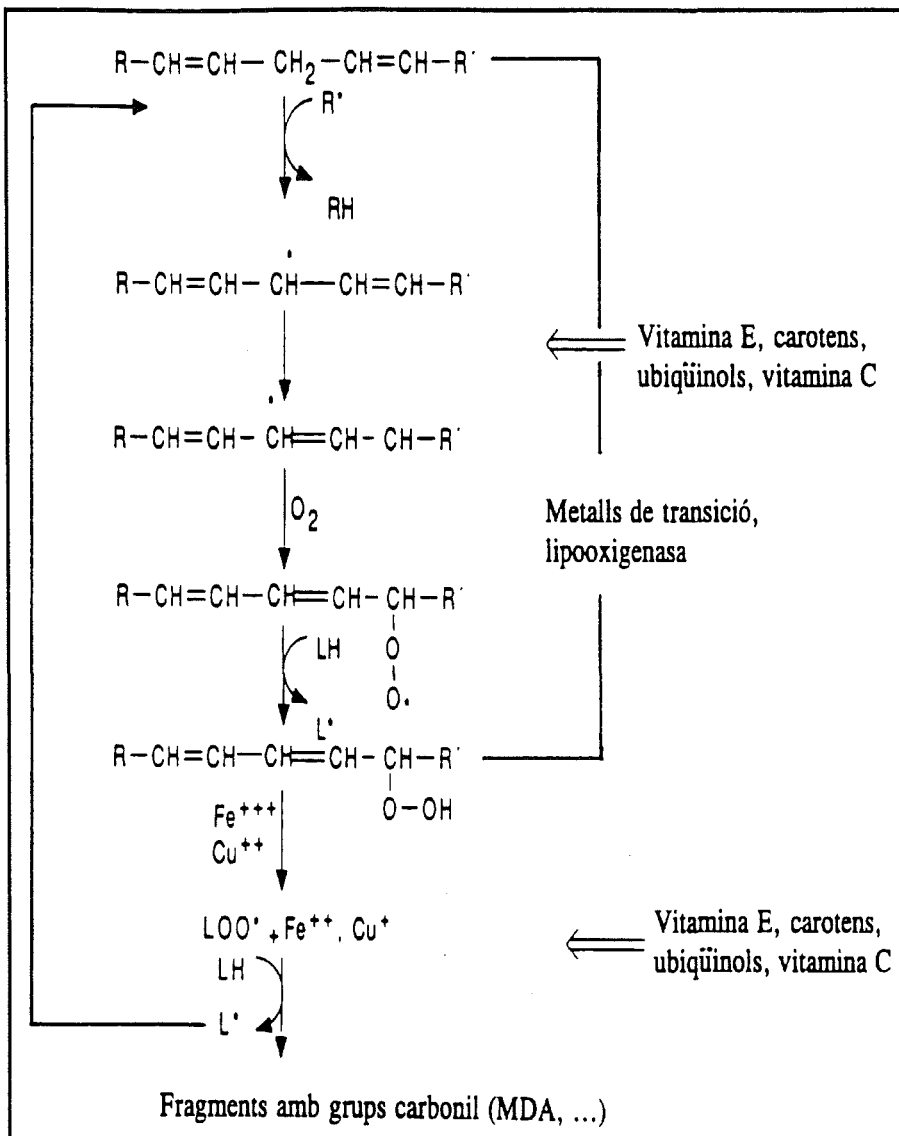


Figura 9.- Possibles mecanismes pels quals els antioxidants com la vitamina E, ubiquinols, carotenoides i vitamina C poden actuar de manera sinèrgica per tal de bloquejar la reacció en cadena (Extreta de Camejo G. Clin Invest Arteriosclerosis 1993; 5: 73-83).

