

Efecto del consumo de aceite crudo de palma

o maíz sobre la oxidación *in vitro* de la HDL plasmática de conejos

Tosca I Scorza¹, Holger Neptalí Ortiz², Oscar Rodríguez S³, Candelaria Alfonso-Pérez⁴

¹Profesor Titular. Cátedra de Fisiopatología, Escuela de Medicina "J.M.Vargas", Facultad de Medicina, UCV.

²Profesor Agregado. Cátedra de Bioquímica, Escuela de Enfermería, Facultad de Medicina, UCV.

³Profesor Agregado. Cátedra de Fisiopatología, Escuela de Medicina "J.M.Vargas", Facultad de Medicina, UCV.

⁴Profesor Agregado. Sección Cardio-Renales, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UCV.

Institución: Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina "J.M.Vargas", Facultad de Medicina, UCV.

Dirección: Tosca Scorza. Cátedra de Fisiopatología, Escuela de Medicina "J.M.Vargas", Facultad de Medicina, UCV, toscascorza@hotmail.com
No hay separatas disponibles.

Agradecimiento: Este trabajo fue financiado por el CDCH, mediante los proyectos N° 09.5688-2004 y 09.00.5704.04

Recibido: 26/05/2007

Aceptado: 30/07/2007

Resumen

Se investigó la susceptibilidad a la oxidación *in vitro* de las HDLs de conejos por acción del Cu²⁺. Los conejos fueron alimentados durante 3 meses con un suplemento de 10 % de aceite crudo de palma o de maíz. Las HDLs aisladas por ultracentrifugación y dializadas se oxidaron con 10 µM de Cu²⁺, la generación de dienos conjugados se midió mediante análisis espectroscópico a 234 nm. La fase de retardo del grupo alimentado con aceite crudo de palma fue de 145 min con respecto a 94 min del grupo que recibió aceite de maíz (p < 0.05%). Se concluye que la ingesta de aceite de palma rico en carotenos y tocoferoles incrementó la protección contra las oxidaciones *in vitro*, de los ácidos grasos poliinsaturados de la HDL.

Palabras claves: Oxidación HDL, aceite de palma, conejo

Abstract

We investigated the *in vitro* susceptibility to copper-induced oxidation of the rabbits HDLs fed during 3 months with 10 % supplementary diet of crude palm oil or corn oil. The isolated HDLs by ultracentrifugation were dialyzed and oxidated following the addition of 10 µM Cu²⁺, the conjugated dienes were analysed by spectroscopic monitoring at 234 nm. The kinetics change of lag-phase of the group feed with crude palm oil was longer (145 min) with respect to the group feed with corn oil (94 min) (p < 0,05). We concluded that the consumed of the crude palm oil, rich in carotenes and tocotrienols, increase the protection *in vitro* of HDLs unsaturated fatty acids oxidation.

Key words: HDL oxidation, palm oil, rabbit

Introducción

El aceite de palma obtenido del fruto de la palma (*Elaeis guineensis*), constituye la segunda fuente más abundante de aceite vegetal a nivel mundial¹, contiene entre 500 a 2000 mg de caroteno/Kg y aproximadamente 500 mg de tocoferoles y tocotrienoles^{2,3}, además de un alto contenido de antioxidantes solubles en agua: ácidos fenólicos y flavonoides⁴. En Venezuela se ha incrementado su cultivo, lo cual aumentará su disponibilidad y el interés en evaluar los efectos biológicos de su consumo.

De acuerdo con los estudios clásicos de Hegsted, Keys y sus colegas^{5,6}, el aceite de palma rico en ácidos grasos saturados: ácido palmítico (38%) sería ubicado en el grupo de las grasas saturadas y según las fórmulas de predicción establecidas, el consumo de aceite de palma induciría aumento en la concentración de colesterol plasmático, ya que, las grasas

saturadas pueden duplicar la concentración plasmática de colesterol, los poliinsaturados lo disminuyen, mientras que, los monoinsaturados tiene poco efecto. Sin embargo, el aceite de palma tiene alto contenido del ácido graso monoinsaturado oleico (C18:1,n-9) y antioxidantes, que modifican su comportamiento respecto al aceite de coco⁷.

Estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado la relación entre concentración plasmática de colesterol y riesgo de afección cardiovascular^{8,14}. Existen evidencias que en esta relación también son importantes la concentración de la lipoproteína de alta densidad (HDL) y la concentración de triacilglicéridos plasmáticos.

En relación a la HDL, se ha demostrado una relación inversa entre niveles de HDL e incidencia de afección coronaria^{15,18}, igualmente niveles de triacilglicéridos superiores a 150 mg/dL

se asocian con un patrón fenotípico aterogénico, caracterizado por un dominio de LDL pequeñas y densas, acompañado de menor concentración de HDL¹⁹⁻²¹.

Desde el punto de vista clínico, la hipertrigliceridemia, es un factor independiente de enfermedades coronarias y está íntimamente relacionado con aumento de remanentes de VLDL, lipoproteínas de densidad intermedia y LDL pequeñas densas²³. La prevención de la aterogénesis causante de infarto al miocardio, una de las principales causas de muerte en Venezuela, se basa entre otras estrategias en disminuir la concentración de LDLc, aumentar la concentración de HDLc y disminuir la susceptibilidad a la oxidación de estas lipoproteínas^{23,25}. En relación con la HDLc, los estudios se han enfocado principalmente en el transporte reverso del colesterol y el riesgo para desarrollar aterosclerosis, pero existe poca información sobre la susceptibilidad de su oxidación con la consecuente pérdida de su funcionalidad, pues existen evidencias que relacionan la oxidación de las lipoproteínas plasmáticas con aumento de riesgo cardiovascular²⁶. En general las enfermedades cardiovasculares tienen como base molecular la oxidación de los lípidos poliinsaturados de la LDL, por la acción de sustancias oxidantes liberadas de las células endoteliales y del músculo liso de la pared vascular, proceso que puede ser igualmente disminuido por el consumo de antioxidantes²⁷. Los antioxidantes del aceite de palma pueden prevenir la acción oxidante de los radicales libres derivados del O₂ (O₂^{•-}, OH[•]) sobre las biomoléculas, con lo cual disminuirán los cambios biológicos que caracterizan el envejecimiento, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer^{28,29}. Sin embargo, sus efectos pueden estar influenciados por la absorción, su concentración en el alimento, cantidad ingerida y la sinergia entre los antioxidantes³⁰. Se ha recomendado el consumo de cantidades moderadas de aceite crudo de palma y sus fracciones, en grupos o comunidades deficientes de vitaminas A y E, porque durante la cocción de los alimentos se retiene entre el 70 y 80% del β-caroteno, siempre que se tenga la precaución de no utilizar el aceite en el reciclaje al freír, porque se forman sustancias tóxicas que afectan las estructuras y el metabolismo celular³¹.

El aceite de palma y sus derivados, son los únicos productos naturales en el mercado mundial con apreciables cantidades de tocotrienoles, en particular de γ-tocotrienol que puede reducir la concentración del colesterol plasmático, mediante la inhibición de la enzima Hidroximetil-glutaril-coenzima A-reductasa hepática que regula la síntesis del colesterol, lo cual también pudiera modificar la estructura y estabilidad de la HDL^{1,32}. En adultos sanos, una dosis de 200 mg de tocoferoles/día durante 50 días incrementó la protección de la HDL contra las oxidaciones, lo cual no se observó con dosis de 50 mg/día³³.

El objetivo de este trabajo fue comparar la susceptibilidad de la oxidación *in vitro* de las HDLs, de conejos alimentados durante 3 meses con suplemento de aceite crudo de palma o maíz, mediante la cuantificación de los dienos conjugados que se generan en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados.

