



Facultat de Biologia

Departament de Fisiologia

OLI DE PEIX I PRODUCCIÓ VASCULAR D'ÒXID NÍTRIC: POSSIBLE PAPER PROTECTOR EN LES LIPOPROTEÏNES

Diego López Martínez

Directora de tesi: Dra. Maria Teresa Mitjavila

OLI DE PEIX I PRODUCCIÓ VASCULAR D'ÒXID NÍTRIC: POSSIBLE PAPER PROTECTOR EN LES LIPOPROTEÏNES

Memòria presentada per
Diego López Martínez

Per optar al grau de
Doctor en Biologia

Programa de doctorat de Fisiologia
Bienni 1998-2000

Tesi doctoral realitzada sota la direcció de

Dra. Maria Teresa Mitjavila Cors
Catedràtica de Fisiologia
Departament de Fisiologia (Divisió III), Facultat de Biologia

Barcelona, juny del 2003

AGRAÏMENTS

Primer de tot, agraeixo a la doctora Maria Teresa Mitjavila el seu treball en la direcció d'aquesta tesi, i la paciència i dedicació per orientar-me en l'estudi del paper dels radicals lliures i dels àcids grassos en diversos sistemes biològics.

També he d'agrair la guia i la col·laboració que en parts substancials d'aquest treball m'han lliurat investigadors d'altres centres: la doctora Catalina Caballero, en els estudis de vasoreactivitat fets en bany d'òrgans; la doctora Mireia Farriol en la valoració de l'expressió de l'ARNm en aorta; la doctora Ana Denicola, de Montevideo, en la difusió de ·NO en les lipoproteïnes; el doctor Juan Ignacio Ruiz Sanz, de la Universitat del País Basc, en la composició en àcids grassos de les lipoproteïnes. I en aquest mateix sentit l'assessorament que m'han ofert els doctors Pere Puig-Parellada i Maria del Puy Sáiz Zabalza.

Part de les proves realitzades no haurien sigut possibles sense el suport dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, i en aquest sentit cal fer esment de la doctora Núria Clos, en l'aplicació de la ressonància de spin electrònic per la mesura de ·NO i de Pilar Fernández per la mesura dels aminoàcids lliures en aorta.

En el desenvolupament dels experiments cal agrair la col·laboració de Xavier Orta, Kelly Casós, Juan Sánchez i Anna Latorre.

També aprofito per agrair a tots els membres del Departament de Fisiologia de la Universitat de Barcelona un ambient de treball agradable i cordial, i a la Universitat de Barcelona per la beca de formació de recerca i docència (BRD).

I, finalment, és clar, a la gent que, des de casa, m'han animat a no llençar la tovallola quan les coses anaven magres.

ÍNDEX

ÍNDIX

ABREVIATURES	13
INTRODUCCIÓ	15
1. Estructura de la paret vascular	17
2. L'aterogènesi	17
2.1. L'aterogènesi i l'estrès oxidatiu	17
2.1.1. Els radicals lliures	17
2.1.2. Factors implicats en les malalties cardiovasculars	20
2.2. Els àcids grassos	23
2.2.1. Característiques	23
2.2.2. Funcions	26
2.2.3. Els àcids grassos poliinsaturats ω -3 i els olis de peix	29
2.3. Les lipoproteïnes	31
2.3.1. Característiques generals	31
2.3.2. Les lipoproteïnes en el procés aterogènic	33
2.3.3. L'oxidació lipídica	34
3. La regulació del to vascular	36
3.1. El \cdot NO en el sistema vascular	36
4. Efectes beneficiosos de l'oli de peix a nivell cardiovascular	40
5. Objectius del present estudi	41
MATERIALS I MÈTODES	43
1. Animals i dietes	45
1.1. Procediment experimental	45
1.2. Valoració de l'índex de peròxids en l'oli	49
2. Estudis en aorta	49
2.1. Preparació de l'aorta	49
2.2. Producció de $O_2^{\cdot-}$ i de $ONOO^-$	50
2.3. Vasoreactivitat d'anells aòrtics	51

2.3.1. Resposta constrictora dels anells a la fenilefrina	51
2.3.2. Vasorelaxació induïda per acetilcolina	52
2.3.3. Vasorelaxació induïda per nitroprussiat sòdic	53
2.4. Assaigs de la NOS	54
2.4.1. Expressió de l'ARNm de eNOS	54
2.4.2. Expressió de la proteïna de eNOS	55
2.4.3. Activitat de la NOS	56
2.5. Producció endotelial de ·NO mitjançant ressonància de spin electrònic (r.s.e.)	57
2.6. El contingut vascular de GMPc	58
2.7. Mesura de la L-arginina i de la L-citrul·lina en la paret de l'aorta	58
2.8. Activitat SOD i catalasa en aorta	59
2.8.1. Activitat SOD	59
2.8.2. Activitat catalasa	60
2.9. Nivells d'α-tocoferol en aorta	60
3. Lipoproteïnes	61
3.1. Obtenció de lipoproteïnes del plasma	61
3.2. Mobilitat electroforètica de les lipoproteïnes	62
3.2.1. Mobilitat electroforètica de lipoproteïnes intactes	62
3.2.2. Mobilitat electroforètica d'apolipoproteïnes de VLDL+LDL	63
3.3. Susceptibilitat de les lipoproteïnes a l'oxidació per CuCl ₂	63
3.4. Capacitat antioxidant de les lipoproteïnes	64
3.4.1. Contingut d'α-tocoferol en lipoproteïnes	64
3.4.2. Capacitat antioxidant total de les lipoproteïnes	65
3.5. Composició en àcids grassos de les lipoproteïnes	65
3.6. Difusió de ·NO al nucli lipídic de les lipoproteïnes	66
4. Anàlisi estadística	67
 RESULTATS	 69
1. Consum de pinso i evolució del creixement de les rates	71
2. Estudis en aorta	73

2.1. Producció de $O_2^{\cdot-}$ i de $ONOO^-$	73
2.2. Vasoreactivitat dels anells aòrtics	74
2.2.1. Resposta constrictora dels anells a la fenilefrina	74
2.2.2. Vasorelaxació induïda per acetilcolina	77
2.2.3. Vasorelaxació induïda per nitroprussiat sòdic	81
2.3. Assaigs de la NOS	83
2.3.1. Expressió de l'ARNm de eNOS	83
2.3.2. Expressió de la proteïna de eNOS	84
2.3.3. Activitat de la NOS	85
2.4. Producció endotelial de $\cdot NO$ mitjançant ressonància de spin electrònic (r.s.e.)	86
2.5. El contingut vascular de $GMPC$	88
2.6. Mesura de la L-arginina i de la L-citrul·lina en aorta	89
2.7. Activitat SOD i catalasa en aorta	90
2.8. Nivells d' α -tocoferol en aorta	92
3. Lipoproteïnes	93
3.1. Nivells plasmàtics de lipoproteïnes	93
3.2. Mobilitat electroforètica de les lipoproteïnes	94
3.2.1. Mobilitat electroforètica de lipoproteïnes intactes	94
3.2.2. Mobilitat electroforètica d'apolipoproteïnes de VLDL+LDL	95
3.3. Susceptibilitat de les lipoproteïnes a l'oxidació per $CuCl_2$	96
3.4. Capacitat antioxidant de les lipoproteïnes	96
3.4.1. Contingut d' α -tocoferol en lipoproteïnes	96
3.4.2. Capacitat antioxidant total de les lipoproteïnes	97
3.5. Composició en àcids grassos de les lipoproteïnes	97
3.6. Difusió de $\cdot NO$ a lipoproteïnes	99
DISCUSSIÓ	101
CONCLUSIONS	113
BIBLIOGRAFIA	117

ABREVIATURES

AA: àcid araquidònic.

AGMI: àcids grassos monoinsaturats.

AGPI: àcids grassos poliinsaturats.

AGS: àcids grassos saturats.

BH₄: tetrahidrobiopterina.

BHT: 2, [6]-di-tert-butil-p-cresol.

CaM: calmodulina.

CE₅₀: concentració eficaç 50.

CMC: concentració micel·lar crítica.

Cp: punt d'inflexió de la fluorescència deguda a l'amplificació en la RT/PCR.

DETC: àcid dietilditiocarbàmic.

DHA: àcid docosahexanoic.

EDHF: factor hiperopolaritzador derivat d'endoteli.

EPA: àcid eicosapentanoic.

GAPDH: gliceraldehid fosfat deshidrogenasa.

GCs: guanilat ciclase soluble.

GSHPX: glutatió-peroxidasa.

HDL: lipoproteïnes d'alta densitat.

HOCl: hipoclorit.

H₂O₂: peròxid d'hidrogen.

IDE: índex de dobles enllaços.

IDE:AGS: índex d'insaturació.

IDL: lipoproteïnes de densitat intermèdia.

IP: índex de peròxids.

L·: radical lipídic centrat en carboni.

LDL: lipoproteïnes de baixa densitat.

L-NAME: L-N-arginina-metilester.

L-NMMA: L-N-monometil-arginina.

L-NNA: L-N-nitro-arginina.
LO: lipoxigenasa.
LOO·: radical lipoperoxil.
LOOH: peròxid lipídic.
LT: leucotriè.
MDA: malondialdehid.
·NO: òxid nítric o monòxid de nitrogen.
NOS: òxid nítric sintasa.
O₂^{·-}: anió radical superòxid
OB: oli de blat de moro.
OB-A: dieta suplementada amb oli de blat de moro i amb L-arginina.
·OH: radical hidroxil.
OP: oli de peix.
OP-A: dieta suplementada amb oli de peix i amb L-arginina.
QM: quilomicrons.
PG: prostaglandina.
PGI₂: prostaglandina I₂, prostaciclina.
PKG: proteïna cinasa G.
PLA₂: fosfolipasa A₂.
PMCho: 1-(pirenil)-metil-3-(9-octadecenoiloxi)-22,23-bisnor-5-colenat.
r.s.e.: ressonància de spin electrònic.
RT/PCR: reacció en cadena de la polimerasa amb pas previ de transcripció reversa.
SDS-PAGE: gel d'electroforesi de poliacrilamida amb duodecil-sulfat de sodi.
SOD: superòxid dismutasa.
TX: tromboxà.
VLDL: lipoproteïnes de molt baixa densitat.

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. Estructura de la paret vascular

Dins el sistema circulatori, el sistema arterial és el reservori de pressió que permet que la sang circuli des del cor fins al sistema capilar. La sortida discontinua de sang des del cor es transforma en el sistema arterial en un flux sanguini constant en els capilars.

La paret de les artèries es compon de tres capes:

- capa endotelial o túnica íntima. És la capa que es troba en contacte directe amb la llum del vas. Està constituïda per una monocapa de cèl·lules (endoteli). Sota les cèl·lules endotelials s'hi troba una làmina basal. A banda de les funcions estructurals i de transport, també participa en la regulació de les funcions arterials i sanguínies.
- capa muscular o túnica mitjana. És la que constitueix fonamentalment la paret vascular. Hi trobem cèl·lules musculars llises i fibres elàstiques. En els grans vasos, el component elàstic té una gran importància, i aquesta disminueix a mesura que ho fa el diàmetre arterial.
- capa connectiva o túnica adventícia. És la capa que limita la musculatura arterial, i que connecta l'artèria amb les estructures anatòmiques veïnes.

2. L'aterogènesi

2.1. L'aterogènesi i l'estrès oxidatiu

2.1.1. Els radicals lliures

Un **radical lliure** és una espècie química capaç d'existència independent que conté un o més orbitals ocupats per un sol electró. Es diu que aquests electrons són desaparellats, i

INTRODUCCIÓ

s'assenyalen en la notació química amb un punt (\cdot). Segons on es trobi l'electró desaparellat, hom parla de radicals centrats en carboni, centrats en oxigen, en nitrogen, en sofre, en hidrogen, etc.

La tendència dels electrons desaparellats a formar enllaços covalents fa que els radicals lliures siguin espècies químiques en general molt reactives i de curta vida mitjana. Quan dos radicals lliures reaccionen entre ells, els productes són no-radicals, degut a l'aparellament dels electrons. Quan, en canvi, un radical reacciona amb un no-radical, entre els productes hi apareix una nova espècie radicalària.

El terme d'espècies reactives d'oxigen inclou diferents espècies químiques, radicalàries i no-radicalàries. Entre les espècies reactives no-radicalàries, hi destaca el peròxid d'hidrogen. Similarment, es parla d'espècies reactives de nitrogen.

Entre les fonts de radicals lliures i d'espècies reactives d'oxigen a l'organisme destaca la generació d'anió-radical superòxid ($O_2^{\cdot-}$) com a subproducte de la cadena respiratòria mitocondrial. També en són una font, localitzada bàsicament a la pell, les radiacions electromagnètiques ionitzants, que produeixen radicals lliures a través de la fotolisi de l'aigua. En altres casos, la síntesi d'espècies reactives es troba relacionada amb funcions específiques: antimicrobianes ($O_2^{\cdot-}$, peròxid d'hidrogen (H_2O_2), òxid nítric ($\cdot NO$) i hipoclorit ($HOCl$) per part de cèl·lules immunitàries), reguladores ($\cdot NO$ com a mediador vascular i com a neurotransmissor), etc. Determinades vies metabòliques, com la dels eicosanoids, produeixen peròxids. La xantina deshidrogenasa, quan es veu transformada en xantina oxidasa, esdevé un enzim generador de $O_2^{\cdot-}$. Aquesta generació de radicals lliures és compensada per tota una sèrie de mecanismes antioxidants.

Es considera **antioxidant** tot factor que eviti l'oxidació d'una biomolècula. Les substàncies antioxidants són aquelles que, a petites concentracions, contraresten o impedeixen l'oxidació d'un substrate. En aquest sentit, petita concentració vol dir una concentració relativament menor al substrate damunt el qual s'exerceix l'efecte antioxidant. La capacitat antioxidant no sols depèn de la substància antioxidant, sinó també del tipus de procés oxidatiu i del substrat oxidable.

Hi ha antioxidants enzimàtics i no-enzimàtics. Així la major part del $O_2^{\cdot-}$ que genera l'organisme, és eliminat per la superòxid dismutasa (SOD), que el transforma en H_2O_2 que, al seu torn, és eliminat per la catalasa o per les peroxidases. D'altra banda, tot un seguit de substàncies, com el tocoferol, el retinol, l'ascòrbic, tenen una actuació antioxidant en reaccionar amb substrats oxidats. Donada la importància dels metalls de transició en la formació del radical hidroxil ($\cdot OH$), els mecanismes d'emmagatzematge i de transport de ferro poden considerar-se també factors antioxidants.

A banda dels mecanismes antioxidants, hi ha tota una sèrie de mecanismes reparadors que corregeixen el dany oxidatiu generat per l'atac radicalari a les biomolècules.

Les SOD constitueixen un grup d'enzims. Als mitocondris trobem la MnSOD, i en el citoplasma hi ha la CuZnSOD. A més en el teixit vascular s'hi troba una CuZnSOD extracel·lular, associada a la matriu extracel·lular.

Entre les peroxidases hi ha les glutatió-peroxidases (GSHPX), enzims dependents de seleni, i que empen l'oxidació del glutatió. El sistema antioxidant del glutatió es complementa amb les glutatió-reductases, que reciclen el glutatió oxidat amb consum de NADPH.

Els tocoferols tenen importància com a antioxidants lipofílics, i participen en el control de la peroxidació lipídica. Entre els antioxidants hidrofílics destaca l'ascorbat. El glutatió actua com a antioxidant no-enzimàtic en eliminar espècies reactives com el peroxinitrit ($ONOO^{\cdot-}$).

L'estrès oxidatiu consisteix doncs en el desequilibri entre la producció d'espècies reactives d'oxigen en relació amb els mecanismes antioxidants. Això pot deure's a una mancança del sistema de defensa antioxidant, o a un augment de la producció d'espècies reactives. Aquest estrès oxidatiu es manifesta en un dany oxidatiu en les biomolècules. En l'ADN es produeix una acumulació de bases modificades, potencialment mutagèniques, com ara la 8-oxoguanosina. A les proteïnes hi apareixen aminoàcids modificats (com la 2-oxohistidina, nitrotirosines), i els lípids poden patir un procés de

INTRODUCCIÓ

lipoperoxidació. El dany oxidatiu també es veu amplificat pel fet que estimula al seu torn la generació de nous radicals lliures (p.ex. per disfuncions mitocondrials).

A banda del dany oxidatiu, l'estrès oxidatiu també desencadena tota una sèrie de mecanismes compensadors, tant de caire antioxidant com reparador, o bé, quan aquests són insuficients per revertir el dany, l'apoptosi (mort programada de les cèl·lules més greument afectades) o la necrosi (mort cel·lular espontània deguda directament al propi dany). El balanç entre el dany oxidatiu i la resposta adaptativa determinarà el grau de dany tissular que s'hi produirà (necrosi massiva, transformació cel·lular, etc.).

El dany oxidatiu es troba implicat en nombroses malalties, bé com a causa, com a factor que hi contribueix en el procés, o bé com a conseqüència o un símptoma de la pròpia malaltia. Per tal de conèixer la relevància d'una espècie reactiva o d'un radical concret en una determinada malaltia, cal comprovar que es produeix en els teixits afectats abans del dany, i que es pot reproduir la malaltia o part d'ella, amb l'administració d'aquesta substància. Si realment n'és un dels agents causals, la teràpia antioxidant hauria de ser efectiva contra la malaltia.

2.1.2. Factors implicats en les malalties cardiovasculars

Les malalties cardiovasculars inclouen tota una sèrie de fenòmens que tenen com a tret comú la formació en la paret arterial de l'estructura coneguda com a placa d'ateroma. La placa d'ateroma consisteix en un engruiximent de la paret arterial format de teixit muscular i fibrós. El procés de formació de la placa d'ateroma, dit aterogènesi, és un procés crònic amb similituds amb processos de caire inflamatori. La placa d'ateroma suposa una interrupció de la superfície normal de la llum vascular i un punt de generació de coàguls. Així doncs s'hi combina un aspecte crònic (aterogènesi) amb un aspecte agut (trombosi). Aquesta és la base comuna de patologies com ara l'infart de miocardi, l'infart cerebral o la malaltia arterial d'extremitats inferiors.

Els estudis epidemiològics indiquen la incidència de les malalties en la població i estableixen els factors de risc o de protecció (sexe, edat, estils de vida, etc.). Aquests estudis orienten les recomanacions sanitàries de caire preventiu i els tractaments mèdics, tant individuals com socials, i també contribueixen al coneixement de les causes darreres de la malaltia.

Un dels principals objectius és identificar els factors que augmenten el risc de patir una malaltia, ja siguin aquests factors congènits (genètics o desenvolupats en el període fetal) o determinats per l'estil de vida. Els factors de risc es poden expressar en xifres absolutes (el nombre de casos del col·lectiu exposat a un factor) o en xifres relatives (risc relatiu d'aquest col·lectiu en relació a la població absoluta).

En la prevenció també és important d'identificar els paràmetres biològics que es relacionen més estretament amb l'aparició i l'evolució de la malaltia. A través de paràmetres biològics (pressió sanguínia, colesterolèmia, trigliceridèmia, capacitat de coagulació sanguínia) actuen els factors de risc.

La hipertensió, l'obesitat i la intolerància a la glucosa, són factors estretament associats a la morbiditat i mortalitat per malalties cardiovasculars i de la microcirculació. Els tres factors s'interrelacionen i sovint apareixen conjuntament. Armitage i Collins (2000) han estudiat la relació entre la colesterolèmia i la diabetes en la incidència de malalties vasculars, i constataren la importància de davallar els nivells de colesterol entre els diabètics.

Els registres històrics mostren que la incidència de malalties vasculars i, especialment, de la malaltia coronària no ha sigut uniforme. En els països industrialitzats més avançats (Gran Bretanya, Estats Units) la incidència augmentà de manera constant a partir dels anys 1920, fins arribar a valors molt alts en els anys 1960. Aquest augment d'incidència se centrà en els homes. Després d'aquesta època, en aquests països la incidència començà a davallar, associada amb una millora del tractament agut i preventiu. En canvi, la incidència en el món subdesenvolupat tendeix a augmentar. En aquest sentit, en els països industrialitzats s'observa una inversió en la distribució de la incidència entre els diferents estrats socials, de forma que ara les malalties coronàries afecten més i més els estrats més desfavorits.

INTRODUCCIÓ

El 1981, l'“estudi dels set països” (Seven Countries, 1981; Keys et al., 1986) comprovà la relació entre la ingesta de greix i la colesterolèmia mitjana de cada territori amb la mortalitat deguda a malalties coronàries, però quan s'analitzaven les dades dins de cada territori aquesta relació quedava menys clara. L'augment del risc per la ingesta de greix es deu concretament a la ingesta de greixos saturats (d'origen càrnic i làctic), mentre que els greixos insaturats (d'origen vegetal i marí) tindrien un efecte protector. Aquest estudi assenyalava que la dieta basada en l'oli d'oliva, rica en àcids grassos monoinsaturats (AGMI), pròpia dels països de la Conca Mediterrània, s'associava amb taxes inferiors de malalties cardiovasculars com l'aterosclerosi. Estudis fets en països amb un alt consum de peix, també han assenyalat una associació entre el consum de dietes riques en àcids grassos poliinsaturats (AGPI) ω -3 amb riscos cardiovasculars reduïts (Bang i Dyerberg, 1972). Però possiblement el factor de risc d'origen alimentari més estretament associat amb aquestes malalties, a través de la hipertensió, és la ingesta de sal.

Els estudis d'aquests riscos permeten el disseny d'una prevenció de les malalties cardiovasculars. D'una banda hi ha la prevenció primària, destinada a la població que no ha patit cap episodi de la malaltia, i de l'altra, la prevenció secundària que cerca d'evitar-ne la recurrència. Aquesta prevenció secundària és la més efectiva, en concentrar-se en un nombre més reduït de persones i en uns casos més ben estudiats, en la reducció de la morbiditat-mortalitat cardiovascular.

La prevenció sol incloure determinades recomanacions de canvis en l'estil de vida (deixar de fumar, canvis alimentaris, activitat física), o un tractament farmacològic no desprovist d'efectes secundaris, destinat a modificar paràmetres com la colesterolèmia, l'agregació plaquetària, etc.


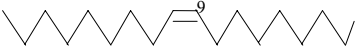
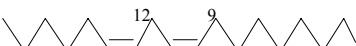
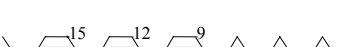
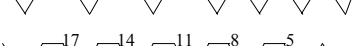
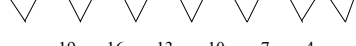
2. 2. Els àcids grassos

2.2.1. Característiques

Els àcids grassos són cadenes hidrocarbonades que en un dels extrems presenten un grup carboxil.

El carboni de l'extrem oposat al grup carboxil rep el nom d'omega (ω), i a partir d'aquest carboni poden nombrar-se els àcids grassos (ω -1, ω -2, ω -3, etc) segons la posició del primer doble enllaç. La lletra n també s'empra sovint per comptes de la lletra ω , en la nomenclatura dels dobles enllaços (Taula 1).

Taula 1. Estructura i nomenclatura d'alguns àcids grassos

Àcid gras	Extrem metil	Extrem carboxil	Saturació	Nomenclatura
Estearic 18:0		COOH	saturat	18:0
Oleic 18:1, ω 9		COOH	monoè	18:1 Δ 9
Linoleic 18:2, ω 6		COOH	poliè	18:2 Δ 9,12
γ -Linolènic 18:3, ω 3		COOH	poliè	18:3 Δ 9,12,15
Eicosapentanoic 20:5, ω 3		COOH	poliè	20:5 Δ 5,8,11,14,17
Docosahexanoic 22:6, ω 3		COOH	poliè	22:6 Δ 4,7,10,13,16,19

La denominació de “saturats” pels àcids grassos sense dobles enllaços, és deguda al fet que les seves cadenes hidrocarbonades són “saturades” d'àtoms d'hidrogen. Així doncs, s'anomena “insaturació” al doble enllaç d'una molècula d'àcid gras. La majoria d'àcids grassos saturats (AGS) són cadenes hidrocarbonades simples amb un nombre parell d'àtoms de carboni. Els àcids grassos més habituals contenen de 12 a 22 àtoms de

INTRODUCCIÓ

carboni. El més comú en les membranes biològiques és l'àcid palmític (16:0). L'àcid esteàric (18:0) és important en membranes d'animals i de certs fongs, i menys important a la majoria de vegetals. L'àcid mirístic (14:0), ben general, ocasionalment esdevé un component majoritari. Els AGS de cadena més curta, amb 8-10 àtoms de carboni es troben en els triacilglicerols de la llet.

Els AGMI tenen un únic doble enllaç, normalment en configuració *cis*. Els més habituals tenen una cadena de 16 a 22 àtoms de carboni. Sovint l'enllaç *cis* es troba en el carboni ω -9. Els isòmers *trans* es poden produir durant el procés industrial d'hidrogenació dels olis insaturats i en el tracte gastrointestinal dels remugadors. La presència d'un doble enllaç provoca la restricció en el moviment de la cadena hidrocarbonada en aquell punt. La configuració *cis* afecta la forma molecular i els àcids grassos *cis* són menys estables termodinàmicament que les formes *trans*. Els àcids grassos *cis* tenen una temperatura de fusió inferior que els àcids grassos *trans* o que els equivalents saturats. L'àcid oleic (18:1, ω -9) és l'àcid gras monoenoic més habitual en les membranes biològiques, i és especialment abundant en les olives. L'àcid palmitoleic (16:1, ω -7) també es ben corrent i n'és el principal en els olis d'algunes llavors.

Els AGPI presenten més d'un doble enllaç a la molècula. El primer es pot trobar bé en el carboni ω -3 (AGPI ω -3), bé en el carboni ω -6 (AGPI ω -6) (Taula 1). Després d'aquest primer doble enllaç s'hi succeeixen tota una sèrie d'insaturacions, espaiades per un grup metilè. En les plantes, un dels principals AGPI és l'àcid linoleic (18:2, ω -6) (p.ex. l'oli de blat de moro). L'àcid araquidònic (AA, 20:4, ω -6) és un dels principals components dels fosfolípids animals i en algues, si bé gairebé no s'incorpora en la dieta. L'àcid α -linolènic (18:3, ω -3) es troba en algues i cormòfits. L'àcid eicosapentanoic (EPA; 20:5, ω -3) i l'àcid docosahexanoic (DHA; 22:6, ω -3) són sintetitzats per diferents organismes fitoplanctònics i, a través de la xarxa tròfica, abunden en el peix i arriben també als mamífers terrestres, on s'hi acumulen fonamentalment en teixit nerviós (cervell, retina) i reproductiu (testicles) (Taula 2).

Sota el nom d'àcids grassos essencials s'hi agrupen els AGPI que no poden sintetitzar els animals i que per tant els han d'incorporar de la dieta. En el cas humà els

requeriments d'àcids grassos essencials s'evaluen en un 2% del consum energètic en forma d'àcid linoleic i d'un 1% del consum energètic en forma d'àcid γ -linolènic. Pel que fa als AGPI ω -3 el consum recomanat es troba entre 0,2 i 2% del consum energètic, mentre que el rang pels AGPI ω -6 va de 1 a 7,5%. En el cas dels AGPI ω -3, el consum d'EPA i DHA hauria de superar 500 mg diaris. Certes recomanacions terapèutiques assenyalen una quantitat de 1250 mg d'EPA i de DHA diàries, que pot cobrir-se amb suplementacions d'oli de peix de 3000-4000 mg diaris. En la Taula 2 es detalla la composició en àcids grassos dels fosfolípids del greix corporal de diferents animals (Brockerhoff et al., 1966). La principal diferència que es troba entre l'oli de peix i els greixos de vertebrats terrestres és l'abundància en els primers (al voltant del 16%) d'AGPI ω -3 (Taula 2).

Taula 2. Composició en àcids grassos de diversos greixos i olis d'origen animal en % (mol/mol)

	Porc	Bou	Pollastre	Ànec	Truita	Arengada	Barat
14:0	2	5	1	1	3	7	6
16:0	24	27	21	21	11	12	16
16:1 ω -7	3	6	10	6	10	9	8
18:0	12	17	5	6	5	1	2
18:1 ω -9	40	33	37	49	28	11	18
18:2 ω -6	14	5	5	16	7	2	2
18:3 ω -3	-	-	3	2	-	-	-
20:1 ω -9	-	-	-	-	10	17	9
20:4 ω -6	4	6	9	3	2	1	2
20:5 ω -3	-	-	-	-	5	8	8
22:1	-	-	-	-	7	23	15
22:5 ω -3	-	-	-	-	-	2	1
22:6 ω -3	-	-	-	-	4	5	7

INTRODUCCIÓ

Els àcids grassos de cadena curta (menys de 9 àtoms de carboni) són poc solubles. Els de cadena més llarga presenten una solubilitat més gran, i en un medi aquós formen monocapes o micel·les. La formació de micel·les depèn de la concentració molar dels lípids, i s'hi formen a partir de la concentració micel·lar crítica (CMC). La CMC varia de lípid a lípid, i es veu influïda, a més, per la presència d'ions, de soluts neutres, d'agents emulsionants com les sals biliars, etc.

El punt de fusió dels àcids grassos depèn de l'estructura de la cadena hidrocarbonada. Així, la presència de dobles enllaços en configuració *cis* i les ramificacions davalla el punt de fusió dels àcids grassos. En el cas d'àcids grassos amb un nombre senar d'àtoms de carboni la temperatura de fusió és més elevada. En general, doncs, els àcids grassos insaturats tenen una temperatura de fusió més baixa que els AGS.