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

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

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

En els propers apartats explicarem les propietats antioxidants de:

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

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

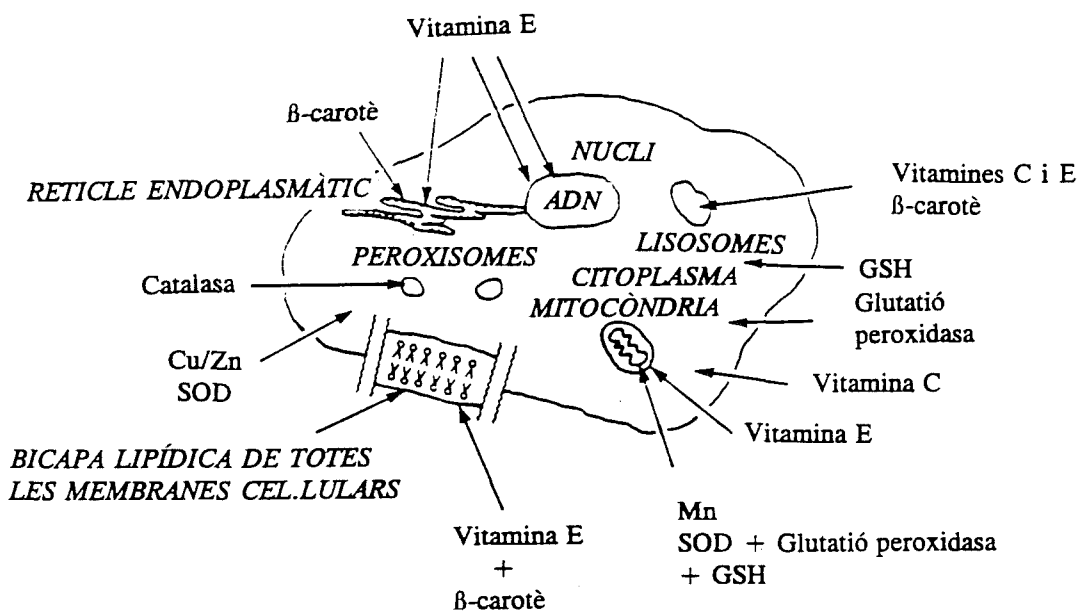


Figura 10.- Protecció antioxidant a l'interior de la cèl.lula. (Extreta de Machlin LJ et al. FASEB J 1987; 1: 441-445).