Métodos

Conejos de la raza Nueva Zelanda de 2,0 a 2,5 Kg de peso fueron alimentados *ad libitum* con una de las tres dietas siguientes: Conejarina comercial suplementada con 10% de

aceite crudo de palma (I) ó 10 % de aceite de maíz (II) y un grupo control sin suplemento (III) durante 3 meses, N = 5 por grupo, los animales permanecieron en jaulas individuales. Al final del período de la dieta, después de un ayuno de 14 h se extrajo muestra de sangre por punción cardíaca en tubos con EDTANA₂ (1mg/mL). Del plasma se separaron las HDLs por ultracentrifugación, ajustando la densidad con KBr a 1,21 g/mL³⁴. Se dializaron contra buffer fosfato 10 mM en relación 1:500 (v:v). La oxidación de las HDLs se realizó el mismo día con 10 μL CuSO₄ 1mM (concentración final 10 μM) y 50 μg de proteínas/mL. El tiempo inicial de la oxidación corresponde al momento de adicionar la solución de Cu²⁺ directamente en la celda para medir los dienos conjugados que se generan en el transcurso de la reacción, los dienos conjugados se determinaron a 234 nm. La concentración de proteínas se realizó mediante el método de Markwell³⁵. Las concentraciones de Cu²⁺ y de proteínas fueron optimizadas.

En la curva del transcurso de la reacción se evaluó (i) el tiempo de retardo de la oxidación y (ii) la velocidad máxima de formación de dienos conjugados. El tiempo de retardo está relacionado con la resistencia a la oxidación de los lípidos insaturados contra la oxidación inducida por el ión Cu²⁺. Este tiempo es directamente proporcional al contenido de antioxidantes y equivale a la intersección entre las rectas **a** y **b** de la figura 1. Estas rectas corresponden a las pendientes de la fase de retardo y de la fase de la velocidad máxima de oxidación lipídica respectivamente^{36,37}. El porcentaje de ácidos grasos insaturados, sustrato de la oxidación se determinó por cromatografía en fase gas-líquida, previa extracción de los lípidos con cloroformo-metanol en proporción 2:1 (v/v) y agua³⁸. Como antioxidante se utilizó 10 mg de butil-hidroxitolueno (BHT)/100 ml de solvente. Los lípidos se transestereificaron a ésteres metílicos de ácidos grasos utilizando 5 ml de la mezcla anhídrica metanol: benceno: ácido sulfúrico en proporción 80:10:1 (v: v: v) en reflujo a 80° C por una hora. Los ésteres metílicos se extrajeron dos veces con 5 ml de hexano. La fase orgánica se lavó con agua a 4° C y se filtró sobre papel Whatman® número 1. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron en un cromatógrafo marca Hewlett- Packard modelo 6890, con detector de llama, columna capilar de 30 m x 0,25 mm con INOWAX® de 0,25 μm a 200° C. La fase móvil fue H₂. Para identificar los ésteres metílicos de los ácidos grasos se utilizó el tiempo de retención de patrones Sigma®. Los carotenos, tocoferoles y tocotrienoles se analizaron por HPLC según el método propuesto por Kang y col³⁹.

Resultados

En la figura N° 1, se observa el efecto de la concentración de Cu²⁺ sobre la absorbancia a 234 nm, cuando se peroxidan las HDLs, con lo cual se determinó la cantidad óptima del oxidante Cu²⁺ para efectuar la peroxidación *in vitro*. En la celda de reacción la cantidad óptima de Cu²⁺ fue 10 μM; valores inferiores prolongaron la fase de retardo e incrementaron el tiempo de análisis. Por otra parte, el uso de altas concentraciones de Cu²⁺ (25 μM) produjo una rápida peroxidación de la HDL, que no permitió diferenciar la fase de retardo entre los diferentes grupos experimentales.