Els AGPI són susceptibles a l'oxidació, mentre que els AGS i els AGMI són molt més estables. Per això l'oli d'oliva es més resistent al refregit que no l'oli de girasol. Aquesta susceptibilitat a l'oxidació depèn directament del nombre de dobles enllaços. També depèn, és clar, de la presència de factors oxidants i de compostos generadors de radicals lliures, a banda de la presència d'antioxidants.

2.2.2. Funcions

Els àcids grassos compleixen un seguit de funcions en els éssers vius:

- a) metabòliques. Són substrats del metabolisme oxidatiu (β -oxidació, mitocondrial i peroxisòmica). Integrats en triacilglicerols constitueixen una de les principals formes de reserva (teixit adipós) i de transport (lipoproteïnes plasmàtiques). Per tal d'entrar en reaccions metabòliques (oxidació, esterificació) cal que l'àcid gras s'esterifiqui mitjançant un enllaç tiol-ester

amb el nucleòtid-coenzim A (CoA), que permet la solubilitat de l'àcid gras, i el reconeixement per part d'enzims.

- b) estructurals. Integrats en fosfolípids (components de la bicapa lipídica de les membranes biològiques).
- c) reguladores (senyalització cel·lular, control de l'expressió gènica). Els AGPI són els precursors dels eicosanoids, un dels principals autacoids de l'organisme. Els eicosanoids són produïts, entre d'altres tipus cel·lulars, per les plaquetes i els leucòcits. L'acil·lació de proteïnes amb àcid esteàric, palmític (palmitilació) o mirístic (miristolació) està implicada en l'anclatge d'aquestes en les membranes. Hi ha receptors nuclears que s'activen mitjançant àcids grassos o derivats, com és el cas de la família de receptors PPAR. És el cas del receptor PPAR γ , que té com a lligam la prostaciclina (PGI₂), i que media bona part de les accions d'aquest eicosanoid en el teixit adipós. Aquesta i altres accions sobre l'expressió gènica, explica l'efecte dels AGPI en la proliferació i l'apoptosi de leucòcits. També hi ha d'altres derivats, com el factor hiperpolaritzant derivat d'endoteli (EDHF), que és un metabolit de la monoxigenasa P₄₅₀ de l'AA, amb funcions vasoconstrictores.

La posició 2 dels fosfolípids de membrana és ocupada per una molècula d'AGPI. Aquesta molècula és la precursora dels eicosanoids (Figura 1), en ser alliberada per la fosfolipasa A₂ (PLA₂). Entre els eicosanoids hi trobem leucotriens (LT), prostaglandines (PG), tromboxans (TX), PGI, lipoxines (LO) i hidroxiàcids grassos.

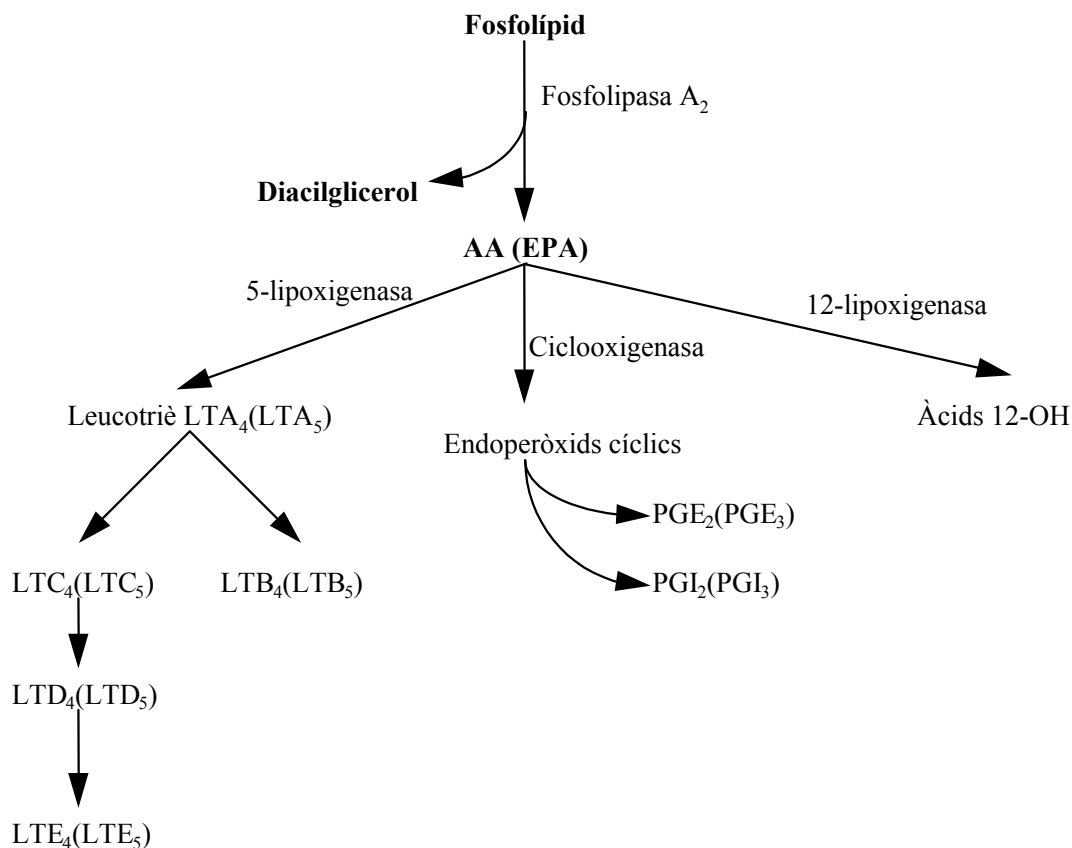


Figura 1. Esquema de l'origen dels principals eicosanoids (leucotriens, LT; prostaglandines, PG), derivats de l'àcid araquidònic (AA). Entre parèntesi hi figura la forma derivada d'AGPI ω -3 (per exemple, àcid eicosapentanoic (EPA), en general biològicament menys activa).

Els eicosanoids són autacoids que participen en la regulació de fenòmens plaquetaris (agregació), leucocitaris (quimiotaxi, creixement cel·lular) i vascular (tonus vascular). En el sistema vascular, els TX i la PGI són produïts fonamentalment per les plaquetes i per l'endoteli (Taula 3).

Taula 3. Síntesi i efectes d'alguns eicosanoids

Àcid gras	AA	EPA	AA	EPA	AA	EPA
Enzim	Ciclooxigenasa				Lipoxigenasa	
Tipus cel·lular	Plaquetes		Cèl·lules endotelials		Leucòcits	
Eicosanoids	TXA ₂	TXA ₃	PGI ₂	PGI ₃	LTB ₄	LTB ₅
Efecte biològic						
Agregació	+++	+				
Antiagregació			+++	+++		
Vasoconstricció	+++					
Vasodilatació			+++	+++		
Quimiotaxi					+++	+

2.2.3. Els àcids grassos poliinsaturats ω-3 i els olis de peix

Els AGPI no els sintetitzen els animals, i per això aquests els han d'incorporar mitjançant la dieta a partir dels organismes que els sintetitzen (vegetals, tant plantes terrestres com fitoplàncton). Això els converteix en nutrients essencials.

Els AGPI ω-3 i ω-6 no són mútuament interconvertibles, però poden patir altres transformacions metabòliques en l'organisme animal. Aquestes transformacions poden consistir en l'addició d'àtoms de carboni (allargament) o en l'extracció d'àtoms d'hidrogen (desaturació). Aquesta darrera modificació és catalitzada per diferents desaturases, que actuen entre el darrer doble enllaç i el grup carboxil (Figura 2).

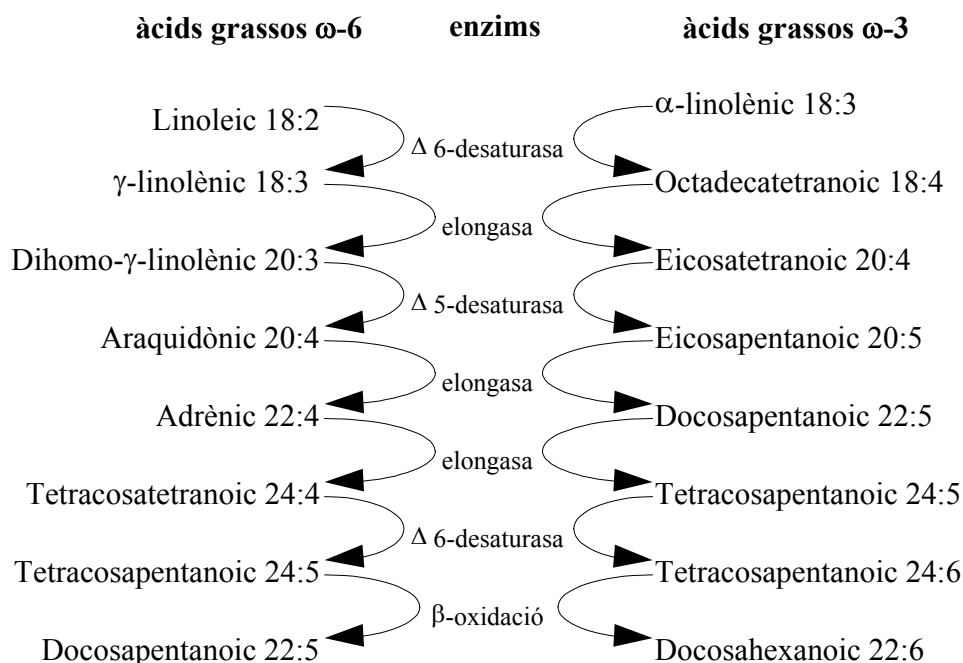


Figura 2. Transformacions metabòliques dels AGPI ω -6 i ω -3.

Val a dir, que els diferents àcids grassos tenen afinitats diferents pels enzims que participen en el metabolisme lipídic. Aquestes afinitats diferencials suposen canvis en la incorporació dels diferents àcids grassos als lípids de l'organisme.

Els AGPI ω -6 i ω -3 donen lloc a dues sèries diferents d'eicosanoids. La diferent distribució dels dobles enllaços a totes dues sèries afecta l'afinitat de cada eicosanoid pels respectius receptors. En línies generals, els eicosanoids de la sèrie 3 (derivats dels AGPI ω -3) són menys potents des del punt de vista de l'acció biològica que els de la sèrie 2 (derivats dels AGPI ω -6) i, en certs casos, no presenten les activitats biològiques dels seus homòlegs (Taula 3). Per exemple, el TXA₃ no té l'activitat vasoconstrictora que presenta el TXA₂ (Grimminger et al., 1993).

El peix, i concretament el seu oli, és la principal font d'AGPI ω -3 de cadena llarga a la dieta humana. Una dieta rica en OP té tota una sèrie d'efectes (Connor i Connor, 1997), ja que substitueix l'AA per EPA i DHA en els fosfolípids de les membranes cel·lulars (Rodríguez et al., 1996; Sanigorski et al., 1996), altera l'alliberament de radicals lliures per

diferents tipus de cèl·lules i provoca canvis en els metabolits dels eicosanoids (Carbonell et al., 1997; Nardini et al., 1995; Scaccini et al., 1992; Boutard et al., 1994; Yaqoob i Calder, 1995; Moreno et al., 2001).

La introducció d'AGPI en les membranes biològiques augmenta la fluidesa i disminueix el punt de fusió. Per exemple, hi ha un augment de la flexibilitat dels eritròcits en el cas d'animals sotmesos a una suplementació d'oli de peix. A més de l'efecte no tan sols en la bicapa lipídica sinó també en la funcionalitat de les proteïnes de membrana. Així, per exemple, el DHA ha de trobar-se en unes concentracions suficients en la fosfatidiletanolamina i en la fosfatidilserina de les membranes dels fotorreceptors de la retina, per tal de garantir la funcionalitat de la rodopsina (Jeffrey et al., 2001).

2.3. Les lipoproteïnes

2.3.1. Característiques generals

Les lipoproteïnes són complexos organitzats de lípids i de proteïnes que constitueixen la gairebé totalitat de la fracció lipídica de la sang. Són responsables del transport dels lípids i de les substàncies lipòfiles en el sistema circulatori. Tan sols una petita fracció d'àcids grassos sense esterificar es troba fora de les lipoproteïnes, fonamentalment associada a albúmina.

El nucli de les lipoproteïnes és la regió més hidròfoba, amb presència de lípids apolars (triglicèrids, esters de colesterol). La zona perifèrica de la lipoproteïnes és formada pels fosfolípids que li donen l'estructura. També hi ha present colesterol no esterificat. Les proteïnes de les lipoproteïnes, dites apolipoproteïnes s'hi troben en aquesta zona.

Les característiques dels quilomicrons (QM) i dels diferents tipus de lipoproteïnes s'indiquen en la Taula 4.

Cal tenir present que dins de cada grup hi ha diferents subgrups, i que, entre les lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) i les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) hi ha una fase intermèdia, que rep el nom de lipoproteïnes de densitat intermèdia (IDL).

INTRODUCCIÓ

Els enteròcits sintetitzen QM a partir dels lípids que han captat de la llum intestinal, i arriben al corrent sanguini després de passar pel sistema limfàtic. Una vegada arriben als capilars, l'endoteli vascular en capta lípids (mitjançant la lipoproteïn-lipasa), i els QM perden progressivament contingut, es redueixen de tamany. Els QM romanents, són captats finalment pel fetge.

El fetge i, en menor grau, l'intestí sintetitzen les VLDL. Aquestes són secretades directament al sistema sanguini. Les VLDL són metabolitzades pels teixits perifèrics de forma similar als QM. Progressivament les VLDL disminueixen de tamany i es fan més denses (IDL) i riques en colesterol. Les LDL que en resulten són finalment captades pel fetge o per altres teixits. Per tant, tenen gran importància en el transport de colesterol als teixits perifèrics.

El fetge també sintetitza les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL). Aquestes lipoproteïnes tenen la capacitat de captar colesterol de teixits. El colesterol captat és finalment transportat al fetge o traspassat a les VLDL i LDL. Així les HDL tenen un important paper regulador dels nivells tissulars de colesterol i, en cas d'excès, permeten un transport retrògrad cap al fetge que en permeti l'excreció.

Taula 4. Característiques dels grups principals de lipoproteïnes

	QM	VLDL	LDL	HDL
Diàmetre (nm)	80-500	30-70	21-22	7,5-10
Densitat (g/mL)	0,93	0,94-1,006	1,006-1,063	1,063-1,21
Coefficient de sedimentació	>400	20-400	0-20	<0
Lloc de síntesi	Intestí	Fetge (intestí)	Sang (a partir de VLDL)	Fetge (intestí)
Vida mitjana (hores)	1	1-3	70	140
% Proteïnes	2	5-12	22	50
% Fosfolípids	2-10	13-20	20	24
% Triglicèrids	85-95	50-60	12	4
% Colesterol	1-5	13-18	46	22
Apolipoproteïnes principals	A1, A2, B48, C, E	B100, C, E	B26, B74, B100, C	A1, A2, C, D, E

2.3.2. Les lipoproteïnes en el procés aterogènic

La teoria oxidativa de l'aterogènesi (Ross, 1993; Witzum i Steinberg, 1991; Esterbauer et al., 1992) postula que la lesió de l'endoteli és el primer pas d'aquest procés. Aquesta lesió provoca un augment de la permeabilitat, i de la interacció entre els leucòcits circulants i l'endoteli vascular. Hi ha una entrada de lipoproteïnes circulants a l'espai subendotelial, i els monòcits que s'hi desplacen es diferencien en macròfags. Aquests leucòcits, activats, alliberen al medi radicals lliures i espècies reactives.

Els AGPI de les lipoproteïnes, que es troben en forma de fosfolípids i d'esters de colesterol, són la diana de l'atac oxidatiu. Aquest s'iniciaria en els fosfolípids de la superfície i avançaria fins als esters de colesterol i triglicèrids del nucli lipofílic, exhaustint alhora els antioxidants de la lipoproteïna. Les apolipoproteïnes resultarien modificades en reaccionar amb els aldehids formats en el procés de lipoperoxidació.

L'acumulació de lípids oxidats en la paret vascular suggereix que el dany tissular mediat per radicals lliures pot ésser un punt focal en la formació de lesions ateroscleròtiques (Haberland et al., 1988; Mowri et al., 1986). Aquesta oxidació s'estén, a més, a les proteïnes. Les LDL modificades per aquesta oxidació ja no poden ser metabolitzades normalment, i tan sols són eliminades pels macròfags de l'espai subendotelial. Els macròfags, plens de LDL oxidades, esdevenen cel·lules escumoses, i això assenyala el punt de partida del procés aterogènic. Aquest mecanisme es reforça pel fet que la fagocitosi de LDL oxidades estimula al seu torn l'explosió oxidativa de les cel·lules. Alhora, la presència de productes d'oxidació també estimula la migració cel·lular a l'espai subendotelial, i l'apoptosi i la necrosi d'aquestes cel·lules escumoses constitueix una font d'alliberament d'enzims proteolítics i de metalls de transició com ferro (Wang et al., 1998) o coure (Völker et al., 1997; Evans et al., 1995). Aquesta primera fase d'iniciació es correspon a estries grasses i a taps fibrosos en la paret vascular.

INTRODUCCIÓ

La formació de la placa d'ateroma requereix la migració de nous leucòcits i, particularment, de cèl·lules musculars llises. A més, s'hi produeix una síntesi de col·làgena. Aquesta placa d'ateroma ofereix una superfície estimuladora de la coagulació i, en créixer, també pot ocasionar problemes obstructius a la circulació del vas afectat.

S'accepta àmpliament que els olis de peix prevenen l'aterosclerosi (Goodnight, 1993; Israel i Gorlin, 1992) i milloren significativament la funció endotelial en subjectes hipercolesterolèmics (Zhu i Parmley, 1990).

L' α -tocoferol és el principal protector antioxidant de les lipoproteïnes plasmàtiques. Ja en el moment de la captació intestinal, l' α -tocoferol passa als QM. A banda de la fracció que circula associada a una proteïna transportadora específica d'origen hepàtic, la resta forma part de VLDL i LDL. Les HDL contribueixen a la captació d' α -tocoferol i a la cessió cap a les VLDL i LDL.

2.3.3. L'oxidació lipídica

Diverses espècies radicalàries, com ara $\cdot\text{OH}$ poden atacar els lípids, i generar radicals lipídics centrats en carboni ($\text{L}\cdot$), després d'abstreure'n un electró. Aquest atac es produeix bàsicament en els dobles enllaços de les cadenes hidrocarbonades.

Els $\text{L}\cdot$, quan reaccionen amb O_2 , donen lloc a un radical lipoperoxil ($\text{LOO}\cdot$). Aquests $\text{LOO}\cdot$ poden continuar la reacció de lipoperoxidació, en generar nous $\text{L}\cdot$ i hidroperòxids lipídics (LOOH) (Figura 3). Entre els productes finals característics de la lipoperoxidació hi apareix el malondialdehid (MDA).

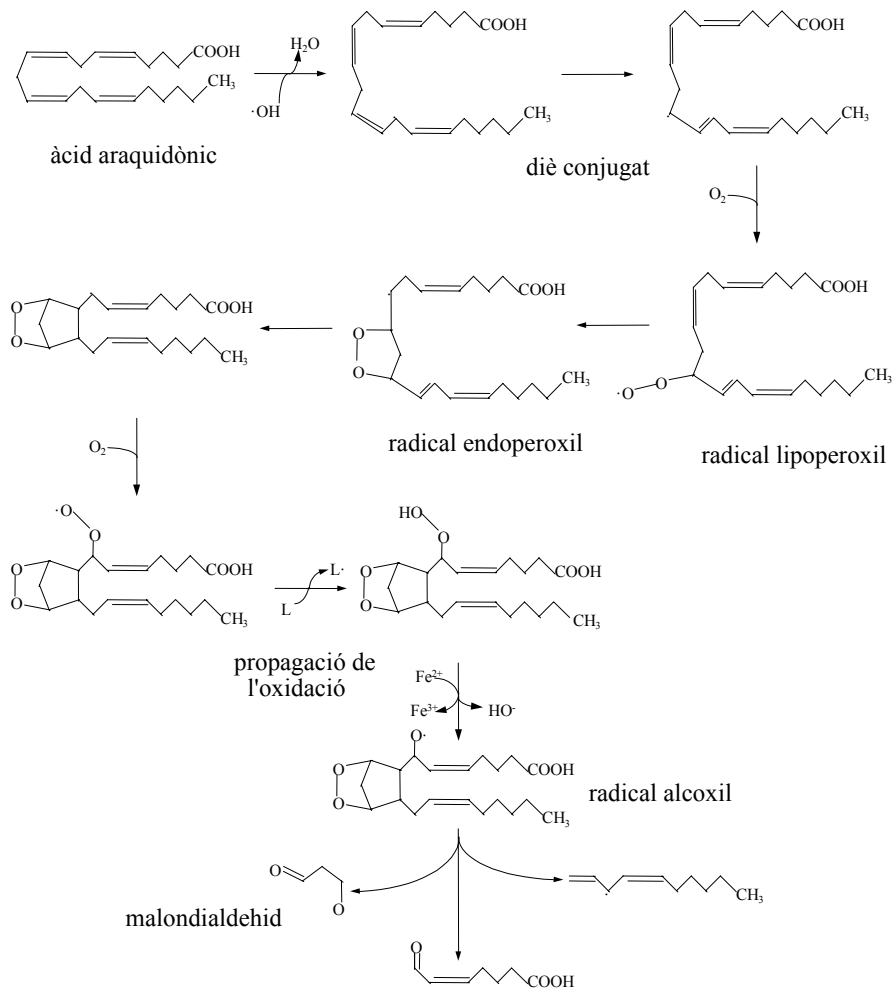


Figura 3. Reaccions de la lipoperoxidació lipídica.

A més de la concentració de les LDL, que és un factor que contribueix al risc aterogènic, les HDL també tenen un paper en el control de l'oxidació de les LDL. Les HDL són responsables del transport retrògrad de colesterol (Eisenberg, 1984) i de la captació i l'eliminació de peròxids lipídics de les LDL (Mackness i Durrington, 1995).

Els factors extrínsecs a les LDL que influeixen la susceptibilitat a l'oxidació són els antioxidants que hi ha en el medi circundant, i els radicals lliures que s'hi generen.

Així els AGPI ω -3 afecten els sistemes endògens antioxidants. És per això que els requeriments d' α -tocoferol augmenten (Cho i Choi, 1994). Contràriament, l'oli de peix augmenta els nivells de β -carotè a les plaquetes i al plasma (Nair et al., 1993).

Un altre factor extrínsec és l'estrès oxidatiu, especialment degut a la generació de radicals lliures per part de leucòcits i de cèl·lules endotelials de la paret vascular.

3. La regulació del to vascular

La modulació del to de la musculatura llisa vascular implica l'alliberament de potents vasorelaxants com $\cdot\text{NO}$ (Palmer et al., 1998) i la PGI_2 (Pearson et al., 1983), que contraresten les propietats vasoconstrictores del TXA_2 (Vane et al., 1990) i de $\text{O}_2\cdot^-$ (Katusic i Vanhoutte, 1989) entre altres agents.

3. 1. El $\cdot\text{NO}$ en el sistema vascular

El $\cdot\text{NO}$ (monòxid de nitrogen) és un autacoid que té importància en la regulació de tota una sèrie de funcions biològiques. En el sistema circulatori té un paper vasorelaxant i participa en la regulació del tonus vascular.

El $\cdot\text{NO}$ és sintetitzat per la família d'enzims de les òxid nítric sintases (NOS), que catalitzen una reacció de conversió de L-arginina en L-citrul·lina. Hi ha tres isoformes bàsiques de la NOS (Alderton et al., 2001):

- nNOS o NOS-1. Aquesta isoforma es localitza en un principi en neurones, però més tard s'ha trobat en molts altres tipus cel·lulars. És una isoforma constitutiva i és dependent de Ca^{2+} .
- iNOS o NOS-2. Aquesta isoforma es localitza en cèl·lules inflamatòries. És un enzim induïble (és a dir, que se sintetitza davant estímuls determinats) i independent de Ca^{2+} .
- eNOS o NOS-3. Aquesta isoforma es localitza originalment en l'endoteli vascular. És una isoforma constitutiva i és dependent de Ca^{2+} .

Aquestes tres isoformes mostren una gran homologia estructural, la qual cosa dificulta l'aparició d'inhibidors específics. Són proteïnes homodimèriques. Cada cadena està constituïda per dos dominis:

- un domini oxigenasa, en l'extrem N-terminal. Presenta llocs d'unió a grups hem (Cys184, en el cas de la eNOS), a tetrahidrobiopterina (BH₄) i a L-arginina. La BH₄ és important per la dimerització de l'enzim i per la catàlisi.
- un domini reductasa, en l'extrem C-terminal. Presenta llocs d'unió als nucleòtids NADPH, FNM i FAD.

En el domini reductasa hi ha un lloc d'unió a la Ca²⁺-calmodulina (CaM), on també s'hi poden unir altres proteïnes, com la caveolina-1 o l'Hsp90. En l'homodímer de NOS, el centre actiu es disposa com un canal allargat entre les dues cadenes. En el cas de la eNOS, la L-arginina interacciona amb el residu Glu361.

Com es pot veure en la Figura 4 totes tres presenten els dos dominis reductasa i oxigenasa, i els mateixos llocs d'unió a cofactors i a substrats. La nNOS presenta un fragment addicional en l'extrem N-terminal. La iNOS manca d'una seqüència reguladora del domini reductasa, la qual cosa el converteix en un enzim independent de Ca²⁺.

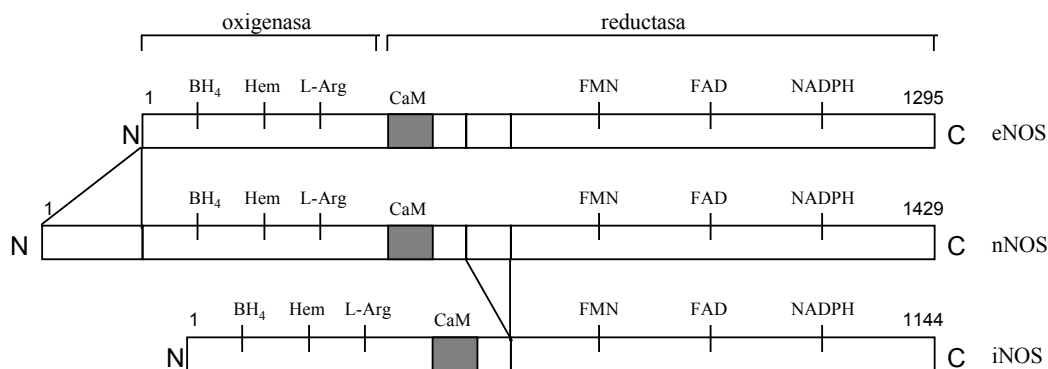


Figura 4. Estructura de les isoformes de NOS.

INTRODUCCIÓ

El domini reductasa realitza una transferència de ferro a través dels cofactors NADPH (donador inicial d'electrons), FAD i FMN. Els electrons del FMN són donats al grup hem, del domini oxigenasa. El grup hem amb el ferro reduït, és capaç d'unir-se a l'oxigen i d'activar-lo. L'oxigen actiu s'uneix a la L-arginina per formar N^ω-hidroxi-L-arginina, que donarà lloc a L-citrul·lina i a ·NO (Figura 5).

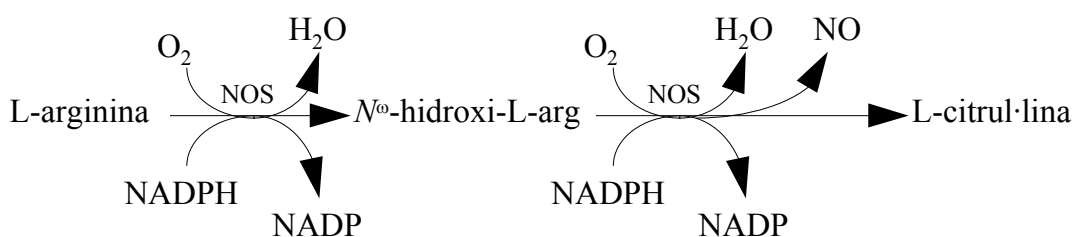


Figura 5. Reacció catalitzada per la NOS, de conversió de la L-arginina en L-citrul·lina, amb alliberament de ·NO.

Per l'acoblament dels dominis reductasa i oxigenasa, és a dir per la transferència d'electrons entre el FMN i el grup hem, és essencial el lloc d'unió a la Ca-CaM. Així la Ca-CaM facilita aquest transport i permet l'activitat NOS. Tot i que totes les isoformes de la NOS necessiten de Ca-CaM per dur a terme la seva activitat hi ha diferències d'afinitat. En el cas de la iNOS, degut a l'absència d'una seqüència reguladora, aquesta afinitat és molt alta i, a la pràctica, l'enzim esdevé independent de Ca²⁺. En canvi la dependència dels nivells de Ca²⁺ és clara per les isoformes constitutives, nNOS i eNOS.

L'activitat catalítica de la NOS té un efecte autoinhibitori, de forma que cal un recanvi proteic prou accelerat per mantindre la producció de ·NO. En el promotor de la eNOS trobem una sèrie de llocs d'unió a factors de transcripció, com ara la regió de la posició -100, on s'hi uneix el Sp-1. El Sp-1, que es veu activat, entre d'altres, per la lisofosfatidilcolina seria important en l'estimulació de l'expressió d'eNOS en determinades circumstàncies (exercici crònic, alts nivells d'estrògens). En absència relativa de L-arginina, l'enzim actiu pot transferir els electrons per la generació de O₂^{·-}.