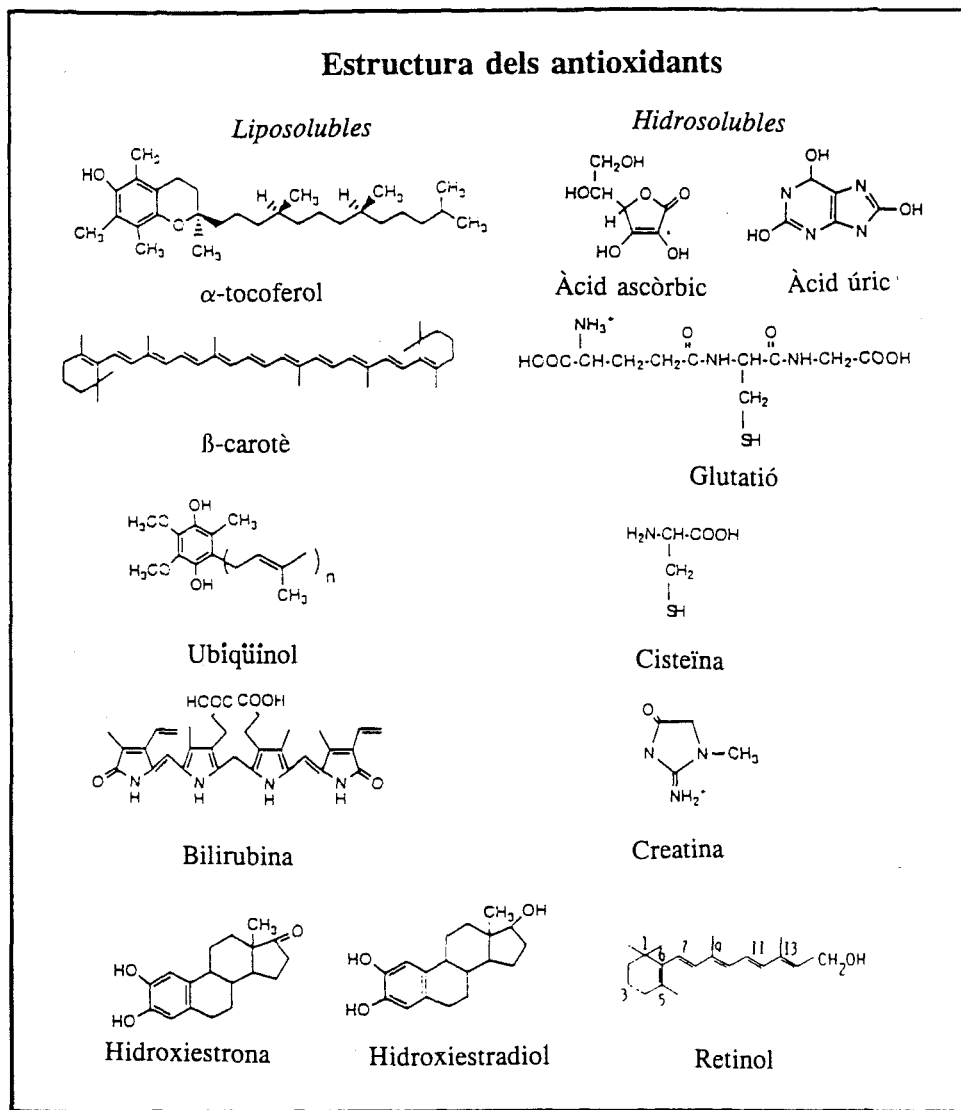


Figura 11.- Estructura química dels antioxidants biològics. (Extreta de Camejo G et al. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1993; 5: 73-83).

1.5.6.2.1.- Enzims

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

1.5.6.2.2.- Elements traça

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

1.5.6.2.3.- Vitamines amb funció antioxidant

1.5.6.2.3.1.- Vitamina E

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

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

Una característica destacable és que són substàncies termolàbils i fotosensibles.