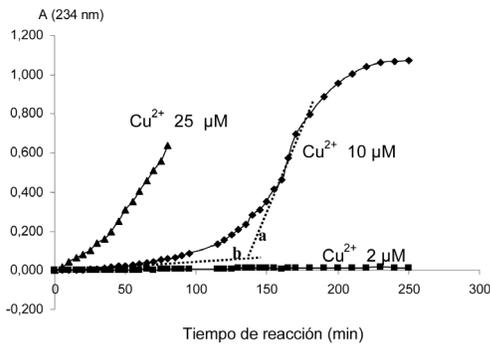


Figura 1.- Efecto de la concentración del Cu²⁺ en la cinética de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la HDL. Con 25 µM de Cu²⁺ no se observa la fase de retardo, con 2 µM de Cu²⁺ la concentración de dienos conjugados no incrementa en 250 min. Con 10 µM de Cu²⁺ se observa una fase de retardo y la velocidad máxima de oxidación. La intersección de las rectas a y b corresponde a la fase de retardo.

En la figura N° 2, se muestran los resultados del efecto de la concentración de HDL en la generación de los dienos conjugados. Esta cantidad se estandarizó en base a la concentración de proteínas que permitiera un adecuado seguimiento del transcurso de la reacción. Con 200 µg de proteínas/mL, se obtuvieron absorbancias superiores al límite máximo permitido en el espectrofotómetro, en una celda de 1 cm de ancho. Con 50 µg de proteínas/mL se pudo monitorear el transcurso de la reacción de peroxidación y evaluar los cambios de la fase de retardo producidos por la ingesta de las diferentes dietas.

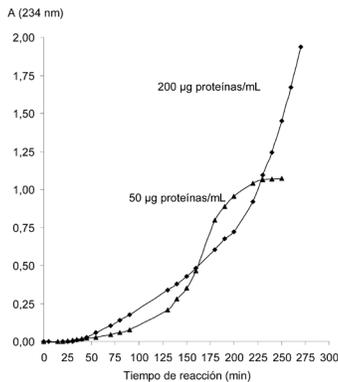


Figura 2.- Efecto de la concentración de proteínas de la HDL en la cinética de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la HDL. Con 200 µg de proteínas/mL, la concentración de dienos conjugados supera la capacidad de detección del equipo, con 50 µg de proteínas/mL se pudo evaluar la cinética hasta 250 min.

En la tabla N° I, se muestra el porcentaje de los diferentes ácidos grasos contenido en las dietas utilizadas, en la tabla N° II el contenido de los carotenos, tocoferoles y tocotrienoles en las dietas y la tabla N° III los resultados de la fase de retardo y de la velocidad máxima de la cinética de peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la HDL en los diferentes grupos.

Tabla 1. Porcentaje de los ácidos grasos de los lípidos totales de las dietas

Ácidos grasos	Conejarina con 10% de aceite crudo de palma	Conejarina con 10% de aceite de maíz	Conejarina sin suplemento
C16:0	35,4 ± 1,1 ^{a, b}	17,4 ± 1,0 ^a	15,8 ± 0,1 ^b
C18:0	7,1 ± 0,2	7,2 ± 0,1	7,2 ± 1,3
C18:1,n-9	39,2 ± 1,1 ^a	33,6 ± 2,8	30,0 ± 1,4 ^a
C18:2,n-6	17,4 ± 0,6 ^a	40,3 ± 0,3 ^a	44,5 ± 0,1 ^a
No identificados	1	2	3

Los resultados se expresan como media ± E.E del porcentaje respecto al total de ácidos grasos. n=3. Letras iguales representan diferencia significativa para un ácido graso entre grupos con p<0,05.

Tabla 2. Contenido de carotenos, tocoferoles y tocotrienoles en las dietas

	Conejarina con 10% de aceite crudo de palma	Conejarina con 10% de aceite de maíz	Conejarina sin suplemento
Carotenos totales	72 ± 5 ^{a b}	0,50 ± 0,05 ^a	0,3 ± 0,1 ^b
α tocoferol	61 ± 2 ^{a b}	31 ± 9 ^a	20 ± 3 ^b
γ tocoferol	47 ± 2 ^a	36 ± 8	24 ± 4 ^a
δ tocoferol	18 ± 1 ^{a b}	5 ± 1 ^a	7 ± 1 ^b
α tocotrienol	53 ± 4	< 5	< 5
γ tocotrienol	33 ± 2	< 1	< 1
δ tocotrienol	13 ± 1	< 1	< 1

Los resultados en mg/Kg de alimento se expresan como media ± E.E. n=3. Letras iguales representan diferencia significativa entre grupos (p<0,05).