La eNOS té com a característica diferencial el fet que pot unir-se a la membrana plasmàtica i, concretament, acumular-se a les caveoles (García-Cadena et al., 1996). Les caveoles són unes invaginacions de la membrana amb recoberta proteica a la cara intracel·lular. La eNOS s'hi uneix a través de les caveolines 1 i 3 pel lloc d'unió a CaM (Michel et al., 1997). Això suposa que la fracció enzimàtica unida a la caveolina és inactiva. S'activa normalment en presència de Ca^{2+} , el qual provoca que la CaM desplaci la caveolina del lloc d'unió.

La principal diana del $\cdot\text{NO}$ és la guanilat ciclasa soluble (GCs). La GCs catalitza la conversió de GTP en GMPc. És una hemoproteïna heterodimèrica, i quan s'uneix el $\cdot\text{NO}$ al grup hem, es forma un complex ferro-nitrós, i l'enzim s'activa. El GMPc actua fonamentalment mitjançant l'activació de la proteïna-cinasa G (PKG).

Així doncs, el GMPc és el segon missatger responsable de la major part de les accions biològiques del $\cdot\text{NO}$. Ara bé, si el $\cdot\text{NO}$ assoleix concentracions més altes, pot interaccionar amb altres hemoproteïnes. També pot actuar a través d'altres reaccions de nitrosilació, damunt proteïnes i àcids nucleics. A més, el $\cdot\text{NO}$, en reaccionar amb el O_2^- , forma ONOO^- , una espècie altament reactiva i de forta toxicitat, que és responsable de gran part dels efectes tòxics del $\cdot\text{NO}$, i que redueix el seu efecte relaxant (Wambi-Kiésse i Katusic, 1999). Altres espècies reactives de nitrogen són el radical $\text{NO}_2\cdot$, el NO_2Cl i el N_2O_2 . La toxicitat d'aquestes espècies es deguda a les reaccions d'oxidació i de nitració que produeixen en les molècules biològiques.

La biodisponibilitat del $\cdot\text{NO}$ no sols depèn de la síntesi, sinó també de les reaccions que l'eliminen. El $\cdot\text{NO}$ pot reaccionar amb el glutatió i l'hemoglobina (Schechter i Gladwin, 2003) i el nitrosoglutatió i la nitrosohemoglobina resultant poden actuar com a reservoris de $\cdot\text{NO}$. En el cas de l'hemoglobina, el $\cdot\text{NO}$ pot interaccionar amb el grup hem (amb formació de nitrosomethemoglobina) o amb residus com ara la Cys93 (amb formació de nitrosohemoglobina que conserva el grup hem en estat reduït. Aquesta nitrosohemoglobina pot actuar com a reservori de $\cdot\text{NO}$ i participar en l'homeostasi vascular (Crawford et al., 2003).

INTRODUCCIÓ

S'ha mostrat que el ·NO té propietats antiaterogèniques tan in vitro com in vivo (Matthys i Bult, 1997).

Amb tot, el ·NO ha sigut descrit com a factor essencial en la regulació del to vascular i de l'hemodinàmica, (Ignarro et al., 1999) i també mostra propietats antiaterogèniques tan in vivo (Patel et al., 2000) com in vitro (Matthys i Bult, 1997).

4. Efectes beneficiosos de l'oli de peix a nivell cardiovascular

Els olis de peix són la principal font d'àcids grassos ω -3 de cadena llarga a la dieta humana. Una dieta rica en oli de peix substitueix l'AA per l'EPA i el DHA en lipoproteïnes plasmàtiques i en membranes fosfolípidiques i afecta l'alliberament dels radicals lliures en diferents tipus de cèl·lules (Boulanger et al., 1990; Fischer et al., 1990; Sirtori et al., 1992; Boutard et al., 1994; Chaet et al., 1994; Yaqoob i Calder, 1995; Moreno et al., 2001), directament o mitjançant canvis en metabòlits dels eicosanoids.

Hi ha una relació entre la composició en àcids grassos de les lipoproteïnes i el risc aterogènic. La composició en àcids grassos de les lipoproteïnes reflecteix la dieta. Així els AGS augmenten el risc aterogènic i de malalties coronàries. Aquest també és el cas dels àcids grassos amb insaturacions en *trans*. Pel que fa als AGPI, aquests se suposa que haurien d'augmentar la susceptibilitat a l'oxidació de les lipoproteïnes (Suzukawa et al., 1995; Turini et al., 2001), però hi ha estudis que demostren que no hi ha un increment d'aquesta (Brude et al., 1997; Higdon et al., 2001; Higgins et al., 2001). De totes maneres els AGPI ω -3 no tenen efecte pro-aterogènic.

Una disminució d'AGS en la dieta en favor d'àcids grassos insaturats provoca uns canvis en la colesterolèmia: disminueix el colesterol total i el colesterol associat a les LDL (Grundy, 1986; Grundy i Denke, 1990; George et al., 2000). La base d'això es troba en l'estimulació de la captació hepàtica de les LDL. Els AGPI tenen una acció

protectora en tota una sèrie de trastorns: malaltia coronària, hipertensió, insulino-resistència. En general, els AGS afavoreixen un seguit de trastorns: malalties coronàries, cerebro-vasculars, hipertensió, resistència a la insulina i la hiperlipidèmia. Els AGMI exerceixen una protecció coronària i front la hiperlipidèmia.

Els AGPI ω -3 s'utilitzen en la prevenció de malalties cardiovasculars com l'aterosclerosi (Goodnight, 1993). S'han realitzat diversos estudis sobre l'efecte dels AGPI ω -3 en l'alliberament de factors de relaxació (Boulanger et al., 1990; Chin et al., 1993; Schini et al., 1993; Shimokawa i Vanhoutte, 1989) i en la reducció de la pressió sanguínia en voluntaris sans (Singer, 1990) i en pacients amb hipertensió feble (Toft et al., 1995). A més, la seva suplementació augmenta la vasodilatació d'artèries coronàries en resposta a la infusió d'acetilcolina en pacients amb cor transplantat (Fleischauer et al., 1993).

Quan són absorbits, els AGPI ω -3 davallen els nivells de QM, i redueixen l'efecte de la lipèmia postprandial (Harris et al., 1988; Bergeron i Havel, 1997). Els olis de peix redueixen els nivells de triglicèrids, en davallar els nivells de VLDL. L'efecte en les LDL no és tan pronunciat, ja que afavoreix la conversió de VLDL en LDL (Huff i Telford, 1989).

En el cas de la hiperlipidèmia de tipus V, les dietes basades en AGPI ω -3 són gairebé imperatives (Phillipson et al., 1993; Schmidt et al., 1993).

5. Objectius del present estudi

No se sap gaire de la producció de $O_2^{\cdot-}$ i de $\cdot NO$, i de la seva interacció, o de la disminució de l'activitat ciclooxygenasa en vasos degut a una dieta rica en oli de peix. L'objectiu d'aquest estudi era comprovar l'efecte d'una dieta rica en oli de peix en la reactivitat de la musculatura llisa vascular, especialment a través de la producció de $O_2^{\cdot-}$

INTRODUCCIÓ

i ·NO i a través de l'estimulació de la ciclooxigenasa mitjançant acetilcolina en anells aòrtics de rata, i el possible efecte potenciador de la L-arginina.

Els olis s'empren en la prevenció de malalties cardiovascular com l'aterosclerosi.

Un altre objectiu d'aquest estudi era comprovar si la suplementació amb oli de peix afecta la susceptibilitat a la oxidació de VLDL+LDL a través de canvis en la composició en àcids grassos.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. Animals i dietes

1.1. Procediment experimental

Després del deslletament, s'alimentaren dos grups de rates mascles de la soca Sprague-Dawley (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, Espanya) durant 8 setmanes amb dietes semipurificades preparades en el nostre laboratori (Taula 5), que contenien un 5% de lípids. Aquests lípids eren o bé oli de blat de moro (OB, corn oil, Sigma), ric en 18:2 ω -6 (àcid linolènic), o oli de peix (OP, menhaden oil, Sigma), ric en 20:5 ω -3 (EPA) i 22:6 ω -3 (DHA) (Taula 6). Els olis aportaven uns 2 mg d' α -tocoferol per quilogram de dieta, per la qual cosa els pinsos se suplementaren amb 100 mg/kg d'acetat d' α -tocoferol racèmic (60 UI de vitamina E per quilogram de dieta). Les dietes es preparaven setmanalment i es guardaven a -20°C per prevenir l'oxidació. El contingut de peròxids dels pinsos era inferior a 10 meq/kg en el moment del consum. D'altra banda el contingut d'àcids grassos dels olis dels pinsos (Taula 6) fou analitzat d'acord amb la tècnica exposada en l'apartat 3.5 de Materials i mètodes.

A més d'aquests dos grups alimentaris, n'hi hagué dos d'addicionals que reberen una suplementació de L-arginina lliure: els grups OB-A (dieta amb un 5% d'oli de blat de moro i suplementada amb L-arginina 0,66%) i OP-A (dieta amb un 5% d'oli de peix i suplementada amb L-arginina 0,66%).

El pinso s'administrava diàriament, i se'n retiraven les restes no menjades també cada dia. El pes corporal es registrava setmanalment.

En finalitzar el període d'alimentació, les rates foren anestesiades amb uretà sòdic (1,5 g/kg i.p.), exsanguinades per punció cardíaca i s'extragueren els òrgans d'interès. Per a la sang (uns 6-10 mL per rata) s'emprava heparina com a anticoagulant en el moment de l'extracció. Els protocols i el manteniment de les rates seguien la normativa

europea, aplicada d'acord amb el Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

Taula 5. Composició dels pinsos (g/kg de pinso)

Component	OB	OP	OB-A	OP-A
Caseïna	225	224	225	224
Midó de patata	446	443	446	443
Sacarosa	223	222	223	222
α -Cel·lulosa	31	31	31	31
DL-Metionina	1	1	1	1
Barreja mineral*	14	14	14	14
Barreja de vitamines†	10	10	10	10
Oli de blat de moro	50	-	50	-
Oli de peix	-	50	-	50
FeSO ₄	0,24			
Acetat d' α -tocoferol	0,09	0,09	0,09	0,09
L-arginina‡	-	6,6	-	6,6

Els pinsos eren compactats amb uns 300 mL/kg d'aigua, i es deixaven assecar, abans de la congelació.

Els olis, la caseïna, la sacarosa, la α -cel·lulosa, la DL-metionina, l'acetat de tocoferol racèmic, l'hidroclorur de fenilefrina, el clorur d'acetilcolina i la L-arginina s'adquiriren de Sigma (St. Louis, MO, Estats Units). El midó i el FeSO₄ · 2H₂O, de Panreac (Barcelona, Espanya). La barreja mineral (sense ferro) i la barreja vitamínica (sense vitamina E) s'obtingueren d'ICN Biomedicals (Aurora, OH, Estats Units).

*La barreja mineral aportava a la dieta (en g/kg): 12,5 de carbonat càlcic, 8,75 de fosfat monopotàssic, 2,59 de clorur sòdic, 1,63 de sulfat potàssic, 0,98 citrat potàssic monohidratat, 0,84 d'òxid de magnesi, 0,058 de carbonat de cinc, 0,022 de carbonat de manganès, 0,011 de carbonat de coure, 0,0035 de iodur potàssic, 0,00036 de selenat

sòdic anhidric, 0,00028 de molibdat amònic·4H₂O, 0,051 de metasilicat sòdic·9H₂O, 0,000097 de sulfat potàssic cròmic·12H₂O, 0,0029 d'àcid bòric, 0,0022 de fluorur sòdic, 0,0011 de carbonat de níquel, 0,00061 de clorur de liti, i 0,00023 de vanadat amònic.

†La barreja de vitamines aportava a la dieta (en g/kg): 0,03 de niacina, 0,016 de D-pantotenat de calci, 0,007 de piridoxina·HCl, 0,006 de tiamina·HCl, 0,002 d'àcid fòlic, 0,0002 de biotina, 0,025 de vitamina B-12, 0,016 de palmitat de vitamina A (250.000 U/g), 0,0025 de vitamina D₃ (400.000 U/g), i 0,00075 de menadiona.

‡El contingut de L-arginina de la caseïna era de d'un 1,33% (pes/pes), de forma que les dietes no suplementades (OB, OP) tenien un contingut de L-arginina del 0,3%. Amb l'addició de L-arginina, les dietes suplementades (OB-A, OP-A) arribaven a un 0,96% de L-arginina.

Taula 6. Composició en àcids grassos dels olis OB i OP en % (mol/mol)

	OB	OP
C12:0	0,02	0,20
C14:0	0,19	11,89
C14:1ω5	0,00	0,23
C15:0	0,01	0,73
C16:0	11,76	18,06
C16:1ω7	10,62	14,78
C17:0	4,54	0,49
C18:0	2,18	3,01
C18:1ω7	0,64	3,77
C18:1ω9 <i>trans</i>	0,16	0,16
C18:1ω9 <i>cis</i>	27,38	9,44
C18:2ω6	55,10	1,27
C18:3ω6	0,00	0,38
C18:3ω-3	0,95	1,40

MATERIALS I MÈTODES

C20:0	0,43	0,17
C20:1 ω -9	0,23	1,34
C20:2 ω -6	0,08	0,20
C20:3 ω -6	0,03	0,26
C20:3 ω -9	0,00	0,09
C20:4 ω -6	0,00	0,96
C20:5 ω -3	0,00	13,98
C22:0	0,30	0,14
C22:1 ω -9	0,00	0,19
C22:4 ω -6	0,00	0,83
C22:5 ω -6	0,00	0,39
C22:5 ω -3	0,00	2,80
C22:6 ω -3	0,00	9,16
C23:0	0,00	0,20
C24:0	0,17	0,10
C24:1 ω -9	0,00	0,24
Total	100,00	100,00
AGS	15,17	34,99
AGMI	28,69	32,95
AGPI	56,15	31,72
AGPI- ω -6	55,13	4,29
AGPI- ω -3	0,95	27,34
IP	57,14	125,58
IDE	152,33	187,45
IDE:AGS	10,04	5,36
AGS:AGPI	0,27	1,10

Els índexs de peroxidabilitat (IP), de dobles enllaços (IDE), d'insaturació (IDE:AGS) i de saturació (AGS:AGPI) es calcularen d'acord amb l'apartat 3.5 de Materials i mètodes.

1.2. Valoració de l'índex de peròxids en l'oli

La valoració de l'índex de peròxids dels olis amb els que es confeccionaven els pinsos ens servia per evitar l'administració als animals de dietes oxidades. Es controlà especialment l'OP, que té un índex de peroxidabilitat més gran que l'OB.

En un matrau de 250 mL s'hi col·locaren successivament uns 0,3 g d'oli, 10 mL de cloroform, 15 mL d'àcid acètic glacial i 1 mL d'una solució saturada de iodur potàssic. Es va agitar la barreja durant 1 minut i s'incubà a temperatura ambient, protegida de la llum, durant 5 minuts. Després d'això s'hi afegiren 75 mL d'aigua i 2 mL d'una solució de midó al 10%. La barreja adopta un color fosc, i es valora fins a perdre aquesta coloració amb una solució 50 mmol/L de tiosulfat sòdic, que es correspon a 0,1 eq/L. L'índex de peròxids se'n deriva de la quantitat de tiosulfat emprada en la valoració:

$$\text{Índex de peròxids} = \frac{\text{Volum tiosulfat gastat} \cdot 0,1 \text{ eq/L}}{\text{Pes de la mostra}}$$

2. Estudis en aorta

2.1. Preparació de l'aorta

Després de l'extracció, les aortes toràcica i abdominal proximal de cada rata es col·locaven en una solució Krebs-Ringer bicarbonat a pH 7,4 i a 37°C, que contenia (en mmol/L) NaCl 118,07; KCl 4,70; CaCl₂·2 H₂O 1,77; KH₂PO₄ 1,17; MgSO₄·7 H₂O 1,17; NaHCO₃ 24,04 i glucosa 12,2. Les aortes es netejaven delicadament de teixit connectiu i de sang, amb cura de no tocar la superfície luminal, i després se segmentaven en anells

de diferent tamany, d'acord amb les proves. En uns quants anells s'eliminà l'endoteli mecànicament rasant la superfície íntima amb una pinsa d'acer inoxidable.

Les proves de vasoreactivitat en bany d'òrgans es realitzaren en fresc. Per la resta, els anells eren congelats a -80°C i destinats a diferents assaigs.

2.2. Producció de $\text{O}_2^{\cdot-}$ i de ONOO^-

La producció de $\text{O}_2^{\cdot-}$ es mesurà en segments d'aorta per quimioluminiscència d'acord amb el mètode de Pagano et al. (Pagano et al., 1995) amb modificacions (Lopez et al., 2001). Així, en la valoració de $\text{O}_2^{\cdot-}$, la concentració de la lucigenina és un paràmetre crític que afecta la validesa de la mesura, ja que la lucigenina genera $\text{O}_2^{\cdot-}$ a $250\ \mu\text{mol/L}$ però no a $5\ \mu\text{mol/L}$ (Skatchkov et al., 1999).

Els anells amb endoteli intacte es col·locaren dins de tubs d'assaig amb tampó Krebs-Ringer bicarbonat en un bany a 37°C durant 30 minuts (la solució es gasificà amb una barreja de 95% O_2 -5% CO_2). Després d'aquesta incubació els anells es posaren en tubs de propilè d'1,6 mL que contenien 1 mL de la solució tampó amb $5\ \mu\text{mol/L}$ de lucigenina i s'introduïren en un luminòmetre (Bio Orbit; Turku, Finlàndia) amb la temperatura de cambra fixada a 37°C . El luminòmetre reportava les unitats arbitràries de llum emesa. La quimioluminiscència de la lucigenina fou registrada en la condició basal i després de l'addició de $100\ \mu\text{mol/L}$ de NADPH.

Uns dos altres anells més de la mateixa rata foren valorats en les mateixes condicions però en presència de $60\ \text{U/mL}$ de Cu/Zn SOD (Sigma), que elimina el $\text{O}_2^{\cdot-}$, o $1\ \text{mmol/L}$ N^{G} -monometil-L-arginina (L-NMMA, Sigma), inhibidor de la NOS. Per tots dos inhibidors hi hagué un període d'incubació de 30 minuts. S'usà L-NMMA per comptes de N^{G} -nitro-L-arginina (L-NNA, Sigma) perquè no interfereix amb la reducció d'hem dependent de NADPH i per tant no genera $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Mayer i Andrews, 1988).

Es va calcular la quimioluminiscència a partir de la integració dels valors obtinguts durant 2,5 minuts (Pagano et al., 1995). Dels resultats en presència de lucigenina se'n restaren els valors registrats en absència de lucigenina. Després de l'assaig luminomètric, els anells foren oberts i estesos sobre una placa, i s'hi va fer una

fotografia. Les imatges foren processades per calcular la superfície de l'àrea dels anells d'aorta. Els resultats s'expressen en unitats arbitràries per milímetre quadrat i per minut.

La formació de ONOO⁻ fou monitoritzada per un protocol similar mitjançant una solució de luminol a 250 µmol/L (Radi et al., 1993).

2.3. Vasoreactivitat d'anells aòrtics

Pels estudis de banys d'òrgans s'empraren anells d'aorta toràcica, amb l'endoteli intacte o eliminat, que foren fixats en ganxos d'acer inoxidable, l'inferior connectat a l'òrgan i el superior connectat a un transductor isomètric per un fil de seda. Pel bany d'òrgans s'utilitzà el tampó Krebs-Ringer bicarbonat a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Els anells s'equilibraren, amb una tensió inicial de 20 mN, durant 60 minuts, tot canviant la solució cada 15 minuts, que era bombollejada amb una barreja de 95% d'O₂ i 5% de CO₂.

2.3.1. Resposta constrictora dels anells a la fenilefrina

La fenilefrina és un agonista α_1 -adrenèrgic que produeix una contracció depenent de concentració en les preparacions d'anells aòrtics en bany d'òrgans. Mitjançant el bloqueig del O₂^{·-} alliberat per SOD exògena o la inhibició de la síntesi de ·NO per L-NNA, podem modular la vasoconstricció. Això ens permet d'evaluar indirectament la producció de ·NO i O₂^{·-} en condicions basals.

Després del període d'equilibri de 30 minuts, s'exposaren anells (triats aleatòriament) a concentracions creixents de fenilefrina (de 9 a 4 -log mol/L, que equivalen a concentracions d'1 a 100 µmol/L, respectivament). Les contraccions induïdes per la fenilefrina es feren en alguns anells en absència de SOD exògena i en altres en presència de 60 U/mL de SOD. La solució del bany es canviava tres vegades entre cada assaig, i després es deixava equilibrar l'òrgan com a mínim uns 15 minuts o fins que tornés a la tensió inicial. S'empraren uns altres anells per estudiar l'efecte de l'addició simultània de 60 U/mL SOD i de 100 µmol/L L-NNA. En el cas del L-NNA,

aquest s'afegia 20 minuts abans de la primera addició de fenilefrina, per tal que tingués temps de penetrar al medi intracel·lular. Els anells on s'hi havia eliminat l'endoteli també s'exposaren a les concentracions de fenilefrina esmentades.

Les contraccions induïdes per fenilefrina s'expressaren en mil·ligrams de força. També es calculà la concentració molar que produïa el 50% de la resposta màxima (CE_{50}) mitjançant la linearització de les dades i s'expressà com a logaritme negatiu.

2.3.2. Vasorelaxació induïda per acetilcolina

Per veure l'efecte de la dieta en la vasorelaxació mediada per acetilcolina, es precontreien anells amb l'endoteli intacte amb 200 nmol/L de fenilefrina ($7,3 -\log$ mol/L) i es relaxaven amb concentracions creixents d'acetilcolina (de 8 a $4 -\log$ mol/L, que equival a de 10 a 100 μ mol/L, respectivament). Aquest procés es repetia en quatre condicions diferents:

- 1) en absència de SOD.
- 2) en absència de SOD i en presència de 100 μ mol/L L-NNA. La L-NNA s'afegia 20 minuts abans de la precontracció.
- 3) en presència de 60 U/ml SOD. La SOD s'afegia immediatament abans de la precontracció.
- 4) en presència alhora de SOD i de L-NNA.

Per avaluar la implicació de la via de la ciclooxigenasa en la vasorelaxació induïda per acetilcolina, uns altres anells amb l'endoteli intacte foren precontrets amb fenilefrina i relaxats amb acetilcolina tal i com s'ha descrit abans. Aquest procés es dugué a terme de la següent forma:

- 1) en presència de 60 U/ml SOD, afegida immediatament abans de la precontracció.
- 2) en presència alhora de 60 U/ml SOD i 100 μ mol/L L-NNA. La L-NNA s'afegia 20 minuts abans de la precontracció.

- 3) en presència de 60 U/ml SOD, 100 $\mu\text{mol/L}$ L-NNA i 100 $\mu\text{mol/L}$ indometacina (Sigma). La L-NNA i la indometacina eren afegides 20 minuts abans de la precontracció.

La solució del bany es canviava tres vegades després de cada assaig, i es deixava que els anells s'equilibrassin fins recuperar la línia de base, com a mínim durant 15 minuts. Les relaxacions induïdes per acetilcolina s'expressen com a percentatge del nivell de precontracció. Es calculà també la CE_{50} d'acetilcolina per cada corba de concentració-resposta mitjançant una linearització, i se n'expressà l'antilogaritme.

2.3.3. Vasorelaxació induïda per nitroprussiat sòdic

L'eliminació funcional de l'endoteli es donava per bona si l'anell no responia amb relaxació a l'exposició a 100 $\mu\text{mol/L}$ d'acetilcolina ($4 -\log \text{ mol/L}$) després d'una precontracció amb 200 nmol/L de fenilefrina ($7,3 -\log \text{ mol/L}$). Després de canviar tres vegades la solució del bany, aquests anells s'exposaren a concentracions creixents de fenilefrina, i un cop assolida la contracció màxima, s'hi afegien concentracions creixents de nitroprussiat sòdic (de 10 a $7 -\log \text{ mol/L}$, equivalents a concentracions de 100 pmol/L a 100 nmol/L, respectivament; Sigma), un donador exògen de $\cdot\text{NO}$. La relaxació induïda per nitroprussiat s'estudià dues vegades en el mateix anell en absència i presència de SOD, i amb ordres diferents en anells diferents. La solució de bany d'òrgans es canvià tres vegades després de cada assaig, i es deixava almenys 15 minuts perquè els anells recuperessin la línia de base.

Les relaxacions induïdes per nitroprussiat sòdic s'expressen com a percentatge de la precontracció. La CE_{50} de nitroprussiat sòdic es calculava per cada corba de concentració-resposta mitjançant una linearització i s'expressà com a logaritme negatiu.

2.4. Assaigs de la NOS

Els assaigs d'expressió i d'activitat de la NOS es realitzaren en segments aòrtics que havien estat congelats en N₂ líquid.

En el cas de l'expressió de ARNm segments d'uns 25 mg eren homogenitzats en Trizol® com es descriu en l'apartat següent. Per la valoració de l'expressió i l'activitat de la proteïna eNOS els segments aòrtics (d'uns 10 mg) s'homogenitzaven en 500 µL d'un tampó de lisi que contenia detergent de Cayman (Ann Arbor, MI, Estats Units) en un tampó a pH 7,4 (25 mmol/L Tris HCl, 1 mmol/L EDTA i 1 mmol/L EGTA). Els homogenats se centrifugaren a 20.000 x g durant 5 minuts a 4°C. Es recuperà el sobrenedant per determinar les proteïnes d'acord amb el mètode de Bradford (Bradford, 1976), i amb la γ -globulina com a patró.

2.4.1. Expressió de l'ARNm de eNOS

L'ARN total s'extreia i es quantificava a partir de l'absorbància a 260 nm. Als homogenitzats d'aorta en Trizol se'ls hi afegia 1:10 de cloroform, s'agitava fortament, s'incubava 5 minuts a temperatura ambient i se centrifugava a 12.000 x g durant 15 minuts a 4°C. Es recuperava la fase aquosa i incolora superior (<300 µL), i s'hi afegia isopropanol (1:1). Després de 10 minuts, es tornava a centrifugar a 12.000 x g durant 10 minuts a 4°C, i es recuperava el pellet, que es resuspensia en 500 µL d'etanol al 75%. Aleshores se centrifugà a 7.500 x g durant 5 minuts a 4°C, i el pellet fou resuspès finalment en 40 µL d'aigua. Per redissoldre el pellet, s'escalfà a 55°C durant 10 minuts. Per quantificar l'ARN es diluïren 20 µL d'aquesta solució en 280 µL d'aigua destilada apirògena, i s'hi mesurà l'absorbància a 260 nm. La puresa s'avaluà a partir de la relació entre les absorbàncies a 260 i a 280 nm ($A_{260}/A_{280} > 1.6$).

Per mesurar l'expressió s'utilitzà la reacció de la transcriptasa reversa i de la polimerasa (RT/PCR) mitjançant un parell de sondes d'hibridació per detectar la diana i l'amplicó de referència de l'extracte aòrtic d'ARN. S'emprà l'ARNm del gen de la

gliceraldehid-fosfat-deshidrogenasa (GAPDH) com a control intern per corregir la inhomogeneïtat de les mostres. L'amplificació mitjançant un instrument Light Cycler (Roche, Mannheim, Alemanya) es realitzava com s'ha descrit (Orta et al., 2002). A cada reacció s'afegia uns 150-300 ng de mostra d'ARN i s'ajustava la concentració de $MgCl_2$ fins a 6 mmol/L. La concentració final dels primers era de 0,5 $\mu\text{mol/L}$ i la de totes dues sondes (la d'anclatge i la d'emissió) de 0,2 $\mu\text{mol/L}$. Els primers per l'eNOS de rata foren 5'TTCCGGCTGCCACCTGATCCTAA3' i 5'AACATGTGTCCTTGCTCGAGGCA3'. Els primers per la GAPDH de rata foren 5'TCCCTCCAGATTGTCAGCAA3' i 5'AGATCCACAACGGATAACATT3'. En el tub de reacció s'hi afegia un anticòs bloquejador de l'enzim per evitar l'acció de la polimerasa Taq a temperatures inferiors a 70°C. Després de 30 minuts a 55°C per la retrotranscripció es feien 45 cicles d'amplificació a 90°C (5 segons, per la desnaturalització), 64°C (15 segons, per l'anellament dels primers) i 72°C (15 segons, per l'elongació). Es monitoritzà la fluorescència emesa per les sondes, al llarg dels 45 cicles.

La quantificació relativa es realitzava a partir del punt d'inflexió (C_p) (el cicle en el qual la fluorescència inicia el seu creixement exponencial) per a cada reacció i la diferència entre eNOS i GAPDH ($\Delta\Delta C_p$) es calculava i l'expressem com a $2^{-\Delta\Delta C_p}$.

2.4.2. Expressió de la proteïna de eNOS

Les mostres d'homogenats aòrtics per a evaluar l'expressió de proteïna eNOS es carregaven (100 μg de proteïna per pou) en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Bio-Rad, Hercules, CA, Estats Units) al 4%-25% de dodecilsulfat sòdic. Es realitzava una electroforesi a una corrent de 100 V durant 2,5 hores. Com a control positiu s'empraren 2 μg per pou d'una eNOS bovina purificada (Cayman) i un patró pretenyit de proteïnes (Bio-Rad) per comprovar l'eficiència de transferència i tenir un patró de pes molecular.

