

Rastreo de lipoperóxidos preformados en la lipoproteína de baja densidad aislada por un método de precipitación con polianiones. Su correlación con los niveles de triglicéridos séricos

MARIA P. NEUMAN*, YOLANDA MONTENERO†, FERNANDO J. NEUMAN*,
JULIO BRUETMAN‡, MARIA C. ROCCELLA†, JOSE NEUMAN*

RESUMEN

Para el rastreo clínico y epidemiológico se desarrolló una metodología simple y sensible aplicada a la detección de lipoperóxidos (LPO) preformados en la lipoproteína de baja densidad (LDL). A estos fines, se adaptó el ensayo yodométrico de El-Saadani y colaboradores (9) a la fracción que contenía LDL aislada por precipitación de polianiones, evitando la ultracentrifugación. Esta fracción también incluye lipoproteínas de densidad intermedia. Al estratificar a 53 individuos por sus niveles de triglicéridos séricos (TG), el cuartilo más alto mostró una elevación muy significativa de LDL-LPO comparada con el más bajo ($69,2 \pm 41,2$ versus $22,9 \pm 10,0$ nmol/mg⁻¹ LDL-apo B, $p < 0,001$). La concentración de LDL-LPO también mostró una fuerte correlación con los TG ($r = 0,73$, $p < 0,00001$) y correlaciones inversas significativas con el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y la subfracción HDL₃-C ($r = -0,37$, $p < 0,01$ y $r = 0,38$, $p = 0,01$, respectivamente). La relación TG/HDL-C, la cual se encuentra estrechamente vinculada a la resistencia a la insulina, estaba fuertemente correlacionada con LDL-LPO ($r = 0,83$, $p < 0,00001$). Se observaron elevaciones significativas de LPO en las hiperlipoproteinemias (HLP) fenotípicas IIB y IV ($p < 0,01$ y $p < 0,02$, respectivamente) y cuando los LPO se expresaron en mol/ml de LDL-apo B, se hallaron valores 2 y 2,5 veces más altos en las HLP tipos IIB y IV, respectivamente, en comparación con sujetos normolipidémicos, lo cual sugiere un entorno más oxidativo para la apo B en ambos fenotipos. No se hallaron variaciones de LPO en las HLP tipo IIA. Esta sencilla técnica para la detección *in vivo* de LDL-LPO subraya el posible efecto aterogénico de los TG a través de su capacidad oxidativa y sugiere la integración de los LPO al conjunto de factores de riesgo asociados: TG altos, HDL-C bajo y resistencia a la insulina. REV ARGENT CARDIOL 1999; 67: 499-506.

Palabras clave: Lipoperóxidos - Triglicéridos - HDL-C - Aterogénesis

INTRODUCCION

La oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) es un mecanismo conocido que interviene en la aterogénesis. Según Steinberg y colaboradores, (1) este proceso tiene lugar, principalmente, en el espacio subendotelial de la arteria, donde se acumula el exceso de LDL en un medio favorable para la oxida-

ción debido a la presencia de macrófagos, células endoteliales y otras células. La LDL modificada resultante no es reconocida por sus receptores específicos pero es absorbida ávidamente por los receptores *scavenger* de los macrófagos que generan células espumosas, precursoras de las estrías grasas. Por otra parte, la LDL del plasma circulante se protege bien

* Instituto Privado de Enfermedades Cardiovasculares (IPEC), Buenos Aires, Argentina

† Instituto Obra Social del Ejército (IOSE)

‡ Hospital Británico de Buenos Aires

Trabajo recibido para su publicación: 5/99. Aceptado: 7/99

Dirección para separatas: Dra. María P. Neuman, Ayacucho 685, (1026) Buenos Aires, Argentina

de la peroxidación lipídica llevando dentro de sí varios antioxidantes, como el ubiquinol, el α -tocoferol, el β -caroteno, el licopeno y otras sustancias menores. (2, 3)