Tabla 3. Parámetros de la cinética de peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la HDL, en los grupos

		Velocidad max. (A/min)
Con aceite crudo de palma	145 ± 6	0,040 ± 0,004
Con aceite de maíz	94 ± 3	0,030 ± 0,003
Conejarina sin suplemento de aceite	114 ± 3	0,030 ± 0,003

Los resultados se expresan en media ± EE. La fase de retardo de la peroxidación de la HDL del grupo aceite crudo de palma es mayor (p<0,05), mientras que la V_{máx} no presentó diferencias entre grupos (p<0,05). (A) absorbancia a 234 nm

Discusión

La dieta suplementada con aceite crudo de palma contiene mayor porcentaje de ácido graso saturado C16:0 (35,4%) y menor cantidad de ácido linoleico, C18:2,n-6 (17,4%) respecto a la dieta suplementada con aceite de maíz que contiene 17,4% y 40,3% respectivamente (tabla N° I), lo cual debe influir en la disponibilidad de ácidos grasos poliinsaturados en la HDL, sustratos para la generación de dienos conjugados durante la peroxidación. La dieta sin suplemento de aceite tiene una composición de ácidos grasos similar a la dieta suplementada con aceite de maíz, por lo tanto, las diferencias en los resultados de estos dos grupos no es por la cantidad de sustrato para la oxidación. En el proceso oxidativo son importantes, entre otros factores, la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados y la disponibilidad de antioxidantes, ya que, la oxidación de las lipoproteínas comienza después de la depleción de los antioxidantes lipofílicos, el α-tocoferol actúa como la primera línea antioxidante de defensa y β-caroteno como la última barrera protectora^{40,42}.

En la dieta con aceite crudo de palma, el contenido de carotenos (72 mg/Kg) y de tocoferoles más tocotrienoles (225 mg/Kg) es superior al contenido en la dieta con el aceite de maíz (tabla II), estos antioxidantes, son un importante factor dietético que pudo haber incrementado la protección contra las oxidaciones de la HDL con la ingesta de aceite crudo de palma. La administración de sustancias antioxidantes, retarda el proceso oxidativo y el riesgo de padecer afección cardiovascular⁴³. Coni y col, demostraron que conejos alimentados durante 6 semanas con dieta suplementada con oleuropeína, un bifenol antioxidante del aceite de oliva produjo aumento de 200 min en la fase de retardo de la oxidación de la LDL⁴⁴. Esto podría explicar nuestros resultados del estudio de la oxidación *in vitro* de la HDL, en

el cual, la dieta suplementada con aceite crudo de palma indujo una fase de retardo de 145 min, mientras que con el suplemento con aceite de maíz, la fase de retardo disminuyó a 94 min ($p < 0,05\%$) (tabla N° III).

No se encontró diferencias ($p < 0,05$) en la velocidad máxima de peroxidación entre los grupos con aceite crudo de palma y de maíz, posiblemente porque el porcentaje de los ácidos grasos poliinsaturados, 35,8 % y 40,6 % (resultados preliminares) de la HDL para los grupos con el aceite crudo de palma ó aceite de maíz respectivamente no tienen diferencia tan marcada como en las dietas preparadas con los aceites (tabla I). En el grupo control la fase de retardo fue 114 min, valor intermedio entre los resultados con suplemento de aceites. Como los porcentajes del ácido linoleico son similares en el grupo control y en el suplementado con aceite de maíz (Tabla I), otros factores como la relación de sustrato oxidable y antioxidantes en la dieta basal, pueden ser los responsables de la menor fase de retardo obtenida con el suplemento del aceite de maíz respecto a la dieta basal.