Un cop finalitzada l'electroforesi, les proteïnes del gel es transferien a una membrana de nitrocel·lulosa, mitjançant l'aplicació d'una corrent de 100 V durant 1 hora (sistema Miniprotein II de Western blot de Bio-Rad).

Amb l'objectiu de bloquejar els llocs d'unió inespecífica de la membrana, aquesta s'incubà amb llet desnatada en pols al 5% en un tampó (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl i 0,1% de Tween 20) a pH 7.5 durant 1 hora. Després de diversos rentats, les membranes eren exposades a un anticòs policlonal humà contra eNOS (Cayman, 1:5000 en el tampó anterior) durant 1 hora. La detecció de l'anticòs primari es realitzava mitjançant el kit Immun-Star Anti-Rabbit Detection (Bio-Rad). A continuació s'eixugà la membrana i s'exposà immediatament a una pel·lícula fotogràfica específica (BioMax Light-2, Sigma). La pel·lícula es revelà i, per l'anàlisi semiquantitativa, les imatges de Western blot s'exportaven com a arxius ".tif", i per a la quantificació se seleccionaven els rectangles corresponents a bandes específiques; les intensitats es calculaven com la intensitat integrada de tots els píxels que hi ha dins dels rectangles i el corregia amb rectangles del fons, mitjançant el sistema de Scion Imaging software (Scion Corporation, Las Vegas, NV, Estats Units).

Els resultats s'expressen en unitats relatives de densitometria en relació a la eNOS bovina, de forma que cada unitat es correspon a 2 µg de eNOS bovina.

2.4.3. Activitat de la NOS

S'empraren mostres dels homogenats de l'apartat anterior per mesurar-hi l'activitat de la NOS mitjançant la conversió de la [³H]-L-arginina en [³H]-L-citrul·lina. Es va utilitzar un kit de Cayman, que contenia tots els components de les reaccions.

La reacció tingué lloc durant 30 minuts a 37°C, en presència de NADPH 1 mmol/L, BH₄ 3,33 µmol/L, FAD 1,11 µmol/L, FMN 1,11 µmol/L, ³H-L-arginina (activitat: 22,22 µCi/mL). Per cada mostra es realitzà un experiment en presència de 0,11 mmol/L de L-NAME, per tal de destriar la conversió de L-arginina a L-citrul·lina deguda a l'activitat enzimàtica. Per valorar la participació de l'endoteli en l'activitat NOS, es denudà la superfície luminal d'alguns segments aòrtics amb una pinsa d'acer inoxidable, com ja s'ha explicat a l'apartat 2.1.

Els resultats s'expressen com a picomols de citrul·lina per miligram de proteïna i per hora. També es normalitzaven d'acord amb la quantitat de proteïna eNOS, com ja s'ha descrit anteriorment.

2.5. Producció endotelial de ·NO mitjançant ressonància de spin electrònic (r.s.e.)

La detecció de ·NO es va fer d'acord amb la tècnica de Vanin (Vanin, 1999). Tres segments aòrtics (5-10 mg) de la mateixa rata foren oberts longitudinalment; dos d'ells foren deixats intactes i del tercer s'eliminà l'endoteli, per tal de verificar si el ·NO que valoràvem procedia de l'endoteli (eNOS). Es preincubaren a 37°C durant 20 minuts en tampó Krebs-Ringer bicarbonat (pH 7,4) i després exposats als agents fixadors de spin àcid dietilditiocarbàmic (DETC, 5 mmol/L concentració final) i FeSO₄·7H₂O (50 µmol/L concentració final) durant 30 minuts. Després d'eixugar els segments amb paper de filtre, es pesaren i es guardaren en eppendorfs a -80°C fins el moment de l'anàlisi. Un dels segments intactes fou preincubat durant 30 minuts en presència de L-NNA, un inhibidor de la NOS.

El complex paramagnètic detectable per ressonància s'evaluava en un Bruker 300E espectrometre (Bruker Instruments, Billerica, MA, Estats Units), col·locant la mostra en tubs de 4 mm de diàmetre. Les condicions d'anàlisi foren: (potència microones: 10 mW; modulació d'amplitud: 31,985 G; freqüència de les microones: 9,77 kHz; freqüència de modulació: 100 kHz; temperatura: 77 K).

La senyal deguda al complex es corresponia a la diferència d'intensitat entre un màxim al voltant de 3.440 G i un mínim al voltant de 3.470 G. Es generà una corba patró de Fe-·NO-DETC a partir del ·NO generat per NONOat de dietilamina (Cayman). S'utilitzaren concentracions de NONOat de 10 nmol/L a 100 µmol/L, que s'incubaven en presència de Fe²⁺ i de DETC durant 10 minuts, prou temps com perquè, a 37°C, s'alliberés la major part del ·NO (vida mitjana de 2 minuts, cada molècula de NONOat de dietilamina genera 1,5 molècules de NO). La corba aconseguida d'aquesta forma

s'utilitzà per identificar la senyal de Fe-NO-DETC i per estimar la linealitat de l'assaig. Els resultats s'expressen com a unitats d'intensitat relatives per miligram de teixit.

2.6. El contingut vascular de GMPc

Per determinar els nivells de GMPc en els segments d'aorta s'emprà el kit de "Cyclic GMP Enzyme Immunoassay" (Cayman) i es procedí d'acord amb el protocol descrit en el full d'instruccions. S'homogenitzaren segments aòrtics d'uns 10 mg en 500 µL en tampó Krebs-Ringer bicarbonat (pH 7,4), en presència d'àcid tricloroacètic al 10%.

Una vegada valorada la concentració de proteïnes de l'homogenat, per la tècnica de Bradford, es procedí a l'anàlisi, que es basa en una reacció de competència entre el GMPc de la mostra i el GMPc marcador del kit pels anticossos de rata presents en els pouets de la placa. Prèviament les mostres foren acetilades per augmentar l'afinitat de l'anticòs primari pel GMPc.

Els resultats s'expressen com a picomols de GMPc per gram de proteïna.

2.7. Mesura de la L-arginina i de la L-citrul·lina en la paret de l'aorta

Per determinar els nivells de L-arginina i L-citrul·lina lliures en la paret de l'aorta es realitzà una anàlisi d'aminoàcids en homogenats d'aorta (25 mg de teixit) mitjançant un cromatògraf de bescanvi iònic (Alpha Plus Two, Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Suècia) i un autoanalitzador (Chromaspeck-Rank Hilger, Hilger Analytical, Westwood Monget Kent, Regne Unit), dotat d'una columna de 300 mm de longitud i 3 mm de calibre de reina Dionex DC 6 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, Estats Units).

S'empraren els tampons de citrat de liti recomanats pel fabricant (Hilger Analytical). La derivatització posterior amb orto-ftaldialdehid produïa derivats fluorescents, que eren detectats amb un fluorímetre (395 nm d'excitació-475 nm d'emissió) (Kontron SFM-25, Rotkreuz, Switzerland). L'eficiència de recuperació de la norleucina, emprada com a

patró intern, serví per corregir els valors corresponents a l'arginina i la citrul·lina. Els resultats s'expressaren en picomols per miligram de teixit.

2.8. Activitat SOD i catalasa en aorta

S'homogenitzaren en un Polytron (Kinematica AG, Littau, Suïssa) segments d'aorta amb endoteli intacte (3-5 mg) en 2 mL de tampó fosfat (50 mmol/L, pH 7,0), al qual s'havien afegit 3,2 µL de Triton X-100 al 2,5%. Se centrifuga a 13.500 x g durant 15 minuts a 4°C, i es recuperà el sobrenedant.

2.8.1. Activitat SOD

L'activitat de la SOD s'assajava per la inhibició de l'autooxidació del pirogal·lol (Marklund, 1985). D'aquest assaig en deriva la definició d'unitat internacional (UI) de SOD, que és la que indueix una inhibició del 50% de l'autooxidació del pirogal·lol.

A uns 0,75 mL del sobrenedant (veure apartat anterior) s'hi afegien 1,2 mL d'etanol:cloroform fred (5:3 v/v). Després d'agitar durant 30 segons, se centrifugà a 1.770 x g a 4°C, durant 5 minuts, i es recuperà el sobrenedant.

S'assajà cada mostra a diferents dilucions en presència de pirogal·lol a temperatura ambient. Per a cada dilució s'hi seguia l'oxidació del pirogal·lol a partir de la mesura de l'absorbància a 414 nm durant 5 minuts a intervals de 30 segons. A partir de les dades d'absorbància es calculava la taxa d'autooxidació del pirogal·lol per cada dilució, i d'aquí s'inferia la quantitat de mostra que provoca una inhibició del 50% en la taxa d'autooxidació del pirogal·lol, és a dir el volum d'homogenat que contenia 1 UI de SOD. Finalment, els resultats s'expressaren com a UI per miligram de teixit.

2.8.2. Activitat catalasa

L'activitat de la catalasa s'assajà pel consum de H₂O₂, mesurat durant 15 segons per espectrofotometria d'acord amb la tècnica d'Aebi (1984) modificada per Pieper et al. (1995).

Els sobrenedants dels homogenats aòrtics de l'apartat anterior foren diluïts 1/1000 amb etanol absolut. Aquesta dilució fou incubada a 4°C durant 30 minuts. En cubetes de quars es col·locaren, successivament, 250 µL d'una solució de H₂O₂ 30 mmol/L en tampó fosfat, i 500 µL de cada mostra. Per cada mostra s'emprà un blanc on la solució de H₂O₂ era substituïda per tampó fosfat. Es realitzaven lectures en l'espectrofotòmetre, cada 5 segons durant 35 segons a 240 nm.

La taxa de reacció de primer ordre (k) de consum d'H₂O₂ per catalasa es calculà mitjançant la fórmula:

$$k = 0,153 \times \log (A_1/A_2)$$

On A₁ és l'absorbància 5 segons després d'afegir la mostra, i A₂ l'absorbància a 20 segons.

L'activitat de la mostra s'expressa en k per miligram de teixit.

2.9. Nivells d'α-tocoferol en aorta

Els nivells d'α-tocoferol en aorta de rata es valoraren mitjançant la tècnica de saponificació de Shapiro et al. (1984).

S'homogenitzà un segment d'aorta de rata (20 mg) en 1,5 mL de KCl 1,15%, en presència de 0,5 mL d'àcid ascòrbic al 25%. A l'homogenat se li afegí 2 mL d'etanol i 50 µL de retinol 0,1 mmol/L com a estàndar intern. S'incubaren 5 minuts a 70°C, i després s'hi afegí 1 mL de KOH 10 N, i després es deixà, a 70°C, durant 30 minuts. Un cop refredat, s'hi afegien 4 mL d'hexà, s'agitava i se centrifugava a 800 x g durant 15 minuts. S'extreien 3 mL del sobrenedant que eren evaporats en nitrogen, i a continuació es resuspenien en 250 µL de metanol i s'injectaven a l'HPLC.

La separació i detecció de l' α -tocoferol es du a terme per HPLC seguint la tècnica de Bieri et al. (1979). S'utilitza una columna LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) (Merck, Alemanya), insertada en un aparell Merck-Hitachi (Tòquio, Japó) amb una bomba L-6200, detector visible-ultraviolat L-4250 i un integrador cromatogràfic D-2500. Les mostres s'elueixen en metanol a un flux de 1,5 mL/minut i es registra l'absorbància a 290 nm per la vitamina E mentre que per al retinol el màxim d'absorbància és a 325 nm. Els resultats que s'obtenen s'expressen en nanomols per miligram de teixit.

3. Lipoproteïnes

3.1. Obtenció de lipoproteïnes del plasma

Es trià com a fracció d'interès el conjunt de les VLDL i LDL, ja que en rates la fracció de les LDL és molt petita. A més, com que les VLDL són les precursors directes de les LDL poden considerar-se conjuntament pel que fa a la protecció antioxidant.

El plasma s'obtenia després de centrifugar la sang a 1.770 x g a 4°C durant 15 minuts. Es congelà una alíquota de plasma a -80°C, crioprotegida mitjançant sacarosa (60 mg/mL).

Per aïllar les lipoproteïnes (VLDL+LDL) s'ajustà la densitat de les mostres de plasma (3 mL) a 1,063 g/mL amb l'addició de NaBr, mitjançant la fórmula:

$$\text{g NaBr a afegir} = (\text{Volum mostra} \times (\rho_{\text{final}} - \rho_{\text{inicial}})) / (1 - (0,32 \times \rho_{\text{final}}))$$

Aquestes mostres es cobrien amb 2 mL d'una solució de NaCl al 0,9% que contenia 0,01% de Na₂EDTA, pH 7,4 i d'una densitat de 1,063 g/mL. La centrifugació fou realitzada a 100.000 x g a 4°C durant 18 hores (Rotor 70.1 Ti, Beckman Instruments, Fullerton, CA, Estats Units) en tubs de policarbonat de 10,4 mL. Es recuperà la capa superior (vora 1 mL), on es trobaven les VLDL+LDL.

L'excés de sals i d'EDTA fou eliminat per passatge a través de columnes PD-10 de Sephadex G-25 M (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Espanya), prèviament

activades amb 25 mL de tampó fosfat salí (K_2HPO_4 8,09 mmol/L, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 2,94 mmol/L, NaCl 150,24 mmol/L; pH 7,4). Després de carregar 1 mL de mostra, i de rentar amb 1,7 mL de tampó fosfat salí, la mostra es recuperarà per elució amb 2 mL addicionals de tampó fosfat salí.

Es quantificà les proteïnes de l'eluat mitjançant el mètode de Bradford (1976), amb la referència d'una recta-patró realitzada amb γ -globulina.

Pels estudis d'oxidació, les lipoproteïnes s'utilitzaren immediatament després de la seva purificació. Pels estudis bioquímics, 1 mL de VLDL+LDL es congelà amb 20 μ L de 2, [6]-di-tert-butil-p-cresol (BHT) 10 mmol/L a excepció de les mostres per determinar el contingut d' α -tocoferol i de retinol, i la capacitat antioxidant total.

3.2. Mobilitat electroforètica de les lipoproteïnes

3.2.1. Mobilitat electroforètica de lipoproteïnes intactes

La separació de les lipoproteïnes plasmàtiques es realitzà en gels de poliacrilamida Lipofilm (Sebia Electrophoresis, Norcross, GA, Estats Units), d'acord amb les instruccions del kit. A les mostres (5 μ L) s'hi afegí negre Sudà (5 μ L), per tenyir els lípids.

Després de submergir el gel d'electroforesi en tampó durant 2 hores, es carregaren les mostres (8 μ L de plasma per pou, en presència de negre Sudà 1:2) en l'extrem corresponent a l'ànode. L'electroforesi es desenvolupà a un amperatge de 0,01 A, durant un mínim de 45 minuts per tal d'aconseguir una bona separació de les bandes.

Després de l'electroforesi, els gels es deixaren en solució de rentat (àcid acètic 5% v/v i glicerol 0,5% v/v) durant 1 hora, tot seguit s'assecaren en una estufa a 80°C durant tota la nit.

3.2.2. Mobilitat electroforètica d'apolipoproteïnes de VLDL+LDL

Una alíquota de la fracció de VLDL+LDL es barrejà amb un tampó que contenia (v:v) 15,76 g/L Tris HCl, 60% glicerol, 60 g/L SDS, i foren separades en un SDS-PAGE. Les bandes de proteïnes eren tenyides amb blau de Coomassie.

Els gels eren equilibrats durant 2 hores a 120 V, abans de carregar-hi les mostres. Aquestes havien sigut prèviament escalfades durant 15 minuts a 80°C. A cada pou s'hi col·locaven 30 µL de mostra (que corresponien a uns 2 µg de proteïna). L'electroforesi es realitzà sota una corrent de 120 V durant 2 hores.

Finalitzada l'electroforesi, els gels eren fixats (tampó de fixació, constituït per 10% d'àcid acètic i 25% d'isopropanol) durant 10 minuts, i després tenyits amb blau de Coomassie, durant 1 hora. Després d'això els gels eren assecats.

En alguns gels es carregaren lipoproteïnes completament oxidades, que havien sigut exposades a una solució 62,5 µmol/L de CuCl₂ durant 24 hores. Això induïa un canvi en la mobilitat electroforètica de les apolipoproteïnes.

3.3. Susceptibilitat de les lipoproteïnes a l'oxidació per CuCl₂

S'incubaren alíquotes de lipoproteïnes (fracció VLDL+LDL, 50 µg/mL de concentració final de proteïnes) en PBS oxigenat amb CuCl₂ a 1,25 µmol/L a 30°C. Es va utilitzar aquesta concentració final de CuCl₂ donat que a concentracions superiors es feia difícil calcular el temps de latència en la fracció de VLDL+LDL procedent de rates alimentades amb OP. La formació de DC fou monitoritzada per l'absorbància a 234 nm cada 10 minuts durant 5 hores, en un espectrofotòmetre que permetia la lectura simultània de fins a 8 cubetes (Spectronic Genesys 2, Milton Roy Company, Ivyland, P, Estats Units).

A baixes concentracions de Cu²⁺ la formació de DC segueix una gràfica sigmoidea, amb una fase de latència, seguida d'una producció exponencial (fase de propagació) fins a arribar a un màxim. La fase de latència, la velocitat d'oxidació i els nivells màxims de DC es calculà segons Esterbauer (Esterbauer et al., 1992).

Per calcular la durada de la fase de latència (en minuts), s'obtenen les rectes d'augment de l'absorbància que es corresponen a la fase de latència i a la fase d'augment exponencial. La intersecció de totes dues rectes es correspon al temps de durada de la fase de latència.

Per calcular la velocitat d'oxidació (en nmols/minut) i els nivells màxims de DC (en nmols/L) es tingué en compte el coeficient d'extinció molar (29,5 L/mol/cm), i la concentració de proteïnes de la mostra, dels quals resulta un factor de conversió de 22,8. Així doncs, en el cas de la velocitat d'oxidació es multiplicava la pendent de la recta de la fase d'augment exponencial amb aquest factor, i pels nivells màxims de DC s'hi multiplicaven les unitats d'absorbància.

3.4. Capacitat antioxidant de les lipoproteïnes

3.4.1. Contingut d' α -tocoferol en lipoproteïnes

L' α -tocoferol es mesurà en extractes de lipoproteïnes per HPLC després de l'extracció en hexà de la solució de lipoproteïnes. Es barrejaren 100 μ L de solució de lipoproteïnes amb una solució metanòlica de 50 μ L de BHT com a antioxidant, 100 μ L de solució aquosa d'acetat d' α -tocoferol (com a patró intern), 850 μ L de metanol, 3 mL d'hexà i 900 μ L d'aigua destilada. Després d'agitar, se centrifugà a 1.700 x g durant 10 minuts a 4°C. La fase hexànica fou evaporada en corrent de nitrogen fins a la sequetat i el residu fou resuspès en 250 μ L de metanol.

La detecció es realitzà mitjançant HPLC (Merck-Hitachi, Tòquio, Japó), dotat d'una bomba L-6200, un detector Vis/UV L-4250 i un integrador D-2500 en una columna LiChrospher (100 RP-18 (25 x 0.4 cm, 5 μ m) (Merck). Com a fase mòbil s'emprà metanol a un flux de 1,5 mL/minut (gradient isocràtic, pressió de columna de 1.600 bars). S'injectaren 200 μ L de cada extracte. La detecció es feia a 325 nm (0 - 4,5 minuts) i a 290 nm (4,5 - 10 minuts).

Gràcies a l'acetat de tocoferol (utilitzat com a patró intern) es podia controlar el percentatge de recuperació per cada mostra.

Les fórmules emprades per relacionar l'àrea del cromatograma (amb una sensibilitat de 0,004 AUFS i una velocitat del paper de 5 mm/minut) foren:

$$\text{àrea (mm}^2\text{)} = 21250 \text{ nmol acetat d}'\alpha\text{-tocoferol} + 0,2133.$$

$$\text{àrea (mm}^2\text{)} = 50838 \text{ nmol } \alpha\text{-tocoferol} - 0,01891.$$

$$\text{àrea (mm}^2\text{)} = 373673 \text{ nmol retinol} - 0,003152.$$

Els resultats s'expressaven en pmols d' α -tocoferol per micrograms de proteïna.

3.4.2. Capacitat antioxidant total de les lipoproteïnes

Per determinar la capacitat antioxidant total, s'utilitzà el kit de capacitat antioxidant total (Randox Laboratories Ltd., Antrim, Regne Unit). El principi del kit es basa en l'oxidació del ABTS^{•+}. Aquest radical té una coloració verda relativament estable. La presència d'antioxidants en la mostra produeix una reducció de la coloració proporcional a la concentració d'aquests. Es procedí d'acord amb el full d'instruccions del kit. L'absorbància a una longitud d'ona de 620 nm es mesurà en un lector iEMS (LabSystems, Cheshire, Regne Unit). Els resultats s'expressen en mmol/ μ g de proteïnes.

3.5. Composició en àcids grassos de les lipoproteïnes

La composició en àcids grassos de les lipoproteïnes s'evaluà per cromatografia de gasos, d'acord amb el mètode de Lepage i Roy (1986), modificat per Matorras et al. (1998).

S'afegiren 2 mL de toluè:metanol (1:4 vol/vol), que contenien 10 μ g d'àcid n-heptadecanoic com a patró intern, a uns 100 μ L de mostra. Després de barrejar-ho, s'hi afegiren 200 μ L de clorur d'acetil, i el tub s'incubà durant tota la nit (16-18 hores) a 60°C. Aleshores s'hi afegien 500 μ L de n-heptà, que contenien 250 μ g de BHT, i 3 mL

de carbonat potàssic al 10%, i se centrifugava per separar les fases i la fase superior era transferida a un vial de vidre. El solvent era evaporat sota una corrent de nitrogen en un bany de sorra a 35°C, i el residu es dissolgué en 50 µL de n-heptà.

Els metilesters d'àcids grassos eren separats per cromatografia de gasos capilar en una columna de 30 mm SP-2330 (diàmetre intern de 0,32 mm, gruix del film de 0,2 mm). El cromatògraf era de Hewlett-Packard (model 5890 sèrie II, Palo Alto, CA, Estats Units). El flux del gas transportador (He) era de 0,95 mL/minut. La temperatura de la cambra es programà de forma que passava de 80°C a 140°C, a una velocitat de 50°C/minut, i de 140°C a 190°C a una velocitat de 5°C/minut. Després de 5 minuts a 190°C, la temperatura augmentà de nou a 215°C a 5°C/minut i es mantingué a 215°C durant 8 minuts. Les temperatures de l'injector i el detector eren de 250°C.

L'IDE es calculava a partir de la fórmula:

$$\text{IDE} = \text{Sumatori} [\%(\text{mol/mol}) \cdot (\text{número de dobles enllaços})]$$

L'IP es calculava a partir de la fórmula:

$$\text{IP} = \text{Sumatori} [\%(\text{mol/mol}) \cdot (\text{número de dobles enllaços} - 1)]$$

L'índex d'insaturació es calcula a partir de la divisió de l'IDE pel total d'AGS. L'índex de saturació es calcula a partir de la divisió del total d'AGS pels AGPI.

3.6. Difusió de ·NO al nucli lipídic de les lipoproteïnes

Els estudis de difusió de ·NO al nucli lipídic d'aquestes lipoproteïnes fou realitzat en VLDL+LDL i VLDL d'acord amb Denicola et al. (2002) amb certes modificacions. La fracció VLDL+LDL fou aïllada segons el procediment de l'apartat 3.1 de Materials i mètodes.

Les lipoproteïnes s'incubaren durant tota la nit a 4°C sota una atmosfera d'argó amb una solució etanòlica que contenia 0,35 mmol/L de la sonda fluorescent 1-(pirenil)-

metil-3-(9-octadecenoiloxi)-22,23-bisnor-5-colenat (PMCho), de forma que la concentració final de PMCho era de 2 $\mu\text{mol/L}$. Després d'això, l'excés de PMCho i de sals fou eliminat per passatge a través d'una columna de PD-10, prèviament equilibrada amb tampó fosfat 0,1 M a pH 7,4. L'eluat fou desgasificat sota argó durant 20 minuts. Es determinà prèviament la concentració de $\cdot\text{NO}$ d'una solució aquosa mitjançant el mètode de l'oxihemoglobina. Es desgasificà el tampó (0,1 M de fosfat de sodi, pH 7,4) en cubetes de fluorímetre segellades amb goma mitjançant barboteig amb nitrogen durant 20 minuts. S'hi afegí LDL+VLDL incubada prèviament amb la sonda i desgasificada suaument, a través del septe amb una xeringa gastight. La concentració final de LDL+VLDL de blat de moro fou de 15 $\mu\text{g/mL}$, mentre que la de peix fou 10 $\mu\text{g/mL}$. La concentració de proteïnes fou determinada per àcid bicinonínic (Denicola et al., 2002).

Després d'això, la solució de $\cdot\text{NO}$ s'injectà progressivament i es monitoritzà la fluorescència ($\lambda_{\text{exc}} = 347$; $\lambda_{\text{em}} = 396$ nm) a cada nova addició. Per cada mostra es registrà la senyal del blanc, i es feren controls de dilució (s'agrega aigua destil·lada barbotejada 20 minuts amb argó, per comptes de $\cdot\text{NO}$, en tubs segellats amb septes de goma que contenen igual concentració de lipoproteïnes, i es registra la intensitat de fluorescència). Els resultats es normalitzaren respecte d'un blanc (aigua destil·lada per comptes de solució de $\cdot\text{NO}$) i les constants de segon ordre de "quenching" (k_{NO}) entre l'estat excitat de la sonda i el $\cdot\text{NO}$ es calcularen a partir de la pendent de les representacions d' Stern-Volmer, K_{sv} .

4. Anàlisi estadística

Les dades s'expressen com a mitjanes \pm EE; n es refereix al nombre d'individus. Quan es comparaven dos grups, les dades s'analitzaven per la prova t d'Student per observacions aparellades o desapparellades segons els casos. Si es comparaven més de dos grups, es realitzava una anàlisi de la variança unifactorial, amb el text de Student-Newman-Keuls per a comparacions múltiples. Les diferències significatives s'assenyalen amb $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ i $***P < 0,001$.

MATERIALS I MÈTODES

RESULTATS

MATERIALS I MÈTODES

RESULTATS

1. Consum de pinso i evolució del creixement de les rates

No s'observaren diferències significatives en el consum diari de pinso, a partir del dia 21 de vida, entre les quatre dietes (Figura 6), que s'estabilitza al voltant dels 25-30 g d'ingesta per dia.

L'augment en el pes corporal durant el període de 8 setmanes de dieta fou similar en les rates suplementades amb OB o OP (Figura 7), i no hi hagué diferències significatives en el pes corporal final dels quatre grups alimentaris (Taula 7), que se situa en 325 g.

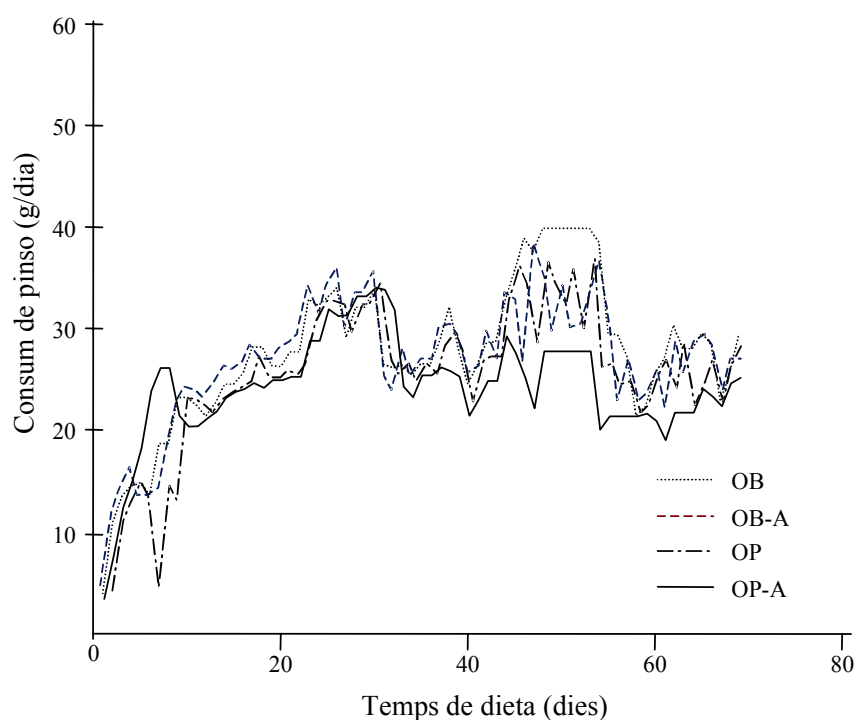


Figura 6. Evolució del consum diari de pinso durant el període experimental de les rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP), o amb aquests olis més L-arginina (OB-A i OP-A). Els valors s'expressen com a mitjana; n = 8 rates. No hi hagué diferències significatives entre els grups OB i els grups OP.