Estructura

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

Transport

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

Funció

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

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

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

1.5.6.2.3.2.- Vitamina C

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

1.5.6.2.3.3.- Vitamina A i carotenoides

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

Funció

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

1.5.6.2.3.4.- Interdependència entre els diversos sistemes antioxidants

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

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

1.5.6.2.4.- Altres antioxidants

1.5.6.2.4.1.- HDL

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

1.5.6.2.4.2.- Colesterol

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

1.5.6.2.5.- Antioxidants existents en el plasma humà

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

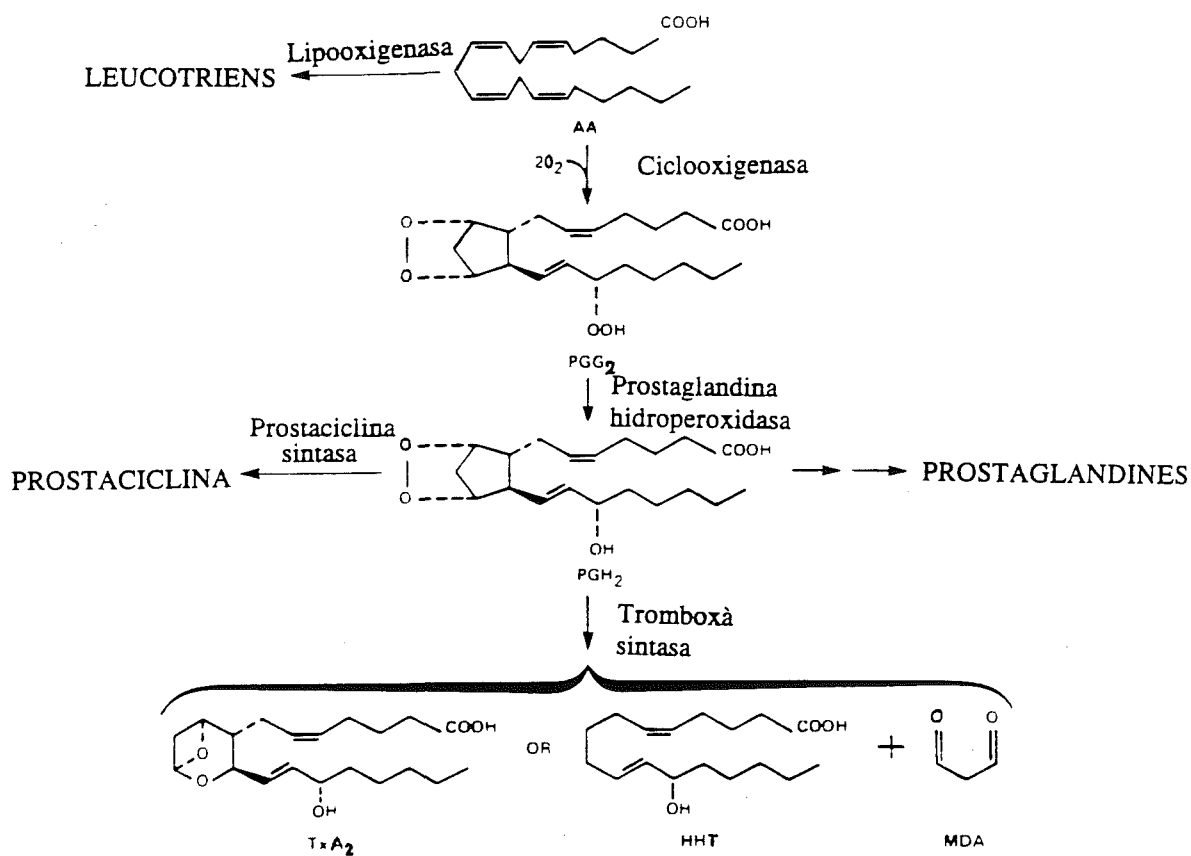


Figura 12.- Formació metabòlica del MDA a partir de l'àcid araquidònic (AA) en la biosíntesi dels eicosanoides. El MDA s'origina com un producte lateral de la conversió enzimàtica de la prostaglandina H₂ (PGH₂) en dos tipus de lípids, el tromboxà A₂ (Tx_A₂) i l'àcid 12(L-)-hidroxi-5,8,10-heptadecatrienoic (HHT). (Extreta de Janero DR. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540).