El concepto de un transporte reverso de colesterol, con la importancia de la HDL como partícula que sirve de scavenger del colesterol tisular, ha sido aceptado desde su postulación por Glomset hace más de 20 años⁴⁵ y su capacidad antiaterogénica ha sido demostrado por estudios *in vivo* e *in vitro*^{46,50}, pero existe poca información sobre la susceptibilidad a la oxidación directa de la HDL, con la consecuente pérdida de su función, pues, la HDL oxidada en la presencia de Cu^{2+} o de radicales libres tiene menor capacidad para inducir la salida del colesterol tisular^{51,52}. La evaluación de las oxidaciones *in vitro* de las lipoproteínas aisladas como se utilizó en este trabajo, permiten simular las condiciones en el espacio subendotelial con bajas concentraciones de albúmina.

En apoyo a estos resultados, son los estudios experimentales realizados en conejos, donde se encontró menor concentración de malondialdehído (un marcador de peroxidación lipídica) en tejidos aórticos en los animales que recibieron un suplemento de vitamina E del aceite de palma⁵³, igualmente en ratas se ha demostrado el efecto protector del aceite crudo de palma, sobre el stress oxidativo^{54,55}. En humanos, la administración de vitamina E, aumentó la resistencia a la oxidación de la LDL y HDL^{41, 56}. En conclusión, la presencia de antioxidantes en el aceite crudo de palma protege la oxidación de la HDL, en comparación con el aceite de maíz, importante porque la HDL estaría en condiciones para realizar el transporte reverso del colesterol. Estos hallazgos podrían explicar la menor incidencia de lesiones anatomopatológicas reportadas en trabajos previos de nuestro laboratorio, cuando se utilizó el mismo protocolo experimental con aceite de palma y de maíz (13,14).

Agradecimiento

A la Dra Emilia Negrón, por su laboriosa asistencia técnica en la obtención de las muestras de sangre. A la amable gente del Bioterio de la Escuela de Medicina "J.M.Vargas" y la Sra. Carmen Rodríguez personal de la Cátedra de Fisiopatología, Escuela de Medicina "J M Vargas", UCV.