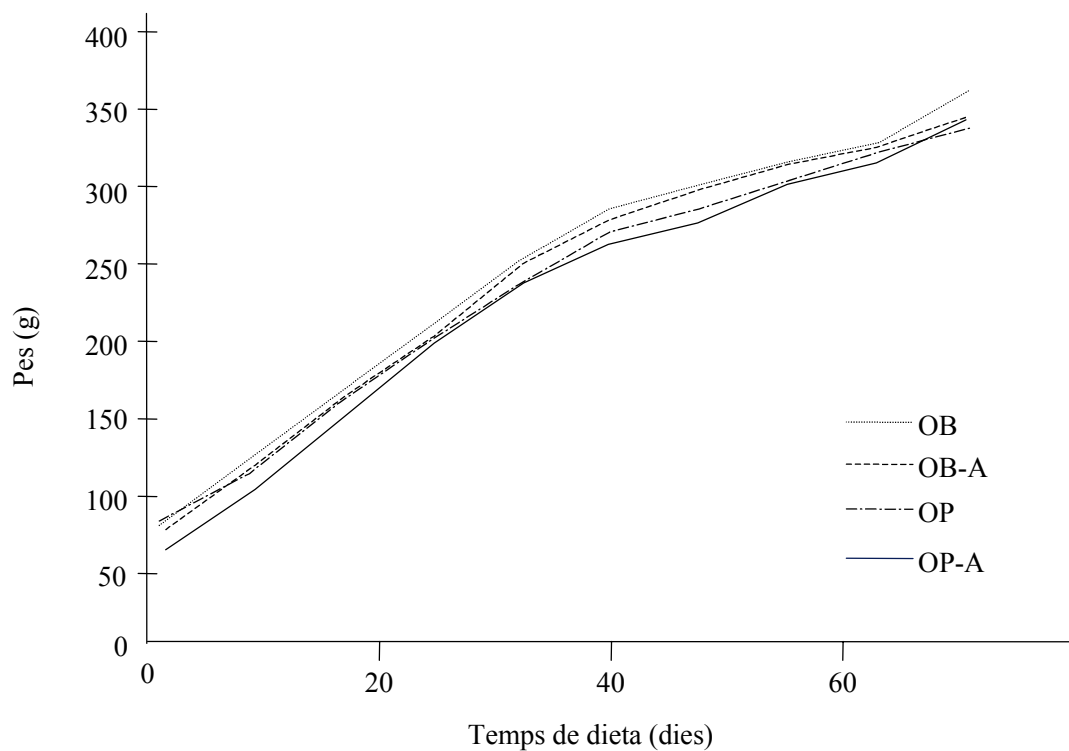


Figura 7. Evolució del pes corporal durant el període experimental de les rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP), o amb aquests olis més L-arginina (OB-A i OP-A). Els valors s'expressen com a mitjana; n = 8 rates. No hi hagué diferències significatives entre els grups.

Taula 7. Pesos a la fi del període experimental de les rates suplementades amb dietes OB, OB-A, OP o OP-A

	OB	OB-A	OP	OP-A
Pes final (g)	328 ± 6	323 ± 9	323 ± 9	321 ± 7

Els valors s'expressen com a mitjana ± EE; n = 8 rates. No hi hagué diferències significatives.

2. Estudis en aorta

2.1. Producció de $O_2^{\cdot-}$ i de $ONOO^-$

La producció de $O_2^{\cdot-}$ es va mesurar per quimioluminiscència mediada per lucigenina. Els segments d'aorta de les rates suplementades amb OB o OP produïen un nivell basal similar de $O_2^{\cdot-}$. Els valors augmentaven fins a 80 unitats arbitràries per milímetre quadrat de superfície després d'estimular-los amb 100 $\mu\text{mol/L}$ de NADPH (Taula 8). La SOD (60 U/mL) reduïa la producció de $O_2^{\cdot-}$ en un 60% en totes les condicions. L'addició de 1 mmol/L de L-NMMA augmentava significativament la producció basal de $O_2^{\cdot-}$ fins a 120 unitats arbitràries per milímetre quadrat de superfície. En cap moment s'observen diferències degudes a la dieta.

Taula 8. Producció de $O_2^{\cdot-}$ (unitats aribtràries per milimetre quadrat de superfície aòrtica) en anells amb endoteli intacte procedents de rates suplementades amb OB o OP

	OB	OP
Basal	3,8 \pm 0,5	2,7 \pm 0,2
Basal + SOD	1,5 \pm 0,2*	1,1 \pm 0,1
Basal + L-NMMA	5,4 \pm 0,7*	4,4 \pm 0,4*
Basal + NADPH	79,8 \pm 6,1	80,1 \pm 4,7
Basal + NADPH + SOD	32,0 \pm 2,4*	32,0 \pm 1,9*
Basal + NADPH + L-NMMA	119,7 \pm 9,1*	120,1 \pm 7,0*

Els valors s'expressen com a mitjanes \pm EE; n = 4-6 rates. SOD, superòxid dismutasa; L-NMMA, N^G-monometil-L-arginina. **P* < 0,05 indica diferències significatives respecte al basal o al basal + NADPH.

La quimioluminiscència mediada per luminol mostrava que la formació de ONOO⁻ amb prou feines era detectable en condició basal ni tampoc després de l'addició de NADPH.

2.2. Vasoreactivitat dels anells aòrtics

2.2.1. Resposta constrictora dels anells a la fenilefrina

La fenilefrina induí contraccions dependents de la concentració en anells aòrtics amb l'endoteli intacte de rates suplementades amb OB (Figura 8A) o OP (Figura 8B). La incubació amb 60 U/mL de SOD reduïa de forma significativa l'eficàcia de la fenilefrina a baixes concentracions (de 8,3 a 7,7 – log M, equivalent a de 5 a 20 nmol/L, respectivament) a tots dos grups de rates (Figura 8A). La CE₅₀ en absència de SOD (Taula 9) era similar en anells aòrtics control de rates suplementades amb OB i OP. L'addició de SOD l'augmentava la CE₅₀ en un 154% (expressada en nmol/L), en tots dos grups alimentaris ($P < 0,05$), i el L-NNA reduïa la CE₅₀ en presència de SOD. La contracció a una sola concentració de fenilefrina (200 nmol/L) en anells amb l'endoteli intacte de tots dos grups de rates donava la mateixa resposta (Taula 10) en totes les condicions estudiades, llevat dels anells procedents de rates sotmeses a la dieta rica en OP incubats en presència de SOD i L-NNA en totes les condicions estudiades. Les respostes induïdes per la fenilefrina en anells amb l'endoteli denudat en absència de SOD (Taula 11) no eren significativament diferents de les respostes dels anells intactes procedents de rates alimentades amb OB (Taula 9). La SOD va reduir un 18% ($P < 0,05$) la contracció màxima induïda per fenilefrina en els anells de rates alimentades amb la dieta rica en OP (Taula 9).

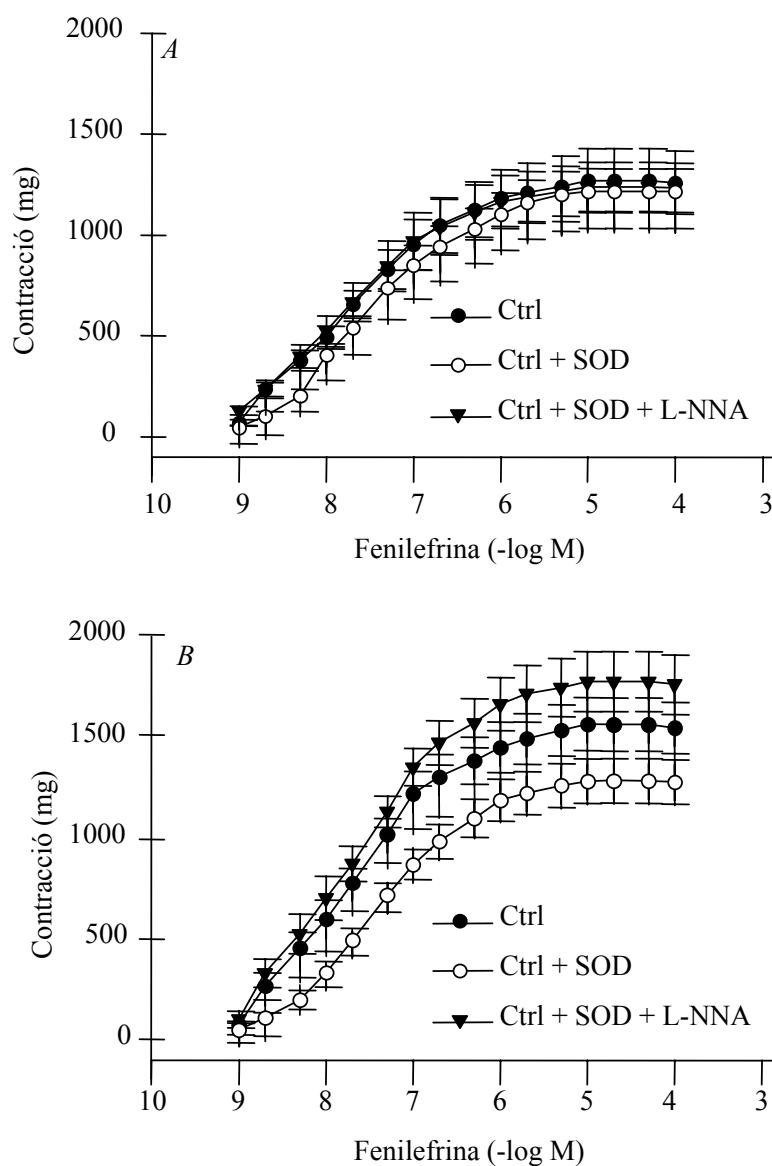


Figura 8. Contracció acumulativa induïda per fenilefrina en anells aòrtics, amb endoteli intacte, de rates suplementades amb oli de blat de moro (A) o oli de peix (B). Els anells s'incubaren en presència o absència de superòxid dismutasa (SOD; 60 U/ml) en presència o absència de N^G-nitro-L-arginina (L-NNA; 100 µmol/L). La L-NNA s'afegia 20 minuts abans de la primera concentració de fenilefrina. Els valors s'expressen com a mitjana ± EE; n = 8-16 rates. Ctrl, control.

Taula 9. Contraccions induïdes per concentracions acumulatives de fenilefrina en anells aòrtics amb l'endoteli intacte de rates suplementades amb dietes OB o OP

	Contracció màxima, mN		CE ₅₀ , nmol/L	
	OB	OP	OB	OP
Control	130 ± 16	160 ± 13	20,4 ± 4,4	19,1 ± 3,9
Control + SOD	125 ± 11	131 ± 11*	51,8 ± 9,6*	48,6 ± 7,7*
Control + SOD + L-NNA	127 ± 12	181 ± 15†	15,2 ± 2,7	18,7 ± 3,9

Els valors s'expressen com a mitjana ± EE; n = 8-16 rates. SOD, superòxid dismutasa; L-NNA, N^G-nitro-L-arginina. **P* < 0,05 indica diferències significatives respecte el control; †*P* < 0,05 indica diferències significatives del grup OP en relació al grup OB.

Taula 10. Contracció induïda (mN) per fenilefrina (200 nmol/L) en anells aòrtics amb l'endoteli intacte de rates suplementades amb OB o OP

	OB	OP
Control	119 ± 11	120 ± 7
Control + SOD	94 ± 10	95 ± 5
Control + L-NNA	135 ± 12	155 ± 9
Control + SOD + L-NNA	135 ± 13	158 ± 8*

Els valors s'expressen com a mitjana ± EE; n = 8-10 rates. SOD, superòxid dismutasa; L-NNA, N^G-nitro-L-arginina. **P* < 0,05 indica diferències significatives respecte el control.

Taula 11. Contraccions induïdes per concentracions acumulatives de fenilefrina en anells aòrtics amb l'endoteli denudat de rates suplementades amb dietes OB o OP

	Contracció màxima, mN		CE ₅₀ , nmol/L	
	OB	OP	OB	OP
Control	148 ± 10	183 ± 13†	25,1 ± 2,6	30,3 ± 3,4
Control + SOD	144 ± 12	178 ± 16	23,0 ± 1,7	22,4 ± 3,1

Els valors s'expressen com a mitjana ± EE; n = 8 rates. SOD, superòxid dismutasa. † $P < 0,05$ indica diferències significatives del grup OP en relació al grup OB.

2.2.2. Vasorelaxació induïda per acetilcolina

Els estudis de relaxació es realitzaren amb anells aòrtics (amb l'endoteli intacte), prèviament contrets amb 200 nmol/L de fenilefrina (6,6 -log mol/L). L'acetilcolina induïa relaxacions dependents de concentració en els anells precontrets. Tot i que no hi hagué cap diferència significativa en la relaxació màxima, en absència de SOD exògena (Taula 12), entre els dos grups alimentaris, la CE₅₀ en absència de L-NNA era inferior (48%, $P < 0,05$) en les rates suplementades amb OP, la qual cosa assenyalava una major eficàcia en la resposta a l'acetilcolina. L'addició de L-NNA eliminava aquesta diferència i reduïa significativament la relaxació màxima en rates tractades amb OB i OP (Taula 12) ($P < 0,05$).

La corba de relaxació induïda per acetilcolina en presència de 60 U/mL de SOD exògena es desplaçava cap a l'esquerra en les rates suplementades amb OP (Figura 9), i la relaxació màxima assolida era de 68,5% i 85,9% per rates suplementades amb OB i OP, respectivament (Taula 13). Aquests valors representen un augment del 48% i del 66%, respectivament, quan se'ls compara amb els valors d'anells incubats en absència de SOD exògena. El bloqueig de la síntesi endotelial de ·NO amb 100 µmol/L L-NNA (Taula 13) reduí la relaxació màxima aproximadament fins a un 25% en anells en tots

RESULTATS

dos grups de rates. D'això es deduïa que la relaxació dependent de ·NO era responsable del 40% i del 63% de la relaxació màxima dels anells de rates suplementades amb OB i OP, respectivament (Taula 14), obtinguda per la diferència entre la relaxació total i la relaxació en presència de L-NNA. El bloqueig de la síntesi endògena de prostanoids amb 10 µmol/L d'indometacina donà reduccions de la relaxació de 39,1% i 61,3% en els anells de rates suplementades amb OB i OP, respectivament. Per tant, la relaxació dependent de prostanoids era responsable del 26% de la relaxació màxima dels anells de tots dos grups alimentaris (Taula 13), obtinguda per la diferència entre la relaxació total i la relaxació en presència d'indometacina. La suplementació en OP augmentava la CE₅₀ (-log M) en anells aòrtics, que era del 68% ($P < 0,05$) quan s'expressava en nmol/L (Taula 12), en relació als anells de les rates suplementades amb OB. L'efecte inhibitor del L-NNA es revertia amb 100 µmol/L de L-arginina (més del 85% de la relaxació original).

Taula 12. Relaxació induïda, en absència de SOD exògena, per concentracions acumulades d'acetilcolina en anells aòrtics amb l'endoteli intacte de rates suplementades amb OB o OP

	Relaxació màxima, %		CE ₅₀ , nmol/L	
	OB	OP	OB	OP
Control	46,4 ± 3,9	51,9 ± 4,0	283 ± 48	148 ± 25†
Control + L-NNA	26,1 ± 3,6**	20,2 ± 2,0**	218 ± 43	124 ± 29

Els valors s'expressen com a mitjana ± EE; n = 8-12 rates. ** $P < 0,01$ indica una diferència significativa respecte el control; L-NNA, N^G-nitro-L-arginina. † $P < 0,05$ indica diferències significatives del grup OP en relació al grup OB.

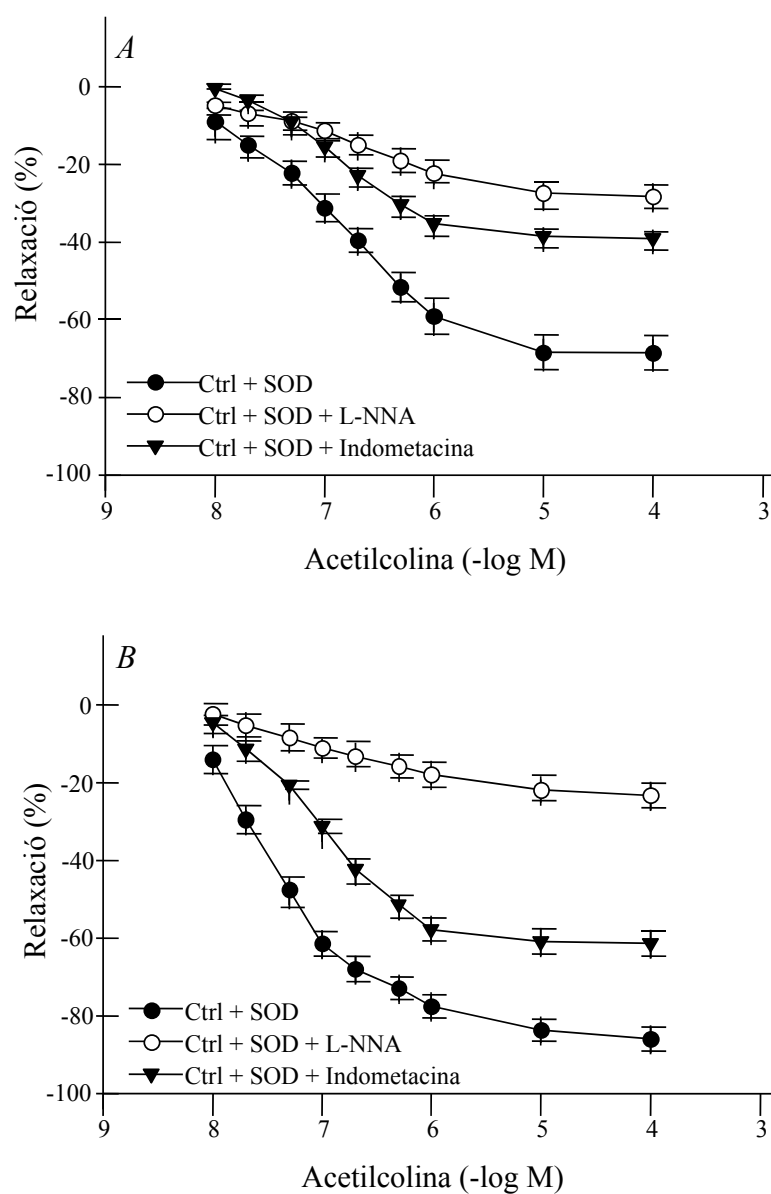


Figura 9. Relaxació acumulativa induïda per acetilcolina en anells aòrtics, amb endoteli intacte, de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB; A) o oli de peix (OP; B). Els anells s'incubaren en presència de superòxid dismutasa (SOD; 60 U/ml), en presència o absència de de N^G-nitro-L-arginina (L-NNA; 100 μmol/L) o d'indometacina (100 μmol/L). La L-NNA i la indometacina s'afegien 20 minuts abans de la precontracció amb fenilefrina. Els valors s'expressen com a mitjana ± EE; n = 8-15 rates. Ctrl, control.

Taula 13. Relaxació induïda, en presència de SOD exògena, per concentracions acumulades d'acetilcolina en anells aòrtics amb l'endoteli intacte de rates suplementades amb OB o OP

	Relaxació màxima, %		CE ₅₀ , nmol/L	
	OB	OP	OB	OP
Control + SOD	68,5 ± 4,4	85,9 ± 3,1†	129 ± 14	43 ± 5†
Control + SOD + L-NNA	28,3 ± 2,9*	23,3 ± 3,0*	179 ± 42	206 ± 51*
Control + SOD + Indometacina	39,1 ± 1,8*	61,3 ± 3,3*†	173 ± 23	102 ± 97*

Els valors s'expressen com a mitjana ± EE; n = 8-15 rates. SOD, superòxid dismutasa; L-NNA, N^G-nitro-L-arginina. **P* < 0,05 indica diferències significatives respecte el control +SOD; †*P* < 0,05 indica diferències significatives del grup OP en relació al grup OB.

Taula 14. Components de la relaxació induïda per acetilcolina en anells d'aorta procedents de rates suplementades amb OB o OP en presència de SOD exògena (60 U/mL)

	OB	OP
Relaxació total (%)	64,7 ± 2,8	84,8 ± 2,2†††
Relaxació mediada per NOS (%)	40,2 ± 4,9	62,6 ± 3,6†††
Relaxació mediada per COX (%)	29,4 ± 2,6	24,6 ± 1,5

Els valors s'expressen com a mitjana ± EE; n = 8-23 rates. NOS, òxid nítric sintasa; COX, ciclooxigenasa. †††*P* < 0,001 indica diferències significatives del grup OP en relació al grup OB.

2.2.3. Vasorelaxació induïda per nitroprussiat sòdic

La vasorelaxació induïda per nitroprussiat sòdic es realitzà en anells aòrtics denudats després de precontractar-les amb 200 nmol/L fenilefrina en absència o presència de 60 U/ml SOD exògena. La relaxació era dependent de concentració (Figura 10), que era potenciada amb SOD sols a baixes concentracions (3-10 $\mu\text{mol/L}$, equivalent a 5,5-5 – log mol/L) de nitroprussiat sòdic. La relaxació màxima assolida era aproximadament d'un 100% i les CE_{50} (-log M) eren similars per als dos grups (Figura 10), amb una reducció significativa ($P < 0,01$) en presència de SOD.

Els estudis de vasorelaxació també es realitzaren en anells aòrtics amb l'endoteli intacte. En aquest cas, no hi havia tampoc diferències entre els dos grups alimentaris (Taula 11) i s'observava que els anells aòrtics procedents de rates suplementades amb OP responien amb més efectivitat al nitroprussiat quan se'ls exposava a SOD exògena (Taula 15).

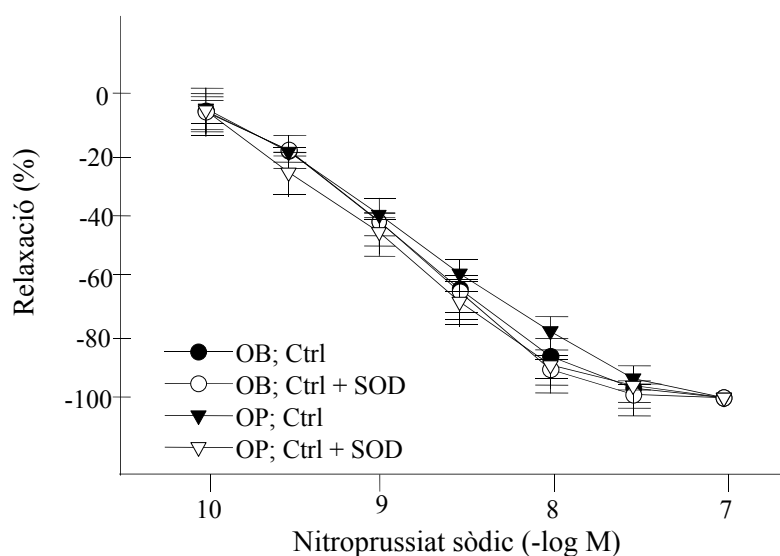


Figura 10. Relaxació acumulativa induïda per nitroprussiat sòdic en anells aòrtics, amb l'endoteli denudat, de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP). Els anells s'incubaren en presència o absència de superòxid dismutasa (SOD). Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; $n = 7$ rates. Ctrl, control. No hi hagueren diferències significatives entre els dos grups.

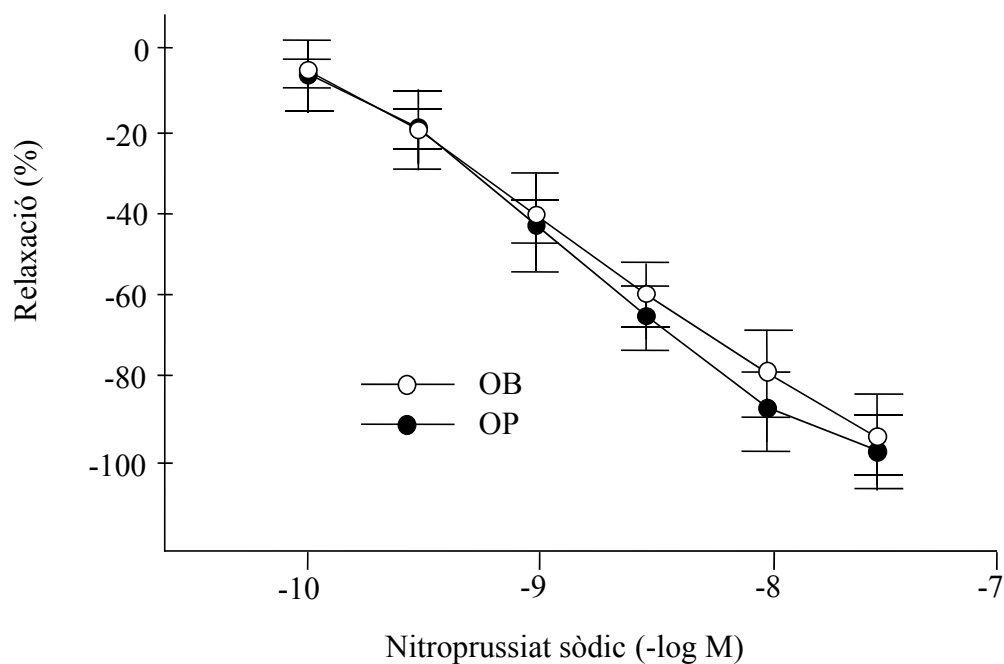


Figura 11. Relaxació acumulativa induïda per nitroprussiat sòdic en anells aòrtics, amb l'endoteli intacte, de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP). Els valors són mitjana \pm EE; n = 7 rates.

Taula 15. CE_{50} (nmol/L) de la resposta al nitroprussiat sòdic per anells aòrtics amb l'endoteli intacte procedents de rates suplementades amb OB o OP

	OB	OP
Control	9,5 \pm 2,0	6,9 \pm 1,1
Control + SOD	3,2 \pm 0,5**	2,7 \pm 0,5**

Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; n = 8-12 rates.

** $P < 0,01$ indica diferències significatives respecte el control.

2.3 Assaigs de la NOS

2.3.1. Expressió de l'ARNm de eNOS

L'expressió d'ARNm d'eNOS ($0,0209 \pm 0,0010$ i $0,0273 \pm 0,0006$ pels grups OB i OP, respectivament) augmentava en un 31% ($P < 0,01$), expressats en $2^{-\Delta\Delta C_p}$ en l'aorta de les rates suplementades amb OP en relació a les OB (Figura 12).

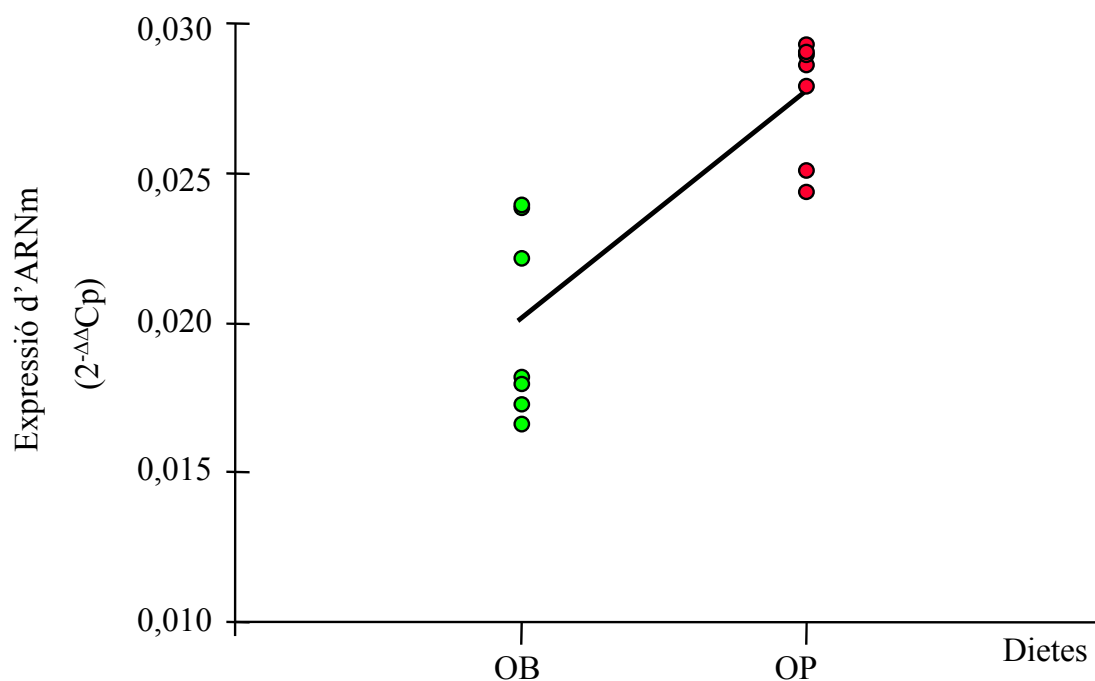


Figura 12. Expressió de l'ARNm de l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) en aortes de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP). Les mesures s'obtingueren mitjançant RT/PCR a partir d'un extracte total d'ARN de segments aòrtics. Es mostren els valors individuals (punts) i la relació entre les mitjanes (línia).

2.3.2. Expressió de la proteïna de eNOS

A la Figura 13A s'hi mostra un Western blot representatiu de la proteïna d'eNOS d'homogenats d'aorta toràcica de rates suplementades amb OB i OP. Els histogrames que s'acompanyen (Figura 13B) il·lustren la mitjana de l'expressió de la proteïna eNOS (unitats densitomètriques relatives) per cada grup. L'expressió de proteïna eNOS en aorta augmentà un 70% ($P < 0,001$) en les rates suplementades amb OP respecte de les suplementades amb OB.