Conociendo la dificultad que existe para detectar lipoperóxidos (LPO) *in vivo*, la mayoría de los autores aíslan la LDL mediante ultracentrifugación (rango de densidad, 1,019-1,063) y miden su susceptibilidad a la oxidación agregando *in vitro* cobre, sales de hierro u otros compuestos oxidantes. (4) La lipoperoxidación es entonces monitoreada por la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), dienos conjugados o hidroperóxidos medidos por cromatografía de fase líquida de alta performance (HPLC), o por medio de métodos yodométricos, quimioluminiscencia, etc. (5) Sin embargo, algunas publicaciones dan cuenta de la detección *in vivo* de LDL oxidada en estudios experimentales (6) y humanos (7) y, recientemente, con el empleo de un anticuerpo monoclonal contra LDL oxidada. (8)

En este estudio se persiguieron dos objetivos principales. Primero, desarrollar una metodología simple y sensible para efectuar el rastreo de grupos de individuos para la detección de lipoperóxidos preformados (LPO) por sus consecuencias fisiopatológicas. Con este fin, adaptamos la técnica espectrofotométrica-yodométrica de El-Saadani y colaboradores (9) para probar LPO en la fracción de LDL aislada por un método basado sobre la precipitación con polianiones. (10) Segundo, emplear esta metodología con un enfoque epidemiológico que relacionara los LPO con otros factores de riesgo aterogénico, especialmente con componentes lipoproteicos.

Dado que en este estudio se encontró una fuerte correlación entre la concentración de LDL-LPO y los niveles de triglicéridos séricos, se formuló la hipótesis de que el efecto aterogénico de los triglicéridos podía atribuirse a su capacidad oxidativa. Actualmente, algunos estudios muestran una susceptibilidad mayor a la oxidación en relación con el contenido de triglicéridos de LDL o su subfracción "pequeña y densa"; (11, 12) también se halló una correlación entre TBARS de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y su contenido de triglicéridos y, recientemente, se informó sobre una detección *in vivo* de LPO en quilomicrones. (14) Teniendo en cuenta que la fracción aislada que se obtuvo en el presente estudio incluye una lipoproteína de densidad intermedia (IDL), (15) la posibilidad de que lipoproteínas ricas en triglicéridos pudieran circular en estado oxidativo sustentaría su papel aterogénico.

Por último, para probar la hipótesis de que los triglicéridos aumentan la peroxidación de lípidos, se evaluaron las correlaciones entre LDL-LPO y diferentes componentes lipoproteicos, así como la glu-

Tabla 1
Características de los pacientes

		Porcentaje
Edad (años)	55,0 \pm 12,8*	
(rango)	(30-70)	-
BMI (kg/m ²)	26,7 \pm 3,5*	
(rango)	22,7 \pm 41,7	30,2†
Sexo (masculino/femenino)	38/15	-
Enfermedad cardiovascular (n)	18	34,0
Hipertensión (n)	23	43,4
Diabetes (n)	5	9,4
Fumadores (n)	12	22,6
Consumo de alcohol (n)‡	5	9,4

* Media \pm desvío estándar.

† Porcentaje de pacientes con valores BMI > 27 kg/m².

‡ Dos o más copas diarias.

n: Número de pacientes.

cosa sérica. También se evaluó la influencia del fenotipo de la hiperlipoproteinemia (HLP) en la peroxidación lipídica.

MATERIAL Y METODOS

Se estudió un grupo de 53 individuos compuesto por 15 mujeres y 38 hombres (de entre 30 y 70 años), quienes asistieron a una clínica especializada para realizarse controles de rutina (Tabla 1). Se excluyeron las personas con tratamiento hipolipemizante, así como las que tomaban α -tocoferol, β -caroteno y otros suplementos antioxidantes. Según el fenotipo de HLP se clasificaron de la siguiente manera: tipo IIa [LDL-colesterol (C) > 4,2 y triglicéridos < 2,0 mmol l⁻¹]; tipo IIb (LDL-C > 4,2 y triglicéridos entre 2,0 y 5,0 mmol l⁻¹) y tipo IV (LDL-C < 4,2 y triglicéridos > 2,0 mmol l⁻¹).

Para la detección de LPO se extrajo sangre después de 12 horas de ayuno y de inmediato se colocó una alícuota en un tubo que contenía 1 mg/ml⁻¹ de Na₂ etilendiaminotetraacético (Na₂ EDTA) y 200 μ M (concentración final) de butilhidroxitolueno (BHT). El resto se utilizó para realizar determinaciones generales de laboratorio y perfil lipídico.