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

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

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

1.5.7.- Característiques físico-químiques de les lipoproteïnes oxidades

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

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

1.5.7.1.- LDL oxidades

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

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

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

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

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

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

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

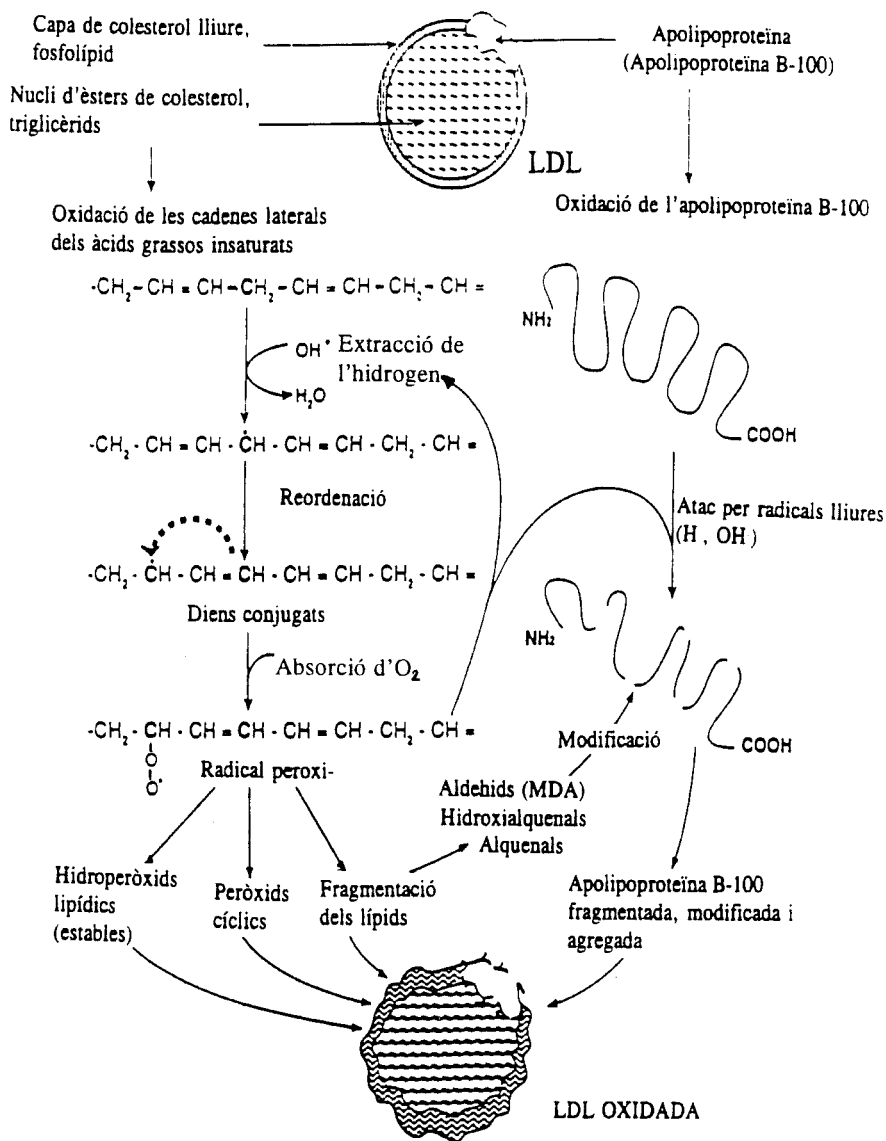


Figura 13.- L'oxidació de les LDL afecta tant els components dels lípids com de les apolipoproteïnes. La cadena de la peroxidació lipídica es representa a la part esquerra. La reordenació dels dobles enllaços dona lloc a una configuració de diens conjugats; la captació posterior d'oxigen portarà a la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

1.5.7.2.- HDL oxidades

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.8.- Susceptibilitat a l'oxidació

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

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

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

1.5.8.1.- Determinació de la susceptibilitat a l'oxidació

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

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

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

A continuació explicarem amb detall els dos mètodes:

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

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

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

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

1.5.8.2.- Interès de la susceptibilitat a l'oxidació

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

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

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

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

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

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

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

1.6.1.- LDL oxidades

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

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

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

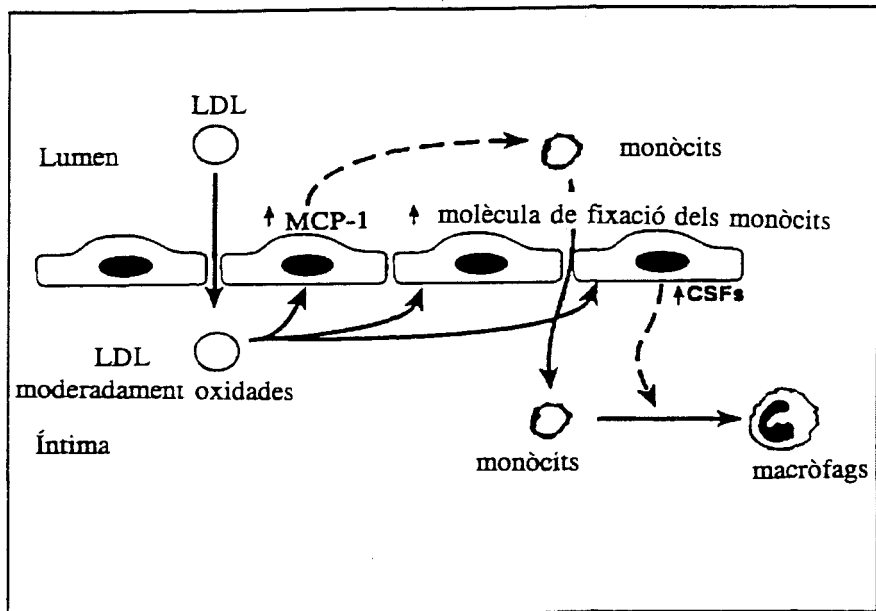


Figura 14.- La figura mostra que les LDL que tenen els àcids grassos peroxidats són encara reconegudes pels receptors cel.lulars. Aquestes LDL mitjanament oxidades estimulen les cèl.lules endotelials, la qual cosa comporta la síntesi de diversos factors aterogènics com ara: la MCP-1 (proteïna-1 quimiotàctica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

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

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

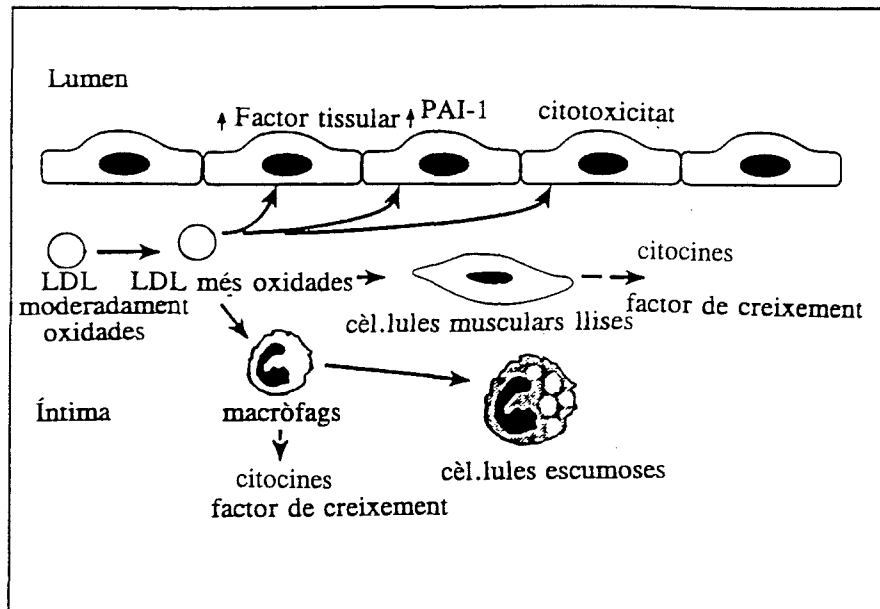


Figura 15.- Aquest esquema ens indica que les LDL més oxidades no són reconegudes pel seu receptor cel.lular i tenen efectes pro-aterogènics: a) aquestes LDL indueixen la trombosi mitjançant l'expressió d'un factor tissular i d'un factor inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI-1) sobre les cèl.lules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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6.2.- HDL oxidades

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

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

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

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

1.7.- Dieta i aterogènesi

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.8.- Dieta, peroxidació lipídica i arteriosclerosi

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Taula 18.- Aliments que són font de carotens

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

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

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

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

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

Taula 20.- Aliments que són font de vitamina E

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A partir d'aquests resultats ens vam preguntar:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A més a més,

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

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

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

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