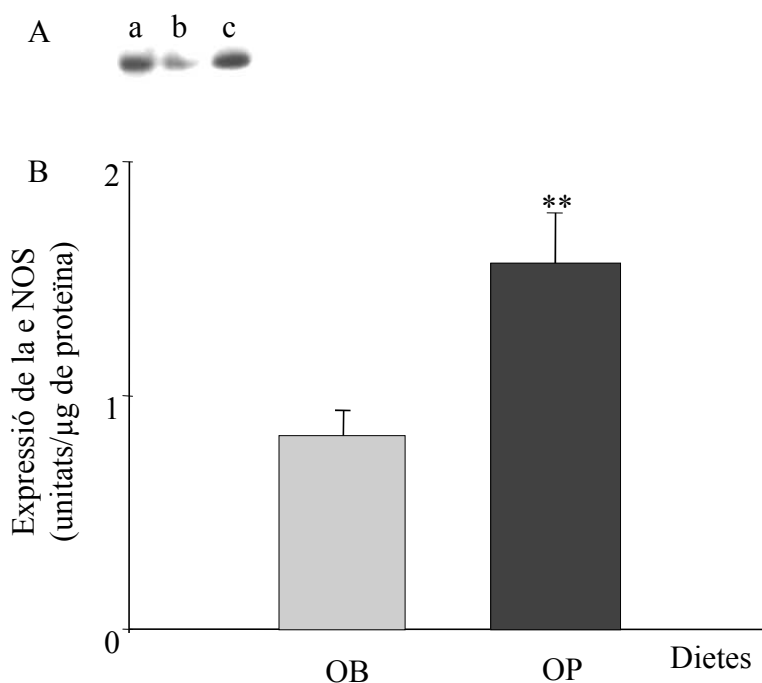


Figura 13. (A) Exemple de Western blot de l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) realitzat amb: a) un patró de eNOS bovina; b) homogenat aòrtic d'una rata suplementada amb oli de blat de moro (OB); c) homogenat aòrtic d'una rata suplementada amb l'oli de peix (OP). Per a la detecció s'emprà un anticòs policlonal contra eNOS humana. (B) Nivells de proteïna eNOS (en unitats relatives de densitometria), estimats a partir dels Western blots. Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; $n = 4$ rates. $**P < 0,01$ indica diferència del grup OP en relació al grup OB.

2.3.3. Activitat de la NOS

L'activitat NOS (Figura 14) era un 102% més gran ($P < 0,01$) en homogenats d'aorta toràcica amb endoteli funcional de les rates suplementades amb OP respecte a les rates suplementades amb OB. Amb tot, quan l'activitat NOS es normalitzava respecte la quantitat de proteïna eNOS no hi havia diferències significatives entre els dos grups de dietes ($33,6 \pm 4,7$ i $28,4 \pm 3,2$ picomols per microgram de proteïna per hora, respectivament). La formació de [^3H]-L-citrul·lina per homogenats d'aorta de tots dos grups es bloquejava gairebé completament amb l'addició de 1 mmol/L L-NAME ($3,1 \pm 0,2$ and $2,5 \pm 0,2$ picomols per miligram de proteïna per hora pels grups OB i OP, respectivament). L'activitat NOS dels segments amb l'endoteli denudat era indetectable, la qual cosa indica que l'augment observat de l'activitat NOS en segments intactes és deguda a la eNOS.

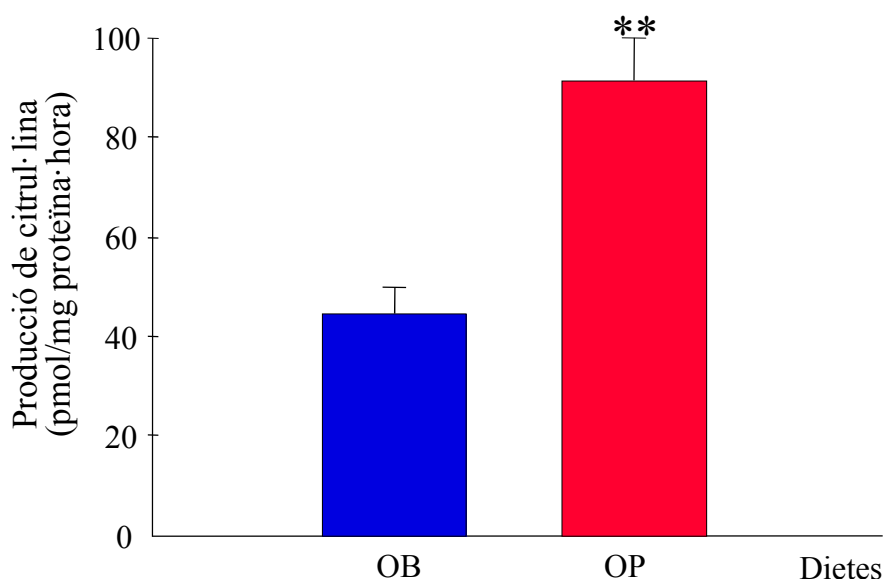


Figura 14. Activitat òxid nítric sintasa (NOS) en homogenats d'aorta de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP). Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; $n = 6$ rates. ** $P < 0,01$ indica diferència del grup OP en relació al grup OB.

2.4. Producció endotelial de ·NO mitjançant ressonància de spin electrònic (r.s.e.)

Incubat en presència de DETC i FeSO₄ un segment aòrtic obert longitudinalment amb l'endoteli intacte procedent d'una rata alimentada amb un pinso estàndar d'estabulari dona lloc a un espectre (Figura 15A) que es pot superimposar a les senyals que s'obtenen emprant 100 µmol/L NONOat com a donador de ·NO (Figura 15B). La incubació dels segments aòrtics amb endoteli funcional de rates suplementades amb OB o OP en presència del complex DETC-Fe donen respectivament els espectres mostrats a la Figura 15C i 15D. L'aparició de la senyal corresponent al DETC-Fe·NO era pràcticament abolida amb 1 mmol/L L-NNA (Figura 15E). L'administració d'OP a la dieta durant 8 setmanes augmentà significativament (90%, $P < 0,001$) la biodisponibilitat de ·NO en teixit vascular (Figura 16). Així i tot, quan la producció de ·NO es normalitzava d'acord amb la proteïna de eNOS no s'hi trobava cap diferència entre els dos grups alimentaris. La incubació amb L-NNA reduïa la senyal en $92,8 \pm 3,7$ i $95,1 \pm 4,6\%$ en rates suplementades amb OB i OP, respectivament. Els segments denudats donaven una senyal molt petita per miligram de teixit en tots dos grups alimentaris (124 ± 6 i 117 ± 7 unitats/mg per OB i OP, respectivament), cosa que indicava que l'endoteli era la principal font de ·NO.

D'altra banda, la suplementació de les dietes amb L-arginina (OB-A i OP-A) provocava un augment significatiu de la producció aòrtica de ·NO tant pel que fa a l'OB (37%) com a l'OP (24%) (Figura 16).

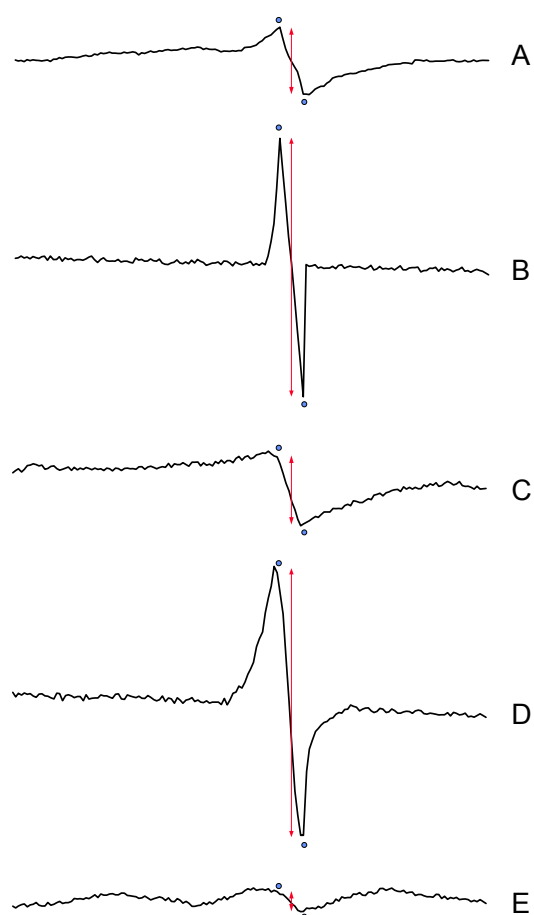


Figura 15. Exemples d'espectres de ressonància de spin electrònic corresponents al complex Fe-NO-àcid dietilditocarbàmic: (A) d'un segment aòrtic procedent d'una rata alimentada amb pinso estàndar d'estabulari; (B) generat per incubació de 100 $\mu\text{mol/L}$ de dietilamina NONOat; (C) d'un segment aòrtic d'una rata suplementada amb oli de blat de moro; (D), d'un segment aòrtic d'una rata suplementada amb oli de peix; (E) d'un segment aòrtic d'una rata suplementada amb oli de peix i incubat en presència d'1 mmol/L de N^{G} -nitro-L-arginina.

RESULTATS

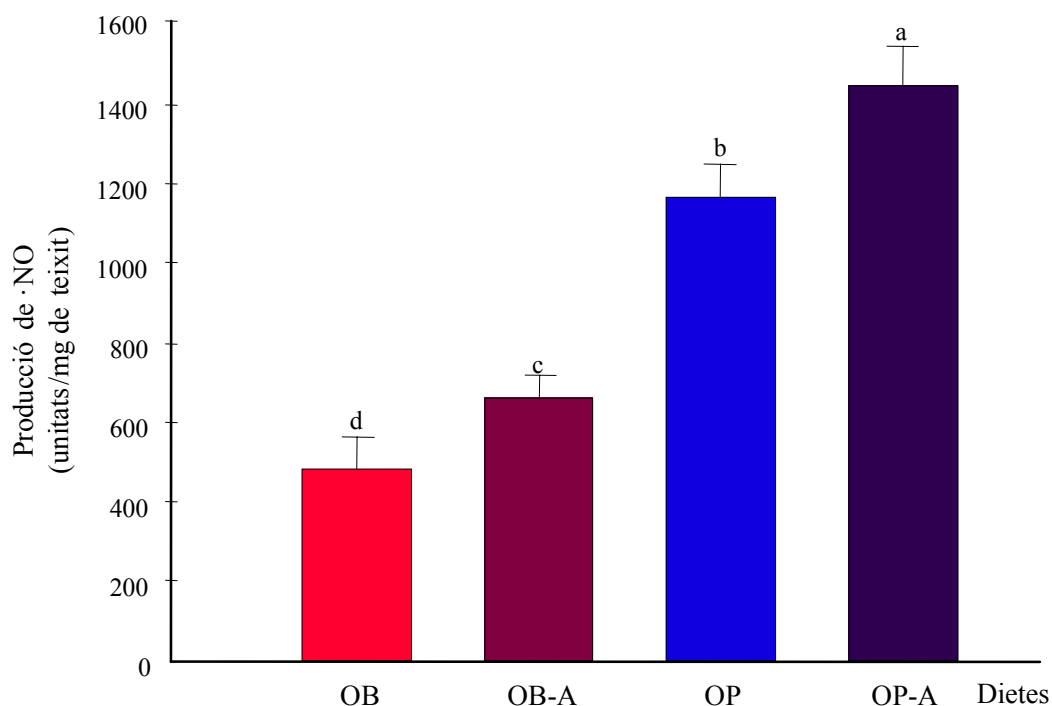


Figura 16. Producció d'òxid nítric ($\cdot\text{NO}$) per segments aòrtics de rates suplementades d'oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP) o, a més, amb L-arginina (OB-A i OP-A). Les mesures s'obtingueren mitjançant ressonància de spin electrònic. Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; $n = 6$ rates. Les diferències entre grups alimentaris s'indiquen amb lletres diferents.

2.5. El contingut vascular de GMPc

Les aortes toràciques de rates suplementades amb OP acumulaven un 112% més de GMPc (Figura 17) que les aortes de rates suplementades amb OB. La suplementació amb L-arginina també augmentà significativament en tots dos casos el contingut de GMPc (95% en el cas de les rates suplementades amb OB i 52% en el cas de les rates suplementades amb OP).

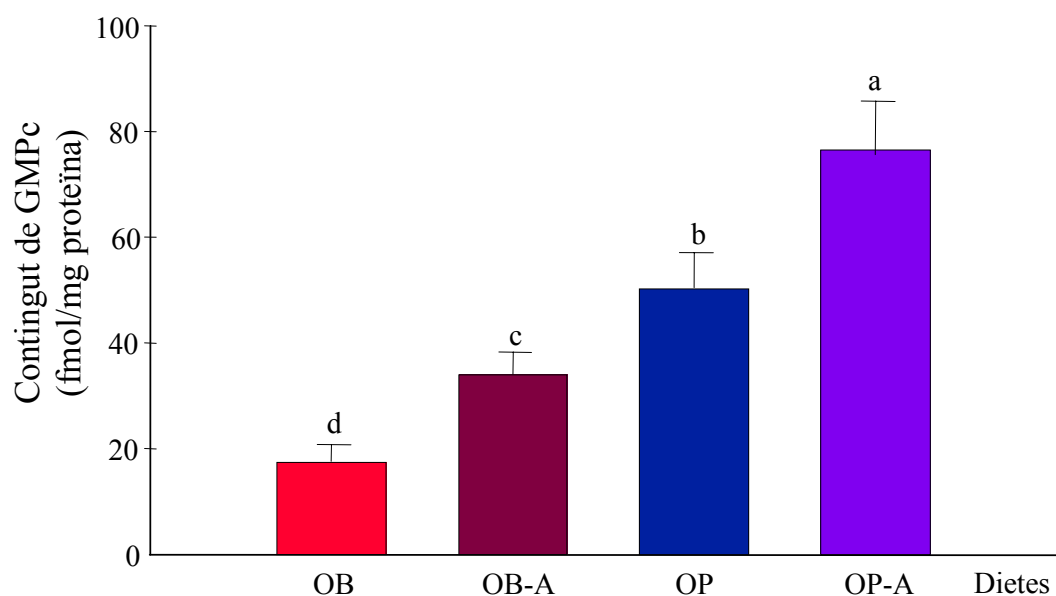


Figura 17. Contingut de GMPc en segments aòrtics de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP) o, a més, amb L-arginina (OB-A i OP-A). Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; $n = 6$ rates. Les diferències entre grups alimentaris s'indiquen amb lletres diferents.

2.6. Mesura de la L-arginina i de la L-citrul·lina en aorta

La relació L-arginina/L-citrul·lina en homogenats aòrtics de rates suplementades amb OP (Figura 18C) era inferior respecte de les rates suplementades amb OB ($6,4 \pm 1,2$ i $13,1 \pm 1,6$, respectivament). Això era degut a una disminució en el contingut de L-arginina (534 ± 41 i 357 ± 41 , per OB i OP, respectivament) (Figura 18A) i a un augment en el contingut de L-citrul·lina (42 ± 3 i 60 ± 7 , CO i MO respectivament) en les rates alimentades amb OP (Figura 18B).

RESULTATS

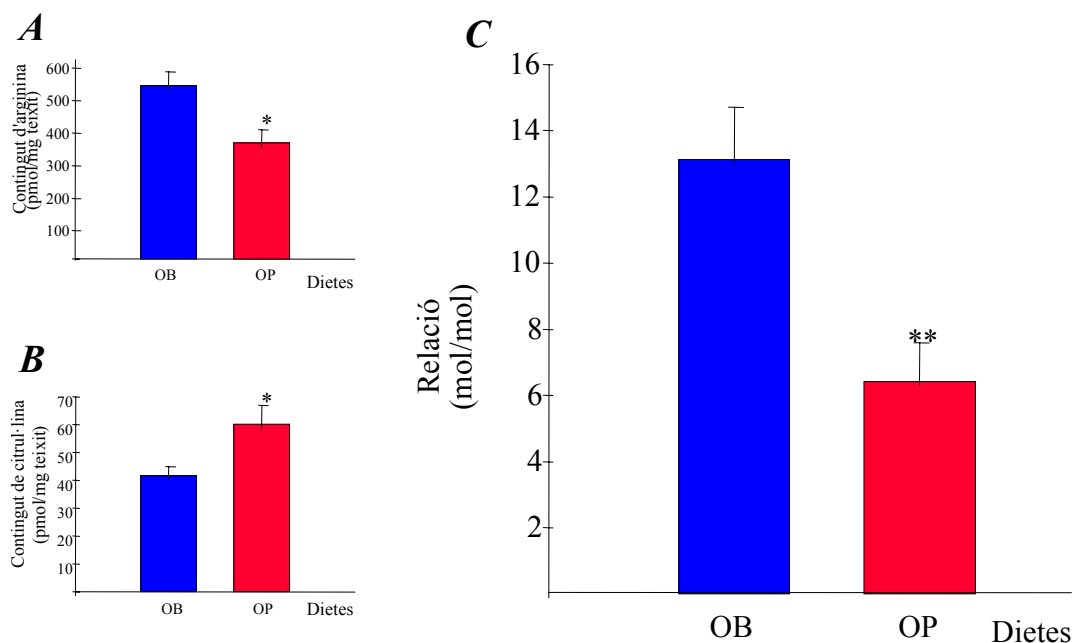


Figura 18. Contingut d'arginina (**A**), de citrul·lina (**B**), i relació entre elles (**C**), en segments aòrtics de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o d'oli de peix (OP). Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; $n = 6$ rates. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ indiquen diferències del grup OP en relació al grup OB.

2.7. Activitat SOD i catalasa en aorta

Les activitats de la SOD (Figura 19) i de la catalasa (Figura 20) foren similars tant en els homogenats d'aorta de les rates suplementades amb OB com en els de les rates suplementades amb OP. La suplementació amb L-arginina tampoc no alterà aquestes dues activitats enzimàtiques.

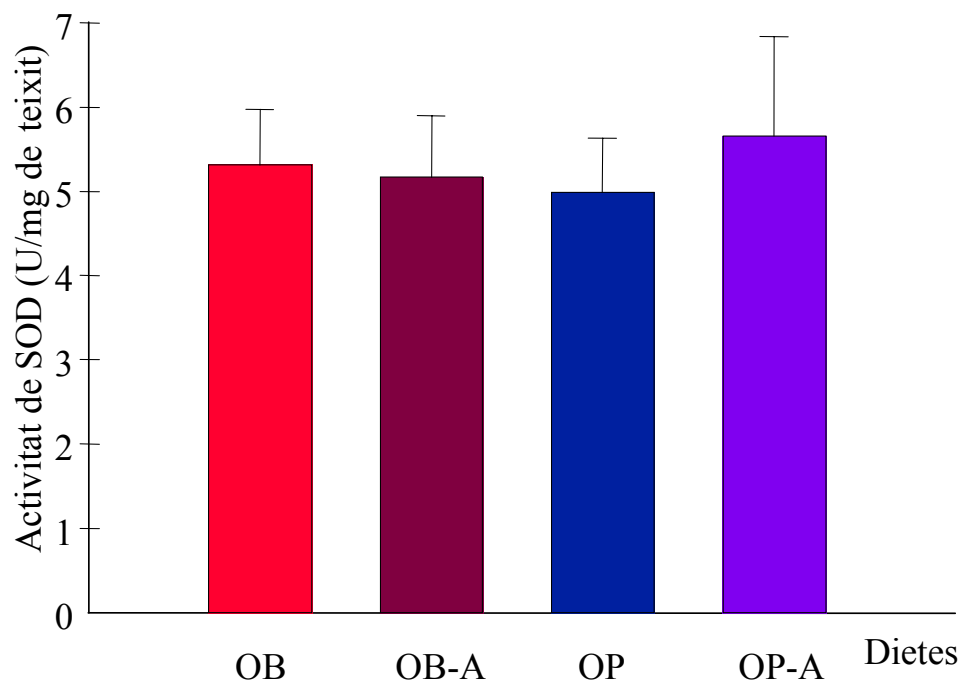


Figura 19. Activitat superòxid dismutasa (SOD) en segments aòrtics de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o d'oli de peix (OP) o, a més, amb L-arginina (OB-A i OP-A). Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; $n = 6$ rates. No hi hagué diferències estadístiques entre els grups alimentaris.

RESULTATS

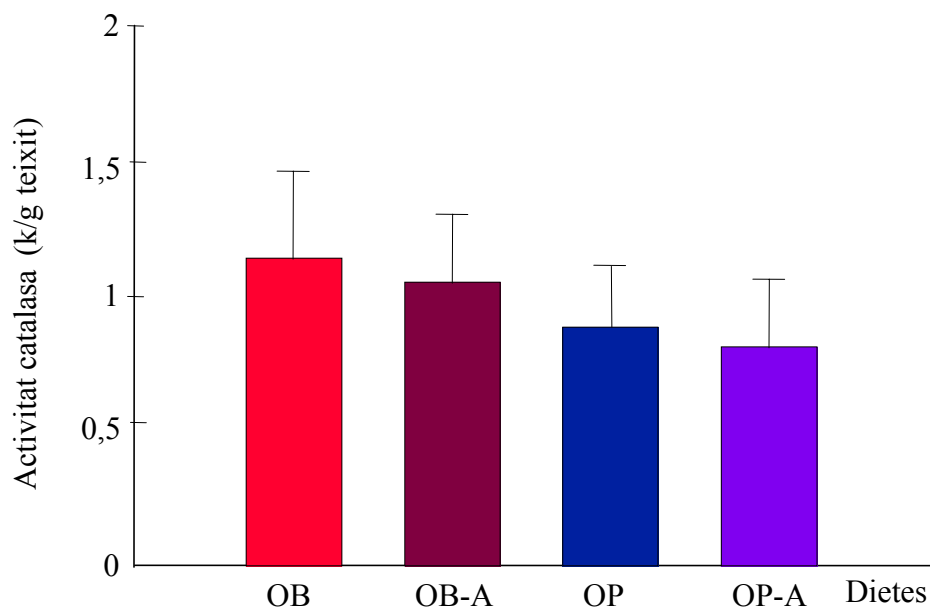


Figura 20. Activitat catalasa en segments aòrtics de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP) o, a més, amb L-arginina (OB-A i OP-A). Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; n = 6 rates. No hi hagué diferències estadístiques entre els grups alimentaris.

2.8. Nivells d' α -tocoferol en aorta

El nivell d' α -tocoferol en aorta augmentava un 70% amb l'administració de la dieta rica en OP. L'addició de L-arginina a les dietes no modificava els nivells d' α -tocoferol en cap dels grups de rates (Figura 21).

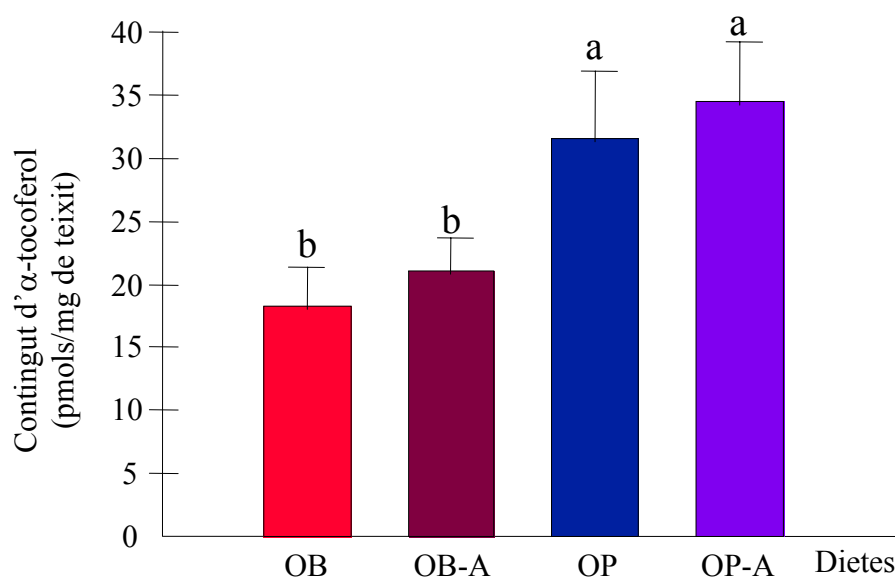


Figura 21. Contingut d' α -tocoferol en homogenats d'aorta de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP) o, a més, amb L-arginina (OB-A i OP-A). Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; n = 7 rates. Les diferències entre grups alimentaris s'indiquen amb lletres diferents.

3. Lipoproteïnes

3.1. Nivells plasmàtics de lipoproteïnes

La valoració de la quantitat de proteïnes de la fracció de VLDL+LDL, aïllada segons l'apartat 3.1 de Materials i mètodes, mostrà que no hi havia diferències significatives entre els diferents grups alimentaris, ni pel que feia al tipus d'oli ni a la suplementació amb L-arginina (Figura 22).

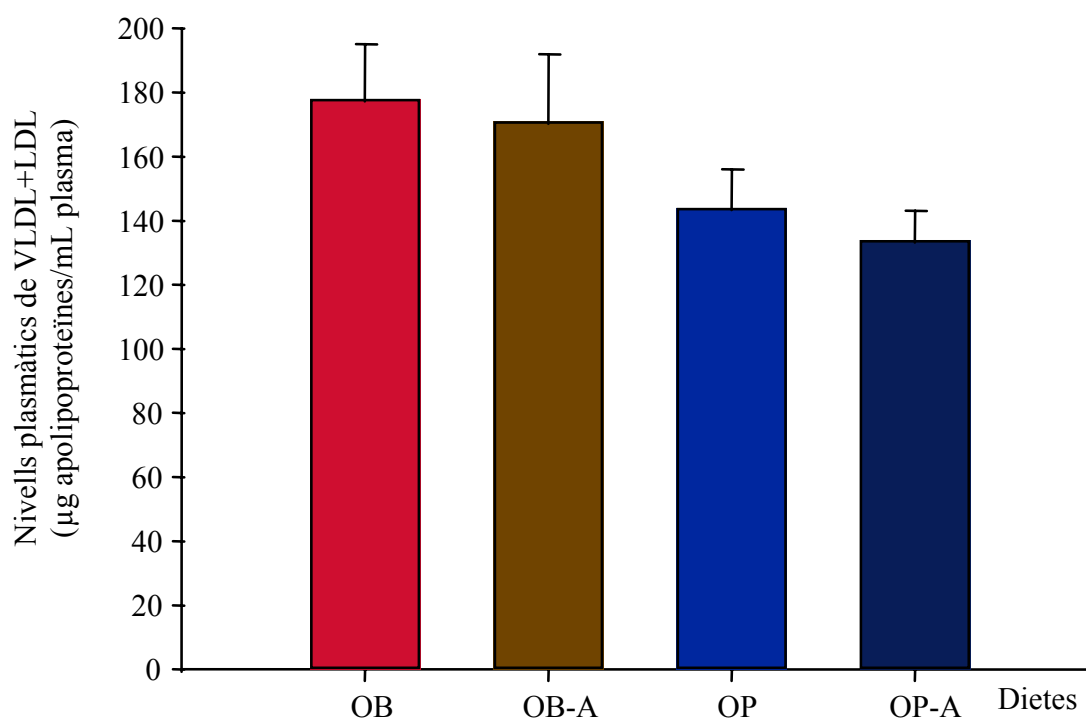


Figura 22. Nivells plasmàtics de VLDL+LDL de rates suplementades amb oli de blat de moro (OB) o oli de peix (OP) o, a més, amb L-arginina (OB-A i OP-A). Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; n = 7 rates. No hi hagué diferències significatives entre els diferents grups de rates.

3.2. Mobilitat electroforètica de les lipoproteïnes

3.2.1. Mobilitat electroforètica de lipoproteïnes intactes

La separació de les lipoproteïnes plasmàtiques per electroforesi no va mostrar cap diferència en la seva migració.

3.2.2. Mobilitat electroforètica d'apolipoproteïnes de VLDL+LDL

El tractament de lipoproteïnes d'una rata amb una solució que contenia 62,5 $\mu\text{mol/L}$ de CuCl_2 durant 24 hores induïa un augment de la velocitat de migració de l'apolipoproteïna B (Figura 23).

Les lipoproteïnes dels dos grups de dieta no mostraren cap diferència en la mobilitat electroforètica de les apolipoproteïnes (Figura 23).



Figura 23. Imatge d'un gel d'electroforesi, tenyit amb blau de Coomassie. Les bandes es corresponen a les diferents apolipoproteïnes. Els canals 8 i 9 es corresponen a estàndars d'ApoB i d'Apo C-III, respectivament, i els canals 2, 4 i 6 es corresponen a apolipoproteïnes nadiues de les rates suplementades amb OB i els canals 3, 5 i 7 es corresponen a rates suplementades amb OP. En els canals 1 i 10 s'hi troben apolipoproteïnes completament oxidades.

3.3. Susceptibilitat de les lipoproteïnes a l'oxidació per CuCl₂

Les lipoproteïnes aïllades per ultracentrifugació dels dos grups alimentaris mostraven un patró diferenciat de formació de diens conjugats quan se les exposava a 1,25 µmol/L de CuCl₂ durant 5 hores (Taula 16). El temps de latència s'escurçava significativament per les lipoproteïnes de rates suplementades amb OP (89,4 ± 3,8 i 60,2 ± 4,9 minuts per OB i OP, respectivament). La velocitat d'oxidació de les lipoproteïnes era superior en les rates suplementades amb OP (152 ± 12 i 289 ± 10 nmol/L/minut per OP i OB respectivament), i similarment fou també superior la concentració final de diens conjugats (27,0 ± 1,1 i 19,8 ± 0,7 nmol/L, per OP i OB, respectivament).