Referencias

1. Cottrell RC. Introduction: nutritional aspects of palm oil. *J Clin Nutr* 1991; (53): 989S-100S
2. Go SH, Choo YM, Ong SH. Minor constituents of palm oil. *J Am Oil Chem Soc.* 1985; (62): 237-40
3. Nagendran B, Unnithan U, Choo Y, and Sundram K. Characteristics of red palm oil, a carotene-and vitamin E- rich refined oil for food uses. *Food Nutr Bull.* 2000; 21 (2): 189-94
4. Sundram K, Sambanthamurthi R, Tan YA. Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2003; 12 (3): 355-62
5. Hegsted DM, Mc Gandy RB, Mayers ML, Tare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr.* 1965; 17: 281-95
6. Key A, Anderson J, and Grande F. Serum cholesterol response to change in the diet. *Metabolism* 1965 (14) 747-8
7. Wilson TA, Nicolosi RJ, Kottyla T, Sundram K, Kritchevsky D. Different palm oil preparations reduce plasma cholesterol concentrations and aortic cholesterol accumulation compared to coconut oil in hypercholesterolemic hamsters. *J Nutr Biochem.* 2005; (10): 633-40
8. Castelli W. Lipoproteins and cardiovascular disease: biological basis and epidemiological studies. *Value Health* 1998 Jul-Aug;1 (2): 105-9
9. Castelli WP. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease: the Framingham study. *Can J Cardiol (suppl A)* 1988; (Jul): 5-10
10. Assmann G. Lipoproteins and the prediction of coronary heart disease. *Internal Medicine for the specialist.* 1989; September: 14-19
11. Kwiterovich PO. State-of-the-Art update and review: Clinical trials of lipid-lowering agents. *Am J Cardiol.* 1998; (82): 3u-17u
12. Duarte MA, Scorza T. Efecto de dietas suplementadas con ácidos grasos saturados o poliinsaturados sobre parámetros hematológicos, hemostáticos y lipoproteicos: relación con modificaciones histológicas en aorta torácica y abdominal. *Acta Cient Venez.* 2004; (55): 264-275
13. Martucci A, Scorza T, de Ron AT, Pujol I. Lesiones arteriales en Conejos hipercolesterolémicos con dietas ricas en aceite de palma y contenido variable de antioxidantes. *Rev Soc Venez Cien Morfol.* 1997; (3):43-50
14. Martucci A; Scorza T, de Ron AT, Pujol I, Hamana N. Hipercolesterolemia crónica en conejos. Agregación plaquetaria y lesiones en la aorta abdominal. *Rev Fac Medic.* 1998; (21): 24-30
15. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest.* 1990; (85): 1234-41
16. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, Ladu BN, Faull KF, Fogelman AM et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. *J Clin Invest.* 1995; (96): 2882-91
17. Miyazaki A, Rahim AT, Ohta T, Morino Y, Horiuchi S. High density lipoprotein mediates selective reduction in cholesterol esters from macrophage foam cells. *Biochim Biophys Acta.* 1992; (1126): 73-80
18. Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Corti R, Badimon JJ. Emerging importance of HDL cholesterol in developing high-risk coronary plaques in acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardio.* 2003; 18: 286-94
19. Chapman MJ, Bruckert E. The atherogenic role of triglycerides and small, dense low density lipoproteins: impact of ciprofibrate therapy. *Atherosclerosis* 1996; suppl 124: S21-S28
20. Austin MA. Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arteriosclerosis Thromb* 1991; 11: 2-4
21. Patsch JR. Triglyceride-rich lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1994; (110): S23-S26
22. Chapman MJ, Bruckert E. The atherogenic role of triglycerides and small, dense low density lipoproteins: impact of ciprofibrate therapy. *Atherosclerosis.* 1996; 124: S21-S28
23. Nagyová A, Kudlacková M, Klanová J. LDL and HDL oxidation and fatty acid composition in vegetarians. *Ann Nutr Metab.* 2001; (45): 148-51