Taula 16. Susceptibilitat de les lipoproteïnes a l'oxidació per Cu²⁺

	OB	OP
Temps de latència (minuts)	89,4 ± 3,8	60,2 ± 4,9***
Velocitat d'oxidació (nmol/L/minut)	289 ± 10	152 ± 12***
Oxidació màxima (nmol/L)	27,0 ± 1,1	19,8 ± 0,7***

Els valors s'expressen com a mitjanes ± EE (n = 7). ***P < 0,001 indica diferències significatives del grup OP respecte el grup OB.

3.4. Capacitat antioxidant de les lipoproteïnes

3.4.1. Contingut d'α-tocoferol en lipoproteïnes

Hi hagué una disminució del 22% en el contingut d'α-tocoferol en lipoproteïnes de rates suplementades amb OP en relació a rates suplementades amb OB (Taula 17).

Taula 17. Contingut d' α -tocoferol de les VLDL+LDL

	OB	OP
α -tocoferol (pmol/ μ g proteïna)	12,67 \pm 0,34	9,84 \pm 0,89*

Les dades s'expressen com a mitjana \pm EE; n = 6-7 rates. * $P < 0,05$ indica diferència significativa d'OP respecte OB.

3.4.2. Capacitat antioxidant total de les lipoproteïnes

La capacitat antioxidant total de les lipoproteïnes, mesurada per la capacitat d'evitar l'oxidació induïda per ABTS⁺, no es veié afectada pel tipus de dieta (Taula 18).

Taula 18. Capacitat antioxidant total de les VLDL+LDL

	OB	OP
Capacitat antioxidant total (mmol/L)	0,32 \pm 0,02	0,27 \pm 0,01

No hi hagué diferències estadístiques entre els dos grups alimentaris.

3.5. Composició en àcids grassos de les lipoproteïnes

A la Taula 19 es mostra la composició en àcids grassos de les lipoproteïnes VLDL+LDL, i els índexs que en resulten. Les diferències més destacades es troben en els àcids grassos poliinsaturats ω -6 i ω -3, que predominen, respectivament, en les lipoproteïnes procedents del grup OP i del grup OB.

Taula 19. Composició d'àcids grassos de les lipoproteïnes VLDL+LDL en % (mol/mol)

	OB	OB-A	OP	OP-A
C12:0	0,05 ± 0,02 (a)	0,11 ± 0,03 (a)	0,11 ± 0,04 (a)	0,01 ± 0,01 (a)
C14:0	0,52 ± 0,04 (a)	0,60 ± 0,07 (a)	0,99 ± 0,10 (a)	0,91 ± 0,10 (a)
C14:1 ω 5	0,03 ± 0,03 (a)	0,02 ± 0,01 (a)	0,11 ± 0,05 (a)	0,05 ± 0,02 (a)
C15:0	0,30 ± 0,03 (a)	0,32 ± 0,03 (a)	0,44 ± 0,05 (a)	0,42 ± 0,05 (a)
C16:0	19,48 ± 1,25 (a)	19,27 ± 0,96 (a)	24,56 ± 2,75 (a)	24,19 ± 2,22 (a)
C16:1 ω 7	1,35 ± 0,24 (b)	1,18 ± 0,12 (b)	6,88 ± 0,80 (a)	6,57 ± 0,71 (a)
C17:0	0,95 ± 0,08 (a)	1,06 ± 0,16 (a)	1,71 ± 0,13 (a)	1,51 ± 0,09 (a)
C17:1 ω 5	0,11 ± 0,06 (a)	0,09 ± 0,03 (a)	0,05 ± 0,02 (a)	0,03 ± 0,01 (a)
C18:0	7,63 ± 0,65 (a)	8,69 ± 0,71 (a)	9,34 ± 0,88 (a)	9,51 ± 0,89 (a)
C18:1 ω 9 <i>trans</i>	0,11 ± 0,03 (a)	0,04 ± 0,01 (a)	0,08 ± 0,03 (a)	0,03 ± 0,02 (a)
C18:1 ω 9 <i>cis</i>	13,42 ± 1,10 (a)	1,60 ± 1,76 (a)	18,09 ± 2,53 (a)	18,19 ± 1,77 (a)
C18:1 ω 7	2,23 ± 0,27 (a)	2,05 ± 0,16 (a)	2,55 ± 0,09 (a)	2,60 ± 0,30 (a)
C18:2 ω 6	25,86 ± 1,51 (a)	25,29 ± 1,91 (a)	2,21 ± 0,04 (b)	3,31 ± 0,47 (b)
C18:3 ω 6	0,64 ± 0,07 (a)	0,55 ± 0,04 (a)	0,25 ± 0,02 (b)	0,27 ± 0,03 (b)
C20:0	0,13 ± 0,02 (a)	0,15 ± 0,01 (a)	0,16 ± 0,01 (a)	0,17 ± 0,03 (a)
C18:3 ω -3	0,25 ± 0,02 (b)	0,27 ± 0,02 (b)	0,53 ± 0,06 (ab)	0,50 ± 0,05 (a)
C20:1 ω -9	0,13 ± 0,02 (a)	0,12 ± 0,01 (a)	0,14 ± 0,02 (a)	0,14 ± 0,02 (a)
C20:2 ω -6	0,27 ± 0,04 (a)	0,25 ± 0,02 (a)	0,09 ± 0,01 (a)	0,10 ± 0,02 (a)
C20:3 ω -9	0,57 ± 0,05 (ab)	0,56 ± 0,03 (a)	0,85 ± 0,08 (b)	0,87 ± 0,07 (ab)
C20:3 ω -6	0,27 ± 0,04 (a)	0,25 ± 0,02 (a)	0,09 ± 0,01 (a)	0,10 ± 0,02 (a)
C22:0	0,24 ± 0,03 (a)	0,27 ± 0,03 (a)	0,26 ± 0,02 (a)	0,26 ± 0,03 (a)
C20:4 ω -6	20,67 ± 2,39 (a)	22,46 ± 2,08 (a)	6,32 ± 0,56 (b)	6,81 ± 0,71 (b)
C22:1 ω -9	0,03 ± 0,01 (ab)	0,06 ± 0,01 (a)	0,06 ± 0,01 (ab)	0,01 ± 0,01 (b)
C23:0	0,29 ± 0,04 (a)	0,31 ± 0,04 (a)	0,47 ± 0,04 (a)	0,50 ± 0,06 (a)
C20:5 ω -3	0,41 ± 0,09 (b)	0,39 ± 0,07 (b)	12,52 ± 1,51 (a)	12,11 ± 1,73 (a)

C24:0	0,61 ± 0,08 (a)	0,72 ± 0,09 (a)	0,63 ± 0,06 (a)	0,66 ± 0,09 (a)
C22:4 ω -6	0,86 ± 0,12 (a)	0,69 ± 0,06 (a)	0,31 ± 0,04 (b)	0,35 ± 0,06 (b)
C24:1 ω -9	0,33 ± 0,05 (a)	0,36 ± 0,05 (a)	0,60 ± 0,06 (a)	0,59 ± 0,09 (a)
C22:5 ω -6	0,81 ± 0,12 (a)	0,74 ± 0,05 (a)	0,18 ± 0,02 (b)	0,30 ± 0,15 (b)
C22:5 ω -3	0,31 ± 0,03 (b)	0,30 ± 0,02 (b)	2,20 ± 0,11 (a)	2,00 ± 0,20 (a)
C22:6 ω -3	1,15 ± 0,15 (b)	1,21 ± 0,12 (b)	7,12 ± 1,02 (a)	6,83 ± 0,71 (a)
AGS	30,19 ± 2,08 (a)	31,53 ± 1,66 (a)	38,66 ± 3,96 (a)	38,15 ± 3,46 (a)
AGMI	975 ± 168 (a)	872 ± 106 (a)	1175 ± 153 (a)	1388 ± 142 (a)
AGPI	2006 ± 216 (a)	1972 ± 206 (a)	1347 ± 149 (b)	1366 ± 192 (b)
AGPI ω -6	2969 ± 187 (a)	2837 ± 197 (a)	419 ± 36 (b)	592 ± 64 (b)
AGPI ω -3	211 ± 29 (b)	122 ± 10 (b)	920 ± 115 (a)	1055 ± 131 (a)
IP	133 ± 4 (b)	140 ± 4 (b)	179 ± 4 (a)	176 ± 4 (a)
IDE	175 ± 3 (a)	178 ± 3 (a)	182 ± 3 (a)	181 ± 3 (a)
IDE:AGS	5,8 ± 0,2 (a)	5,7 ± 0,2 (a)	4,7 ± 0,1 (b)	4,7 ± 0,1 (b)
AGS:AGPI	0,58 ± 0,01 (b)	0,60 ± 0,02 (b)	1,19 ± 0,03 (a)	1,15 ± 0,03 (a)

Els índexs de peroxidabilitat (IP), de dobles enllaços (IDE), d'insaturació (IDE:AGS) i de saturació es calcularen d'acord amb l'apartat 3.5 de Materials i mètodes. Els valors s'expressen com a mitjana ± EE; n = 7 rates. Les diferències entre grups alimentaris s'indiquen amb lletres diferents.

3.6. Difusió de \cdot NO a lipoproteïnes

La difusió de \cdot NO al nucli lipídic de les lipoproteïnes, mesurada per la constant de Stern-Volmer (K_{sv}) era similar en tots dos grups (Taula 20), tant en el cas de la fracció de VLDL+LDL (Taula 20) com de la fracció de LDL.

Taula 20. Capacitat de difusió de $\cdot\text{NO}$ a lipoproteïnes (VLDL+LDL)

	OB	OP
K_{sv} (mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)	$2,0 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,3$

Els valors s'expressen com a mitjana \pm EE; n = 7 rates. No hi hagué diferències significatives entre els grups alimentaris.

DISCUSSIÓ

RESULTATS

DISCUSSIÓ

Diferents estudis *in vivo* (Connor i Connor, 1997; Goodnight, 1993; Whitman et al., 1994) indiquen que l'OP o els AGPI ω -3 poden prevenir el desenvolupament de malalties coronàries. Les primeres evidències poblacionals d'aquest efecte preventiu s'obtingueren entre els inuit de Groenlàndia (Bang i Dyerberg, 1972), on hi ha un elevat consum de peix. Però cal no oblidar la importància del peix blau en la dieta mediterrània, que històricament solia constituir una de les principals fonts nutricionals no vegetals.

En aquest sentit, en un estudi epidemiològic recent (Ruiz de Gordo et al., 2002) s'observà com els individus que seguien una alimentació amb un contingut més elevat d'AGPI ω -6 presentaven una susceptibilitat a l'oxidació de les lipoproteïnes més gran (relacionat amb l'augment d'índex d'insaturació dels lípids plasmàtics), mentre que el resultat s'invertia en el cas dels AGPI ω -3 (tot i que aquests també augmentaven l'índex d'insaturació de les lipoproteïnes). L'oxidació de les lipoproteïnes és un dels aspectes que contribueixen a la iniciació i manteniment de la placa d'ateroma. Altres aspectes de l'aterosclerosi, relacionats amb la funció endotelial i amb la presència de cèl·lules inflamatòries (leucòcits polimorfonuclears i macròfags) en la paret vascular, són paral·lels als que actuen en la inflamació.

S'han proposat diversos mecanismes d'acció per explicar els efectes biològics dels AGPI ω -3 en el sistema cardiovascular (Connor i Connor, 1997; Moreno i Mitjavila, 2003). Sovint hom en destaca la davallada del colesterol i del triacilglicerol plasmàtics (Mensink i Katan, 1989) o els efectes antitrombòtics (Malle i Kostner, 1993). A més de tot això, un seguit d'observacions indiquen que la manipulació de la dieta amb AGPI ω -3 augmenta la relaxació dependent d'endoteli, tant en artèries coronàries (Shimokawa i Vanhoutte, 1989; Tagawa et al., 1999) com cerebrals (Kim et al., 1992). En aquest estudi (Lopez et al., 2001) també observàrem que la vasorelaxació mediada per \cdot NO en

DISCUSSIÓ

aortes de rates suplementades amb OP era més gran que en les rates suplementades amb OB.

Així doncs la relaxació vascular és també una de les dianes d'acció potencials dels AGPI ω -3 en la protecció front malalties cardiovasculars. El to vascular és subjecte d'un control complex on hi participen, entre d'altres, radicals lliures i productes de la via de la ciclooxigenasa (Katusic i Vanhoutte, 1989; Palmer et al., 1998; Pearson et al., 1983; Vane et al., 1990), generats per diferents tipus cel·lulars i diferents sistemes enzimàtics presents en la paret vascular. D'una banda, hi ha una producció basal de $\cdot\text{NO}$ que exerceix una acció dilatadora tònica que juga un important paper en el control local de la circulació (Knowles i Moncada, 1994) i en altres processos fisiològics, com la modulació de l'activitat plaquetària. La producció basal de $\cdot\text{NO}$ és, a més, estimulada per substàncies vasoactives, com ara l'acetilcolina i la bradiginina (Furchgott i Zawadzki, 1980; Chaigneau et al., 1999; Vanhoutte, 1999), i per també per fenòmens mecànics, com per exemple, l'augment de la tensió vascular.

En el present treball, l'anàlisi de la relaxació induïda per acetilcolina, mitjançant l'ús d'inhibidors de la NOS i de la ciclooxigenasa demostrava que les diferències entre els dos grups eren mediades pel $\cdot\text{NO}$, ja que en rates suplementades amb OP, la relaxació mediada per $\cdot\text{NO}$ augmentava un 58%, mentre que en la fracció de la relaxació mediada per prostanoids no s'hi observaven diferències estadísticament significatives. Tot i que la manipulació de la dieta tingués efectes en la composició lipídica de les membranes cel·lulars del vas i, de retruc, en el perfil dels eicosanoids, l'oposició de l'acció vasodilatadora i de l'acció vasoconstrictora d'uns i d'altres (com ara la $\text{PGI}_2/\text{PGI}_3$ o el $\text{TXA}_2/\text{TXA}_3$, respectivament) podia ser la responsable que, finalment, no s'observessin diferències en la relaxació induïda per acetilcolina i mediada per derivats de la ciclooxigenasa.

En el manteniment del to vascular hi intervenen molècules amb accions contraposades. Així hi ha agents vasorelaxants, com el $\cdot\text{NO}$ i la PGI_2 (Pearson et al., 1983), i agents vasoconstrictors com l'endotelina-1, el TXA_2 (Vane et al., 1990) o el $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Figura 24). Cal recordar que la generació d'aquesta espècie química és una de les principals limitadores de la biodisponibilitat del $\cdot\text{NO}$, ja que reacciona amb ell per

formar ONOO⁻, que tot i que també té una certa activitat vasorelaxant, és un potent agent oxidant i de vida mitjana molt curta. En definitiva, qualsevol alteració en la producció de O₂⁻ (activació de cèl·lules inflamatòries, de la xantina oxidasa del teixit vascular, desacoblament de la NOS) o en l'activitat de la SOD, poden provocar canvis en les accions del ·NO (Mügge et al., 1991). Una de les fonts de O₂⁻ en la paret vascular és la NAD(P)H oxidasa (Mohazzab et al., 1994; Pagano et al., 1995; Wei et al., 1985), enzim que es troba a la membrana dels leucòcits, i que és modulada pel metabolisme de l'AA (Cherny et al., 2001). La producció de O₂⁻ per vasos que hem trobat en el nostre estudi s'adiu amb les observacions de Pagano et al. (1995), que van descriure un augment del seu alliberament quan s'exposaven els vasos a NADPH exògena (substrat limitant de la NADPH oxidasa). L'augment de la producció de O₂⁻ que resulta de l'addició al medi d'un inhibidor de la NOS ens pot servir per estimar l'alliberament de ·NO. El fet que l'OP de la dieta provoqués un desajust entre la producció de O₂⁻ i de ·NO (amb estimulació del ·NO sense alteració del O₂⁻) pot afavorir una tendència a la disminució del to vascular. D'altra banda, ni les activitats de la SOD ni de la catalasa presentaven variacions en les aortes degudes a la suplementació amb OP, i això corroboraria que la dieta rica en OP no genera un estrès oxidatiu més gran en els vasos que una dieta rica en OB (tot i la tendència més gran a la peroxidació). Contràriament, un augment de la producció de O₂⁻ i, en conseqüència una reducció de la vasodilatació dependent de ·NO, és un dels mecanismes de disfunció endotelial que participen en situacions patològiques com la hipertensió (Harrison, 1997). Un exemple de la interacció entre O₂⁻ i ·NO, l'il·lustra el fet que l'acció de la ceramida com a inhibidora de la via del ·NO-GMPc vascular és mediada, fonamentalment, per l'estimulació que produeix en la producció intracel·lular de O₂⁻ (Zieman et al., 2001).

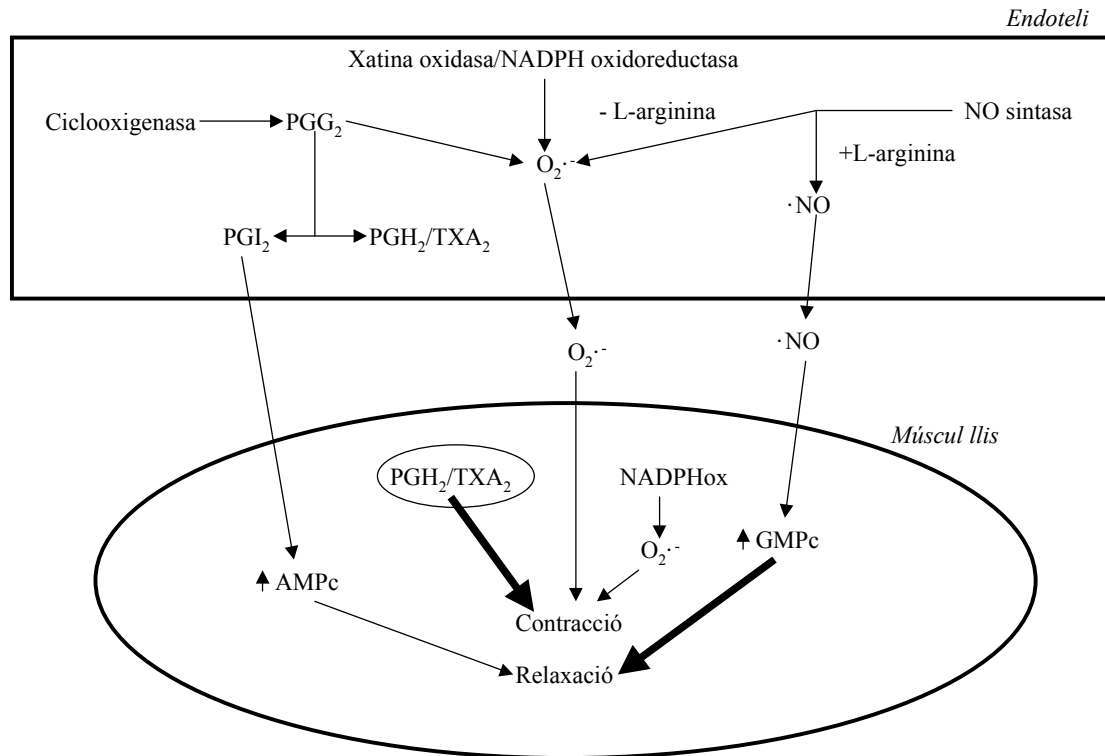


Figura 24. Regulació del to vascular per diversos mediadors.

El caràcter efímer del $\cdot\text{NO}$ i del $\text{O}_2^{\cdot-}$, que assoleixen petites concentracions en el teixit vascular (submicromolar), dins l'equilibri que hi ha entre les diverses fonts enzimàtiques i no-enzimàtiques, i els mecanismes d'eliminació (inclosa la reacció entre ells, que genera ONOO^-) fa complicada la tria dels mètodes de mesura (Tarpey i Fridovich, 2001). En el cas del $\cdot\text{NO}$ s'escollí la ressonància de spin electrònic. La petita producció de $\cdot\text{NO}$ era més difícil de detectar per altres tècniques, com ara l'oxidació de l'hemoglobina o la reacció de Griess (que permet de valorar els nitrits, com a producte final i acumulable de $\cdot\text{NO}$), les quals, a més, exigien treballar en homogenats de teixit. La generació de $\text{O}_2^{\cdot-}$ fou analitzada per la quimioluminiscència de la lucigenina, ja que permetia mesurar-la en unes condicions d'integritat del teixit aòrtic, a diferència d'altres tècniques com la reducció del ferricitocrom c o la interferència en l'activitat aconitasa.

L'alliberament de $\cdot\text{NO}$ en condicions basals, o induïda per agonistes, es pot estimar indirectament en bany d'òrgans a través de l'efecte de l'addició de SOD exògena (Abrahamsson et al., 1992; Mian i Martin, 1995). En el nostre treball, l'acció de la SOD

exògena en la vasoreactivitat vascular indica que l'efecte vasoconstrictor del $O_2^{\cdot-}$ consisteix bàsicament en la reducció de la biodisponibilitat de $\cdot NO$ (Katusic i Vanhoutte, 1989), ja que no s'observa cap efecte de la SOD en anells desprovistos d'endoteli, on no hi ha producció de $\cdot NO$. En el cas dels anells amb l'endoteli intacte, l'ús de la SOD exògena ens permetia, a més, d'aconseguir respostes òptimes mediades per $\cdot NO$ i poder estimar més acuradament l'acció vascular d'aquest. La potenciació que el L-NNA realitza en la contracció induïda per fenilefrina és un indicador de la síntesi basal de $\cdot NO$. Precisament, aquesta potenciació era més gran en les rates suplementades amb OP que no en les rates suplementades amb OB.

L'augment de les relaxacions dependents de $\cdot NO$ no necessàriament ha de ser el resultat d'una major síntesi de $\cdot NO$, sinó que també es podria deure a una major sensibilitat del vas al $\cdot NO$, com ara per un augment de l'expressió de la GCs. No sembla, però, que sigui el cas en el nostre estudi, ja que no hi hagué variacions entre els dos grups alimentaris en la resposta de l'aorta al nitroprussiat sòdic. Així l'augment de la relaxació induïda per acetilcolina en anells d'aorta procedents de rates alimentades amb la dieta rica en OP no era degut a que s'incrementés la susceptibilitat de la musculatura arterial a l'acció vasodilatadora del $\cdot NO$. Com hem vist, tampoc no era deguda a un allargament de la vida mitjana del $\cdot NO$ com a conseqüència d'una disminució de $O_2^{\cdot-}$, i més aviat seria la darrera conseqüència d'un augment de l'expressió del ARNm de la eNOS, com vam poder comprovar i s'explica més endavant.

Tot i que les valoracions indirectes esmentades indicaven una modulació de la producció de $\cdot NO$ i de $O_2^{\cdot-}$ a nivell de la paret aòrtica per l'OP, vam realitzar un estudi amb tècniques més directes. Així la mesura de la producció basal de $\cdot NO$ per r.s.e. en les aortes de rates alimentades amb OP indicava un augment en la biodisponibilitat de $\cdot NO$ (90%) que comportava també un augment del contingut de GMPc aòrtic (100%), i una disminució de la relació de L-arginina/L-citrul·lina lliures, els aminoàcids que són, respectivament, substrat i producte de la síntesi de $\cdot NO$ catalitzada per la NOS. Aquests canvis es relacionen amb augments en l'ARNm de eNOS (31%) i en la proteïna (72%) i són deguts, doncs, al reforçament de l'expressió de la eNOS i no tant a una estimulació de l'activitat de la NOS, ja que els canvis en l'activitat de la NOS i de la

DISCUSSIÓ

biodisponibilitat del ·NO eren abolits quan els resultats es referien a micrograms de proteïna eNOS, per comptes de miligrams de teixit total. L'augment en la biodisponibilitat de ·NO en segments aòrtics amb endoteli intacte, conjuntament amb la petita senyal de r.s.e. que mostraven els segments aòrtics amb l'endoteli denudat, indiquen que el ·NO generat en l'artèria aorta procedeix bàsicament de l'endoteli. Així, tot i que en el vas s'han caracteritzat, en diferents tipus cel·lulars (com ara les cèl·lules musculars llises de la túnica mitjana), una o més de les tres isoformes de NOS, (Boje i Fung, 1990; Marletta et al., 1988; Boulanger et al., 1998), l'endoteli seria doncs gairebé l'únic responsable de la síntesi de ·NO, en una situació on hi hagi desenvolupament de la placa d'ateroma.

En relació als grups suplementats amb L-arginina, tant amb dietes riques en OB com en OP, es registraren augments en la producció de ·NO (37% en el cas del grup OB-A respecte del grup OB, i 24% en el cas del grup OP-A respecte del grup OP) i de GMPc. És a dir, que un reforçament del substrate de la eNOS es tradueix en un augment addicional de la relaxació vascular en els dos grups, degut possiblement a que el nivells de L-arginina són limitants.

La incorporació d'AGPI ω -3 en els fosfolípids de les membranes cel·lulars (Rodríguez et al, 1996) pot afectar la NOS a través dels canvis que pateixen els eicosanoids: disminueix la síntesi dels eicosanoids de les sèries 2 i 4 (derivats dels AGPI ω -6), i augmenta la síntesi dels de les sèries 3 i 5. Amb tot, Fischer i Weber (1984) observaren que la PGI₃ mostrava uns efectes similars als de la seva homòloga PGI₂, si bé com a norma general les sèrie 3 i 5 tenen una activitat biològica inferior en ser menys afins pels receptors corresponents.

La regulació de l'activitat de la eNOS es realitza per mecanismes diversos (Flemming i Busse, 2003). D'una banda és un enzim dependent de Ca²⁺, i necessita que s'hi uneixi la Ca-CaM. Aquesta unió s'inhibeix quan el lloc corresponent de la eNOS l'ocupen altres proteïnes, com la caveolina-1. La eNOS també pot regular la seva activitat mitjançant la fosforilació de determinats residus (Ser1177, Thr495), per cinases com la PKC. A banda del control de l'activitat, també es pot modular l'expressió a diferents nivells. Així, per exemple, en rates s'ha observat un augment de la via de

senyalització eNOS-GMPc en el cor amb l'edat (Zieman et al., 2001), que es basa en un augment de la quantitat de proteïna eNOS. Li et al. (1998) demostraren que l'activació de les isoformes PKC α i PKC ϵ augmenta la transcripció del gen humà eNOS. En aquest treball no hem valorat l'activitat de la PKC ja que treballem amb vas sencer, però seria probable que aquest enzim estigués implicat en l'augment d'expressió de la eNOS per la dieta rica en OP.

La dislipidèmia afecta la funció endotelial de diverses formes (Lind, 2002): hi ha un augment de la síntesi de O₂⁻ i d'endotelina-1, i l'activitat eNOS es veu disminuïda; tot plegat condueix a una elevació del to vascular. Les LDL oxidades, en prendre colesterol de les caveoles, provoquen la dissociació de la caveolina i de la eNOS que es troba unida a aquesta, de forma que l'activitat NOS i la biodisponibilitat del ·NO s'hi veuen afectades negativament (Blair et al., 1999). A més, la hipercolesterolèmia també produeix un augment de caveolina, que té un efecte inhibidor de la eNOS (Feron et al., 1999) en interferir la unió d'aquesta amb la Ca-CaM. Similarment, les LDL no oxidades, quan s'acumulen en l'espai subendotelial, afecten la funció de l'endoteli: la caveolina-1 desplaça l'Hsp90 del lloc d'unió a la CaM de la eNOS i això afavoreix el desacoblament de la NOS, i que aquest enzim produeixi O₂⁻ (Pritchard et al., 2002). Els estudis del domini caveolar i de la interacció entre la eNOS i la caveolina se solen fer en cèl·lules endotelials en cultiu o en artèries prou grans com per aïllar un nombre suficient de cèl·lules endotelials, per això se'ns feu difícil estudiar aquest aspecte en el nostre estudi.

L'oxidació de les LDL és un dels primers esdeveniments del desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques. La producció relativa de ·NO i O₂⁻ es crítica per determinar el resultat de l'oxidació biològica (Rodenas et al., 1998). És, doncs, improbable que en unes condicions d'augment del ·NO sense modificació de O₂⁻ (mesurat indirectament en bany d'òrgans i, directament, per luminometria), la producció de ONOO⁻ en el teixit vascular pugui contrarestar els efectes del ·NO. En aquest cas, els nivells de ONOO⁻ no s'alterarien i restaria més ·NO lliure (Liochev i Fridovich, 2002).

També cal tenir en compte les alteracions que la suplementació d'OP pugui provocar en el perfil lipídic de les lipoproteïnes i, en conseqüència, en la seva tendència a

DISCUSSIÓ

l'oxidació. La lipoperoxidació mediada per Cu^{2+} és una de les tècniques que s'empren en l'estimació d'aquesta susceptibilitat a l'oxidació de les lipoproteïnes (Cominacini et al., 1991; Jialal et al., 1991). A diferència d'altres agents (com l'ABTS^{•+}), el Cu^{2+} hi actua de forma específica, en unir-se a la superfície de les LDL, i no externament per la generació de $\cdot\text{OH}$ o altres espècies reactives. Tot i que una sèrie d'estudis indiquen que els greixos insaturats tenen efectes potencialment beneficiosos en la lipidèmia (Mensink i Katan, 1992; Mattson i Grundy, 1985), cal no oblidar que la susceptibilitat a l'atac oxidatiu es relaciona directament amb el grau d'insaturació, que en el cas d'OP és més gran pel que fa a la quantitat d'àcids grassos amb més de tres dobles enllaços.

Les lipoproteïnes de les rates suplementades amb OP, exposades a Cu^{2+} , eren més resistents a la progressió de l'oxidació, tot i que el temps de latència es reduïa en relació a les lipoproteïnes de rates suplementades amb OB. Aquest escurçament de la fase de latència de l'oxidació pot deure's a la producció de ONOO^- , agent extremadament prooxidant (Darley-Usmar et al., 1992), a la incorporació d'AGPI ω -3 a les LDL (Mazière et al., 1998; Nardini et al., 1995; Whitman et al., 1994), o a la reducció de nivells antioxidants liposolubles com ara l' α -tocoferol (Esterbauer et al., 1990). Ens decantem en el nostre cas per a això darrer ja que dels resultats sobre producció de O_2^- i de $\cdot\text{NO}$ deduïm una reducció en la generació de ONOO^- i, d'altra banda, el contingut de vitamina E en lipoproteïnes de rates suplementades amb OP disminueix lleugerament (22%), com també han observat altres investigadors (Higdon et al., 2001; Higgins et al., 2001).

Els nostres resultats, com els d'altres estudis, (Suzukawa et al., 1995; Wander et al., 1996; Higdon et al., 2001; Hau et al., 1996; Wander et al., 1998) assenyalen, doncs, que els AGPI ω -3 produeixen una modificació en la susceptibilitat a l'oxidació de les lipoproteïnes: s'escurça la fase inicial de latència i disminueix la taxa de propagació de la fase posterior. Per explicar aquestes dues observacions, aparentment contraposades, s'ha remarcat (Brude et al., 1997) que els AGPI ω -3 adopten una conformació espacial que fa que les seves insaturacions s'exposin molt menys a l'atac de radicals, la qual cosa desacceleraria la taxa de propagació, un cop encetat el procés. També s'ha recordat que els radicals lipídics derivats d'AGPI ω -3 són més polars i difonen menys cap al nucli lipídic (Frankel, 1998). El temps de latència, al seu torn, es relaciona estretament

amb el nivell d'antioxidants i, més especialment, amb el nivell d' α -tocoferol (Esterbauer et al., 1989). Tot i que la dieta rica en OP produïa una davallada en els nivells d' α -tocoferol en les lipoproteïnes, els nivells en aorta pujaven.

La causa de les diferències en el temps de latència de les lipoproteïnes cal cercar-la principalment en la composició d'àcids grassos d'aquestes. La composició de les lipoproteïnes, en línies generals, reflectia força la dels olis que suplementaven les dietes experimentals. És a dir, que les rates suplementades amb OP mostraven un contingut molt més gran d'AGPI ω -3, i inferior d'AGPI ω -6. Globalment, això produïa que el nombre de dobles enllaços fos pràcticament igual. No obstant, com que els AGPI ω -3 presenten un grau d'insaturació més gran, les lipoproteïnes del grup OP tenien un índex de peroxidabilitat teòric d'un 35% superior al grup OB.

La suplementació amb L-arginina de les dietes reforçava, com ja hem assenyalat, la via de senyalització del $\cdot\text{NO}$ -GMPc però no tenia efectes estadísticament significatius ni en els nivells d' α -tocoferol de l'aorta, ni en els paràmetres de susceptibilitat a l'oxidació de les lipoproteïnes.

El $\cdot\text{NO}$ és un potent antioxidant, ja que, pel seu coeficient de partició (que indica una lipofilia relativa), reacciona fàcilment amb radicals lipoperoxil i alcoxil, de forma que actua com a finalitzador de les reaccions en cadena de la lipoperoxidació (Rubbo et al., 2000). S'ha observat que el $\cdot\text{NO}$ és un fort inhibidor de l'oxidació de les LDL in vitro induïdes per Cu^{2+} o per agents del grup azo (Hogg i Kalyanaraman, 1998), i també de l'oxidació generada per cultius de cèl·lules endotelials (Malo-Ranta et al., 1994). A banda de l'actuació del $\cdot\text{NO}$ com agent interruptor de la reacció en cadena de la lipoperoxidació, també pot jugar un paper antioxidant per la inhibició de la lipoxigenasa (Rubbo et al., 1995). S'ha proposat que la reacció de finalització catalitzada pel NO implica la participació de dues molècules, de les quals la primera reacciona amb un radical lipoperoxil, i la segona amb el radical alcoxil que resulta de la primera reacció (O'Donnell et al., 1997). Aquesta actuació com a agent finalitzador seria un mecanisme plausible per explicar la seva actuació com a factor antiaterogènic (Matthys i Bult, 1997) in vivo, però és de difícil demostració ex vivo. Així, durant l'estudi de la susceptibilitat de les lipoproteïnes a l'oxidació no és possible simular en el nostre cas

les condicions que es donen in vivo, i per tant l'efecte del $\cdot\text{NO}$ addicional del grup d'OP o l'observat amb la suplementació de L-arginina no s'hi considera directament (però si a través de les alteracions en els lípids i en la capacitat antioxidant de les lipoproteïnes).

L'augment en la producció de $\cdot\text{NO}$ degut a l'OP de la dieta pot explicar tant el seu efecte preventiu front el desenvolupament de la malaltia cardiovascular (Goodnight, 1993) com la millora de les funcions endotelials en subjectes hipercolesterolèmics (Zhu i Parmley, 1990). Aquest augment en $\cdot\text{NO}$ pot comportar diferents fenòmens en plaquetes i en vasos, però en remarcarem únicament dos. Primer, que hem observat que l'OP augmenta la relaxació de vasos sanguinis, ja per relaxacions induïdes per acetilcolina (Lopez et al., 2001) o mitjançant l'augment de la producció basal de $\cdot\text{NO}$. En segon lloc, el $\cdot\text{NO}$ també pot actuar com un potent antioxidant en la interrupció de la reacció en cadena de la lipoperoxidació de les lipoproteïnes (Rubbo et al., 1995) i per tant interferir en l'aterogènesi (Matthys i Bult, 1997). La propietat antioxidant del $\cdot\text{NO}$ sols es pot manifestar quan no predominen les reaccions prooxidatives, ja que el ONOO^- que es genera en la reacció del $\cdot\text{NO}$ amb el $\text{O}_2^{\cdot-}$ és una espècie més reactiva, que interfereix en la vasorelaxació (Denicola et al., 2002) i que afavoreix l'oxidació de les LDL (O'Donnell i Freeman, 2001).

Un estudi que també comparava l'efecte d'una dieta rica en OP en un model inflamatori de rata, assenyalava que la dieta produïa una disminució de la producció de $\text{O}_2^{\cdot-}$ i no modificava la de $\cdot\text{NO}$ (Carbonell et al.) en leucòcits polimorfonuclears. Tot i que el resultat és diferent del nostre (augment de $\cdot\text{NO}$ i manteniment dels nivells de $\text{O}_2^{\cdot-}$; comprensible si es té present que actuen diferents enzims en els dos sistemes), també se'n dedueix un mecanisme de protecció de l'OP a través de la modulació de la producció de radicals lliures. Tammateix, en altres cèl·lules, com macròfags, l'OP estimula la producció de $\text{O}_2^{\cdot-}$ sense afectar la del $\cdot\text{NO}$ (Moreno et al., 2001), i en conseqüència en aquesta situació no augmentaria la producció de ONOO^- . L'acció que el OP produeix en les cèl·lules inflamatòries també cal considerar-la en la fisiologia vascular pel paper que aquestes cèl·lules tenen en la generació de la placa d'ateroma com a font de radicals lliures.

Els estudis realitzats *ex vivo* constitueixen una prova més convincent que els estudis que empraven cèl·lules endotelials en cultiu (Boulanger et al., 1990) ja que els estímuls químics i mecànics de la vasculatura sistèmica, que també modulen l'expressió de proteïna eNOS, són absents en els sistemes de cultiu. No obstant, caldria comprovar si els efectes beneficiosos de l'OP a nivell vascular observats en aquest treball en animals sans es manifesten també en animals amb una predisposició a l'aterosclerosi, o en animals que presenten el procés ja en curs. L'aterosclerosi comporta un augment de la producció de O_2^- i una disminució de $\cdot NO$ (Ohara et al, 1993; White et al., 1994). Pot resultar interessant fer un estudi amb ratolins deficients en apolipoproteïna E (i, en conseqüència en HDL) per confirmar o refusar el paper de mecanismes que expliquin l'efecte beneficiós de l'oli de peix en la prevenció i tractament de l'aterosclerosi.

DISCUSSION

CONCLUSIONS

DISCUSSION

CONCLUSIONS

La suplementació d'oli de peix en la dieta de rates mascle Sprague-Dawley, en relació amb una dieta suplementada amb oli de blat de moro produïa:

- 1.- No modificava la vasoconstricció induïda per fenilefrina, però potenciava la vasodilatació induïda per acetilcolina en bany d'òrgans i que no era deguda a una resposta facilitadora de la musculatura llisa vascular.
- 2.- L'increment de la vasorelaxació era mediat per $\cdot\text{NO}$ i no per eicosanoids.
- 3.- Tota la via del $\cdot\text{NO}$ -GMPC es troba implicada en aquest increment, que té com a punt clau una quantitat superior d'ARNm i de proteïna d'eNOS.
- 4.- Els àcids grassos de la dieta s'incorporen a les lipoproteïnes. Tot i que el temps de latència en l'estudi de susceptibilitat a l'oxidació ex vivo es redueix, la velocitat de propagació de l'oxidació de les lipoproteïnes i el nivell màxim de diens conjugats minva.
- 5.- La difusió del $\cdot\text{NO}$ en el nucli lipídic de les lipoproteïnes no es modifica i podria estar involucrat en un paper protector del $\cdot\text{NO}$ en les lipoproteïnes.
- 6.- La vasorelaxació i la menor susceptibilitat de les lipoproteïnes a l'oxidació i la difusió del NO en aquestes contribueixen a explicar el paper protector de l'oli de peix en la prevenció de l'aterosclerosi.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

The diet and all-causes death rate in the Seven Countries Study. *Lancet* 2 (8237): 58-61, 1981.

Abrahamsson T, Brandt U, Marklund SL, Sjöqvist PO. Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ Res* 70: 264-271, 1992.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126, 1984.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles, RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615, 2001.

Armitage J, Collins R. Need for large scale randomised evidence about lowering LDL cholesterol in people with diabetes mellitus: MRC/BHF Heart Protection Study and other major trials. *Heart* 84: 357-360, 2000.

Bang HO, Dyerberg J. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic West-Coast Eskimos. *Acta Med Scand* 192: 55-94, 1972.

Bergeron N, Havel RJ. Assessment of postprandial lipemia: nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 8: 43-52, 1997.

Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL. Simultaneous determination of alpha-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* 32: 2143-2149, 1979.

Blair A, Shaul PW, Yuhamina IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolar and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 274: 32512-32519, 1999.

Boje KM, Fung HL. Endothelial nitric oxide generating enzyme(s) in the bovine aorta: subcellular location and metabolic characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 20-26, 1990.

Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res* 83: 1271-1278, 1998.

Boulanger C, Schini VB, Hendrickson H, Vanhoutte PM. Chronic exposure of cultured endothelial cells to eicosapentanoic acid potentiates the release of endothelium-derived relaxing factor(s). *Br J Pharmacol* 99: 176-180, 1990.

Boutard V, Fouqueray B, Phillippe C, Perez J, Baud L. Fish oil supplementation and essential fatty acid deficiency reduce nitric oxide synthesis by rat macrophages. *Kidney Int* 46: 1280-1286, 1994.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.

Brockerhoff H, Hoyle RJ, Wolmark N. Positional distribution of fatty acids in triglycerides of animal depot fats. *Biochim Biophys Acta* 116: 67-72, 1966.

Brude IR, Drevon CA, Hjermann I, Seljeflot I, Lund-Katz S, Saarem K, Sandstad B, Solvoll K, Halvorsen B, Arnesen H, Nenseter MS. Peroxidation of LDL from combined hyperlipidemic male smokers supplied with omega-3 fatty acids and antioxidants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2576-2588, 1997.

Carbonell T, Ródenas J, Miret S, Mitjavila MT. Fish oil and oxidative stress by inflammatory leukocytes. *Free Rad Res* 27: 591-597, 1997.

Chaet MS, Garcia VF, Arya G, Ziegler MM. Dietary fish oil enhances macrophage production of nitric oxide. *J Surg Res* 57: 65-68, 1994.

Chaigneau T, Feletou M, Huang PL, Fishman MC, Duhault J, Vanhoutte PM. Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Br J Pharmacol* 126: 219-226, 1999.

Cherny VV, Henderson LM, Xu W, Thomas LL, DeCoursey TE. Activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human eosinophils by arachidonic acid. *J Physiol* 535: 783-794, 2001.

Chin JPF, Gust AP, Nestel PJ, Dart AM. Marine oils dose-dependently inhibit vasoconstriction of forearm resistance vessels in humans. *Hypertension* 21: 22-28, 1993.

Cho SH, Choi YS. Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids* 29: 47-52, 1994.

Cominacini L, Garbin U, Cenci B, Davoli A, Pasini C, Ratti E, Gaviragli G, Lo Casio V, Pastorino AM. Predisposition to LDL oxidation during copper-catalyzed oxidative modification. *Clin Chim Acta* 204, 57-68, 1991.

Connor SL, Connor WE. Are fish oils beneficial in the prevention and treatment of coronary artery disease? *Am J Clin Nutr* 66: 1020S-1031S, 1997.

Crawford JH, White CR, Patel RP. Vasoactivity of S-nitrosohemoglobin: role of oxygen, heme, and NO oxidation states. *Blood* 101: 4408-4415, 2003.

Darley-Usmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT, Moncada S. The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comm* 17: 9-20, 1992.

Denicola A, Batthyány C, Lissi E, Freeman BA, Rubbo H, Radi R. Diffusion of nitric oxide into low density lipoprotein. *J Biol Chem* 277: 932-936, 2002.

Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 25: 1017-1058, 1984.

Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Puhl H, Tatzber F. Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation. *Biochem Soc Trans* 18: 1059-1061, 1990.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 13: 341-390, 1992.

Esterbauer H, Rotheneder M, Striegl G. Vitamin E and other lipophilic antioxidant protect LDL against oxidation. *Fat Sci Technol* 8: 316-321, 1989.

Evans PJ, Smith C, Mitchinson MJ, Halliwell B. Metal ion release from mechanically-disrupted human arterial wall. Implications for the development of atherosclerosis. *Free Rad Res* 23: 465-469, 1995.

Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 103: 897-905, 1999.

Fischer M, Levine PH, Weiner B, Johnson MH, Doyle EM, Ellis PA, Hoogasian JJ. Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte-enriched preparation of leukocytes. *Am J Clin Nutr* 51: 804-808, 1990.

Fischer S, Weber PC. Prostaglandin I₃ is formed in vivo in man after dietary eicosapentanoic acid. *Nature* 307: 165-168, 1984.

BIBLIOGRAFIA

Fleischhauer FJ, Yan WD, Fischell TA. Fish oil improves endothelium-dependent coronary vasodilation in heart transplant recipients. *J Am Coll Cardiol* 21: 982-989, 1993.

Flemming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol (Regulat Physiol)* 284: R1-R12, 2003.

Frankel EN. Lipid oxidation, pp. 1-289. The Oily Press LTD, Dundee, Scotland, 1998.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.

García-Cadena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6448, 1996.

George J, Mulkins M, Casey S, Schatzman R, Sigal E, Harats D. The effects of N-6 polyunsaturated fatty acid supplementation on the lipid composition and atherogenesis in mouse models of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 150: 285-293, 2000.

Goodnight SH. The effects of n-3 fatty acids on atherosclerosis and the vascular response to injury. *Arch Pathol Lab Med* 117: 102-106, 1993.

Grimminger F, Mayer K, Kramer HJ, Stevens J, Wlamrath D, Seeger W. Differential vasoconstrictor potencies of free fatty acids in the lung vasculature: 2- versus 3-series prostanoid generation. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 259-265, 1993.

Grundey SM. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol. *N Engl J Med* 314: 745-748, 1986.

Grundey SM i Denke MA. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 31: 1149-1172, 1990.

Haberland ME, Fong D, Cheng L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 1988;241:215-221.

Harris WS, Connor WE, Alam N, Illingworth DR. The reduction of postprandial triglyceridemia in humans by dietary n-3 fatty acids. *J Lipid Res* 29: 1451-1460, 1988.

Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100: 2153-2157, 1997.

Hau MF, Smelt AHM, Bindels AJGH, Sijbrands EJG, Van der Laarse A, Onkenhout W, Van Duyvenvoorde W, Princen HMG. Effects of fish oil on oxidation resistance of VLDL in hypertriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1197-1202, 1996.

Higdon JV, Du SH, Lee YS, Wu T, Wander RC. Supplementation of postmenopausal women with fish oil does not increase overall oxidation of LDL ex vivo compared to dietary oils rich in oleate and linoleate. *J Lipid Res* 42: 407-418, 2001.

Higgins S, Carroll YL, McCarthy SN, Corridan BM, Roche HM, Wallace JM, O'Brien NM, Morrissey PA. Susceptibility of LDL to oxidative modification in healthy volunteers supplemented with low doses of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Br J Nutr* 85: 23-31, 2001.

Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation. *Free Rad Res* 28: 593-600, 1998.

Huff MW, Telford DE. Dietary fish oil increases the conversions of very low density lipoprotein apoprotein B to low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 9: 58-66, 1989.

Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34: 879-886, 1999.

Israel DH, Gorlin R. Fish oils in the prevention of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 19: 174-185, 1992.

Jeffrey BG, Weisinger HS, Neuringer M, Mitchell DC. The role of docosahexanoic acid in retinal function. *Lipids* 36: 859-871, 2001.

Jialal I, Freeman DA, Grundy SM. Varying susceptibility of different low-density lipoprotein to oxidative modification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 11: 482-488, 1991.

Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelial-derived contracting factor. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 257: H33-H37, 1989.

Keys A, Menotti A, Karvonen C, Aravanis MJ, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Bontas AS, Fridanza F, Keys MH. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 124: 903-915, 1986.

Kim P, Shimokawa H, Vanhoutte PM. Dietary w-3 fatty acids and endothelium-dependent responses in porcine cerebral arteries. *Stroke* 23: 407-413, 1992.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298:249-258, 1994.

Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27, 114-120, 1986.

Li H, Oehrlein SA, Wallerath T, Ihrig-Biedert I, Wohlfart P, Ulshofer T, Jessen T, Herget T, Forstermann U, Kleinert H. Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* 53: 630-637, 1998.

Lind L. Lipids and endothelium-dependent vasodilation--a review. *Lipids* 37: 1-15, 2002.

Liochev SI, Fridovich I. Superoxid and nitric oxide: consequences of varying rates of production and consumption: a theoretical treatment. *Free Rad Biol Med* 33: 137-141, 2002.

Lopez D, Caballero C, Sanchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila MT. Free radical production in aortic rings from rats fed a fish oil-rich diet. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 280: H2929-H2935, 2001.

Mackness MI, Durrington PN. Paraoxonase: another factor in NIDDM cardiovascular disease. *Lancet* 346: 856, 1995.

Malle E, Kostner GM. Effects of fish oil on lipid variables and platelet function indices. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 49: 645-663, 1993.

Malo-Ranta U, Ylai-Herttuala S, Metsä-Ketelä T, Jaakkola O, Moilanen E, Vuorinen P, Nikkari T. Nitric oxide donor GEA 3162 inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoproteins. *FEBS Lett* 337: 179-183, 1994.

Marklund SL. Pyrogallol autooxidation. In *Handbook of methods for oxygen radical research*, pp. 243-247. Boca Raton (FL): CRC Press, 1985.

Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27: 8706-8711, 1988.

Matorras R, Perteagudo L, Sanjurjo P, Sasieta M, Ruiz JI. Long chain w-3 polyunsaturated fatty acids and lipid pattern in the mother and the newborn infant. *J Perinat Med* 26: 313-319, 1998.

Matthys KE, Bult H. Nitric oxide function in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 6: 3-21, 1997.

Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res* 26: 194-202, 1985.

Mayer B, Andrews P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Arch Pharmacol* 358: 127-133, 1988.

Mazière C, Dantin F, Conte MA, Degonville J, Ali D, Dubois F, Mazière JC. Polyunsaturated fatty acid enrichment enhances endothelial cell-induced low-density-lipoprotein peroxidation. *Biochem J* 336: 57-67, 1998.

Mensink RP, Katan MB. Effect of a diet enriched with monounsaturated or polyunsaturated fatty acids on levels of low-density and high-density lipoprotein cholesterol in healthy women and men. *N Engl J Med* 321: 436-441, 1989.

Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 12: 911-919, 1992.

Mian KB, Martin W. Differential sensitivity of basal and acetylcholine-stimulated activity of nitric oxide to destruction by superoxide anion in rat aorta. *Br J Pharmacol* 115: 993-1000, 1995.

Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272: 25907, 1997.

Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADPH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 266: H2568-H2572, 1994.

Moreno JJ, Carbonell T, Sanchez T, Miret S, Mitjavila MT. Olive oil decreases both oxidative stress and the production of arachidonic acid metabolites by the prostaglandin G/H synthase pathway in rat macrophages. *J Nutr* 131: 2145-2149, 2001.

BIBLIOGRAFIA

Moreno JJ, Mitjavila MT. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis. *J Nutr Biochem* 14: 182-195, 2003.

Mowri H, Chinen K, Okhuma S, Takano T. Peroxidized lipid isolated by HPLC from atherosclerotic aorta. *Biochem Int* 12: 347-352, 1986.

Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, Harrison DG. Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 260: C219-C225, 1991.

Nair PP, Judd JT, Berlin E, Taylor PR, Shami S, Sainz E, Bhagavan HN. Dietary fish oil-induced changes in the distribution of alpha-tocopherol, retinol and beta-carotene in plasma, red blood cells, and platelets: modulation by vitamin E. *Am J Clin Nutr* 58: 98-102, 1993.

Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di Felice M, Scaecini C. Dietary fish oil enhances plasma and LDL oxidative modification in rats. *J Nutr Biochem* 6: 474-480, 1995.

O'Donnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodworth A, Darley-USmar VM, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with α -tocopherol. *Biochemistry* 36: 15216-15223, 1997.

O'Donnell VB, Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways. Implication for vascular disease. *Circ Res* 88: 12-21, 2001.

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91: 2546-2551, 1993.

Orta X, Balcells J, Olsina J, Venereo Y, Segovia-Silvestre T, Farriol M. Quantitative analysis of ornithine decarboxylase mRNA by reverse transcription-PCR with the Light-Cycler system. *Clin Chem* 48: 1779-1781, 2002.

Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 268:H2274-H2280, 1995.

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666, 1998.

Patel RP, Levonen A, Crawford JH, Darley-Usmar VM. Mechanisms of the pro- and anti- oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 47: 465-474, 2000.

Pearson JD, Slakey LL, Gordon JL. Stimulation of prostaglandin production through purinoceptors on cultured porcine endothelial cells. *Biochem J* 214: 273-276, 1983.

Phillipson BE, Rothrock DW, Connor WE, Harris WS, Illingworth DR. Reduction of plasma lipids and lipoproteins and other cardiovascular risk factors in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 103: 107-121, 1993.

Pieper GM, Jordan M, Dondlinger LA, Adams MB, Roza AM. Peroxidative stress in diabetic blood vessels. Reversal by pancreatic islet transplantation. *Diabetes* 44: 884-889, 1995.

Pritchard KA, Ackerman A, Ou J, Curtis M, Smalley DM, Fontana JT, Stemerman MB, Sessa WC. Native low-density lipoprotein induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction: role of heat shock protein 90 and caveolin-1. *Free Rad Biol Med* 33, 52-62, 2002.

Radi R, Cosgrove TB, Beckman JS, Freeman BA. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem J* 290: 51-57, 1993.

Rodenas J, Mitjavila MT, Carbonell T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 274: C827-C830, 1998.

Rodríguez MC, Saíz MP, Muntané J, Mitjavila MT. Fatty acid composition of erythrocyte membranes affects iron absorption in rats. *J Nutr* 126: 3109-3117, 1996.

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

Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman B, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys* 324: 15-25, 1995.

Rubbo H, Radi R, Anselmi D, Kirk M, Barnes S, Butler J, Eiserich JP, Freeman BA. Nitric oxide reaction with lipid peroxy radicals spares α -tocopherol during lipid peroxidation. *J Biol Chem* 275: 10812-10818, 2000.

Ruiz de Gordo JC, Renobales M, Cerro A, Fernández de Labastida E, Amiano P, Dorronsoro M. Habitual fish intake is associated with decreased LDL susceptibility to ex vivo oxidation. *Lipids* 37: 333-341, 2002.

Sanigorski AJ, Sinclair AJ, Hamazaki T. Platelet and aorta arachidonic and eicosapentanoic acid levels and in vitro eicosanoid production in rats fed high-fats diets. *Lipids* 31: 729-735, 1996.

Scaccini C, Nardini M, D'Aquino M, Gentili V, Di Felice M, Tomassi G. Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions. *J Lipid Res* 33: 627-633, 1992.

Schechter AN, Gladwin MT. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med* 348: 1483-1485, 2003.

Schini VB, Durante W, Catovsky S, Vanhoutte PM. Eicosapentanoic acid potentiates the production of nitric oxide evoked by interleukin-1 β in cultured vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 30: 209-217, 1993.

Schmidt EB, Kristensen SD, De Caterina R, Illingworth DR. The effects of n-3 fatty acids on plasma lipids and lipoproteins and other cardiovascular risk factors in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 103: 107-121, 1993.

Shapiro SS, Mott DJ, Machlin LJ. Kinetic characteristics of β -carotene uptake and depletion in rat tissue. *J Nutr* 114: 1924-1933, 1984.

Shimokawa H, Vanhoutte PM. Dietary ω 3 fatty acids and endothelium-dependent relaxation in porcine coronary arteries. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 256: H968-H973, 1989.

Singer P. Blood pressure-lowering effect of mackerel diet. *Klin Wochenschr* 68, Suppl 20: 40-48, 1990.

Sirtori CR, Gatti E, Tremoli E, Galli C, Gianfranceschi G, Franceschini G, Colli S, Madama P, Maragoni F, Perego P. Olive oil, corn oil and n-3 fatty acids differently affect lipids, lipoproteins, platelets, and superoxide formation in type II hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 56: 113, 122, 1992.

Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mulsch A, Harrison DG, Sindermann I, Meinertz T, Munzel T. Validation of lucigenin as a chemiluminiscent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Comm* 254: 319-324, 1999.

Suzukawa M, Abbey M, Howe PR, Nestel PJ. Effects of fish oil fatty acids on low density lipoprotein size, oxidizability, and uptake by macrophages. *J Lipid Res* 36: 473-484, 1995.

Tagawa H, Shimokawa H, Tagawa T, Kuroiwa-Matsumoto M, Hirooka Y, Takeshita A. Long-term treatment with eicosapentanoic acid augments both nitric oxide-mediated and non-nitric oxide-mediated endothelium-dependent forearm vasodilatation in patients with coronary artery disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 33:633-640, 1999.

Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res* 89: 224-236, 2001.

Toft I, Bonaa KH, Ingebretsen OC, Nordoy A, Jensen T. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on glucose homeostasis and blood pressure in essential hypertension. A randomized control trial. *Ann Intern Med* 123: 911-918, 1995.

Turini ME, Crozier GL, Donnet-Hughes A, Richelle MA. Short term fish oil supplementation improved innate immunity, but increased ex vivo oxidation of LDL in man-a-pilot study. *Eur J Nutr* 40: 56-65, 2001.

Vane JR, Anffard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323: 27-36, 1990.

Vanhoutte PM. How to assess endothelial function in human blood vessels. *J Hypertens* 17: 1047-1058, 1999.

Vanin AF. Iron diethyldithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection. *Methods Enzymol* 301: 269-279, 1999.

Völker W, Dorszewski A, Unruh V, Robenek H, Breithardt G, Buddecke E. Copper-induced inflammatory reactions of rat carotid arteries mimic restenosis/arteriosclerosis-like neointima formation. *Atherosclerosis* 130: 29-36, 1997.

BIBLIOGRAFIA

Wambi-Kiésse CO, Katusic ZS. Inhibition of copper/zinc superoxide dismutase impairs ·NO-mediated endothelium-dependent relaxations. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 276: H1043-H1048, 1999.

Wander RC, Du SH, Ketchum SO, Rowe KE. Effects of interaction of RRR- α -tocopheryl acetate and fish oil on low-density-lipoprotein oxidation in postmenopausal women with and without hormone-replacement therapy. *Am J Clin Nutr* 63: 184-193, 1996.

Wander RC, Du SH, Thomas DR. Influence of long-chain polyunsaturated fatty acids on oxidation of low density lipoprotein. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 59: 143-151, 1998.

Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 152: 711-720, 1998.

Wei EP, Christman CW, Kontos HA, Povlishock JT. Effects of oxygen radicals on cerebral arterioles. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 248: H157-H162, 1985.

White CR, Brock TA, Chang LY. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1044-1048, 1994.

Whitman SC, Fish JR, Rand ML, Rogers KA. N-3 fatty acid incorporation into LDL particles renders them more susceptible to oxidation in vitro but not necessarily more atherogenic in vivo. *Arterioscler Thromb* 14: 1170-1176, 1994.

Witzum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785-1792, 1991.

Yaqoob P, Calder P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol* 163: 120-128, 1995.

Zieman SJ, Gerstenblith G, Lakatta EG, Rosas GO, Vandegaer K, Ricker KM, Hare JM. Upregulation of the nitric oxide-cGMP pathway in aged myocardium: physiological response to L-arginine. *Circ Res* 88: 97-102, 2001.

Zhu BQ, Parmley WW. Modification of experimental and clinical atherosclerosis by dietary fish oil. *Am Heart J* 119: 168-178, 1990.