24. Schnell J, Anderson R, Stegner J, Schindler S, Weiberg R. Effects of a high polyunsaturated fat diet and vitamin E supplementation on high-density lipoprotein oxidation in humans. *Atherosclerosis*. 2001; (159): 459-66
25. Nagano Y, Arai H, Kita T. High density lipoprotein loses its effect to stimulate efflux of cholesterol from foam cells alter oxidative modification. *Proc Natl Acad Sci*. 1991; (88): 6457-61
26. Black T, Wang P, Maeda N, Coleman R. Palm tocotrienols protect ApoE +/- mice from diet-induced atheroma formation. *J Nutr*. 2000; (19): 2420-6
27. Morel D, DiCorleto P, Chisolm G. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*. 1984; (4): 357-64
28. Rissanen T, Voutilainen S, Nyyssonen K, Salonen J. Atherosclerosis and coronary heart disease. *Exp Biol Med*. 2002; (10): 900-7
29. Sundram K, Sambanthamurthi R, Tan YA. Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pac J clin Nutr*. 2003; (3): 355-62
30. Shafiee M, Carbonneau M, d'Huart J, Descomps B, Legar C. Synergistic antioxidative properties of phenolics from natural origin toward low-density lipoproteins depends on the oxidation system. *J Med Food Summer*. 2002; (2): 69-78
31. Kritchevsky D. Impact of red palm oil on human nutrition and health. *Food Nutr Bull*. 2002; (2): 182-7
32. Gapor AB, Berger KG, Hashimoto T, et al. Effects of processing on the content and composition of tocopherols and tocotrienols in palm oil. In: Pushparajah E, Rajadurai M, eds. *The palm oil product technology in the eighties*. Kuala Lumpur: Incorporated Society of planters 1983: 145-56
33. Arrol S, Mackness MI, Durrington PN. Vitamin E supplementation increases the resistance of both LDL and HDL to oxidation and increases cholesteryl ester transfer activity. *Atherosclerosis*. 2000; (150): 129-34
34. Giacomini MI, Ortiz H, Bosch V. Oxidación de las lipoproteínas de alta y baja densidad del plasma humano y su correlación con los ácidos grasos de los fosfolípidos. *Rev Fac Med. UCV*. 2002;(25): 17-19
35. Markwell M, Hass S, Bieber L, Tolbert N. A modification of the Lowry procedure to simplify determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*. 1978; (87): 206-10
36. Arrol S, Mackness MI, Durrington PN. Vitamin E supplementation increases the resistance of both LDL and HDL to oxidation and increases cholesteryl ester transfer activity. *Atherosclerosis*. 2000; (150): 129-34
37. Pinchuk I, Lichtenberg D. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Progr Lip Res*. 2002; (41): 279-314
38. Folch J, Lees M, Sloane GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem*. 1957; (228): 497-509
39. Kang K, Cherian G y Sim J (1998) Tocopherols, retinol and carotenes in chicken egg and tissues as influenced by dietary palm oil. *J Food Sci*. 63(4): 592-5
40. Esterbauer H, Striel G, Puhl H, Rotheneder M: Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun*. 1989; (6): 67-75
41. Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E: Auto-oxidación of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res*. 1987; (28): 495-509
42. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Jürgens G: Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol*. 1990; (3): 77-92
43. Black T, Wang P, Maeda N, Coleman R. Palm tocotrienols protect apoE +/- mice from diet-induced atheroma formation. *J Nutr*. 2000; (19): 2420-6
44. Coni E, Benedetto R, Pasquale M, Maselli R, Modesti D, Mattei R, Carlini E. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*. 2000; (35): 45-54
45. Glomset JA. The plasma lecithin-cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968; (9): 155-167
46. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Vertuyfit JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apo lipoprotein AI. *Nature*. 1991; 19 Sept. (353): 265-67
47. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest*. 1990; (85): 1234-41
48. Miyazaki A, Rahim AT, Ohta T, Morino Y, Horiuchi S. High density lipoprotein mediates selective reduction in cholesteryl esters from macrophage foam cells. *Biochim Biophys Acta*. 1992; (1126): 73-80
49. Macness M, Arrol S, Abbot C, Durrington P. Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*. 1993; (104): 129-35
50. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, Ladu BN, Fault KF, Fogelman AM et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. *J Clin Invest*. 1995; (96): 2882-91
51. Rifichi VA, Khachadurian AK. Effects of dietary vitamin C and E supplementation on the copper mediated oxidation of HDL and on HDL mediated cholesterol efflux. *Atherosclerosis*. 1996; (127): 19-36
52. Bonnefont-Rousselot D, Motta C, Khalil AO, Sola R, La Ville AI et al. Physicochemical changes in human high density lipoproteins (HDL) Oxidized by gamma radiolysis-generated by oxyradicals. Effect on their cholesterol effluxing capacity. *Biochim Biophys Acta*. 1995; (1255):23-30
53. Ismail NM, Abdul Ghafar N, Jaarin K, Khine JH, Top GM. Vitamin E and factors affecting atherosclerosis in rabbits fed a cholesterol-rich diet. *Int J Food Sci Nutr*. 2000; (51): S79-94
54. Ganaffa AA, Succi RR, Eatman D, Silvestrov N, Abukhalaf IK, Bayorh MA. Effect of palm oil on oxidative stress-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens*. 2002; (8): 725-31
55. Pereira TA, Shahi GS, Das NP. Effects of dietary palm oil on serum lipid peroxidation, antithrombin III, plasma cyclic AMP, and platelet aggregation. *Biochem Med Metab Biol*. 1991; (3): 326-32
56. Princen HMG, van Poppel G, Vogelesang C, Buytenhek R, Kok FJ. Supplementation with vitamin E but not β -carotene in vivo protects low density lipoprotein from lipid peroxidation in vitro. *Arteriosclerosis and thrombosis* 1992; (12): 554-562