Las concentraciones de triglicéridos séricos y colesterol total, así como el colesterol de HDL aislada y sus subclases (HDL₂ y HDL₃) se determinaron enzimáticamente usando equipos de Boehringer-

Tabla 2
Prueba de recuperación de LDL-apo B en 15 individuos

LDL-apo B (mg/dl ⁻¹)	SN-apo B (mg/dl ⁻¹)	Plasma-apo B (mg/dl ⁻¹)	% Recuperación
93,1 \pm 32,9	24,8 \pm 11,6	121,3 \pm 28,9	91,8 \pm 9,4

apo: Apolipoproteína. LDL: Lipoproteína de baja densidad. SN: Sobrenadante.

Tabla 3
Datos de laboratorio y LDL-LPO de acuerdo con los fenotipos de HLP de los individuos en estudio

	NL	Ila	Iib	IV
<i>n</i>				
Colesterol total (mmol l ⁻¹)	5,19 ± 0,82	6,53 ± 0,68	7,50 ± 1,09	5,70 ± 0,86
LDL-C (mmol l ⁻¹)	3,43 ± 0,61	4,81 ± 0,58	5,39 ± 1,16	3,54 ± 0,53
HDL-C (mmol l ⁻¹)	1,16 ± 0,28	1,18 ± 0,22	1,13 ± 0,30	0,96 ± 0,29
Triglicéridos (mmol l ⁻¹)	0,99 ± 0,34	1,06 ± 0,36	2,91 ± 1,35	3,46 ± 1,79
Apo B (mg/dl ⁻¹)	110 ± 15	128 ± 20	149 ± 28	108 ± 22
LDL-LPO (nmol/mg ⁻¹)	24,4 ± 9,7	24,5 ± 11,7	47,4 ± 24,9*	60,8 ± 47,0†
<i>n</i>	9	11	14	11
HDL ₂ -C (mmol l ⁻¹)	0,35 ± 0,17	0,33 ± 0,20	0,29 ± 0,15	0,32 ± 0,22
HDL ₃ -C (mmol l ⁻¹)	0,78 ± 0,16	0,87 ± 0,13	0,80 ± 0,24	0,64 ± 0,17
<i>n</i>	8	7	13	8
Glucosa (mmol l ⁻¹)	6,00 ± 1,39	5,66 ± 0,41	6,05 ± 1,95	6,72 ± 2,71

p < 0,01. † p < 0,02, comparados con individuos normolipidémicos.

Apo: Apolipoproteína. C: Colesterol. HLP: Hiperlipoproteinemia. LDL y HDL: Lipoproteína de baja y alta densidad. LPO: Lipoperoxidos. NL: Individuos normolipidémicos. n: Cantidad de pacientes.

Mannheim según la descripción efectuada por Neuman y colaboradores. (16) La apo B total y la LDL-apo B se midieron por inmunoprecipitación (Immuno A.G., Viena, Austria).

Para evaluar LDL-LPO, la LDL se aisló por precipitación con polivinilsulfato disuelto en polietilenglicol-metil-éter (Wiener Lab., Rosario, Argentina). Brevemente, se agregaron 0,2 ml de reactivo de precipitación a 0,4 ml de plasma, se dejaron los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se centrifugaron. Se removió el sobrenadante para realizar la determinación del colesterol, el precipitado se lavó con 0,15 M de solución salina y se redisolvió en solución salina al 5% en un buffer de fosfato (pH 7,2), obteniendo una concentración de lipoproteína no superior a 1,5 mg/ml⁻¹. Se emplearon alícuotas de esta solución para las determinaciones de LPO (9) y apo B por duplicado. En 15 muestras también se determinó la apo B en el sobrenadante para llevar a cabo pruebas de recuperación, las que arrojaron un índice de 91,8 ± 9,4% (Tabla 2). Los resultados se expresaron en nanomoles de LPO por miligramo de LDL-apo B.

Análisis estadísticos

Para hallar diferencias y correlaciones estadísticamente significativas, los resultados se analizaron mediante la prueba de la t de Student de dos colas (*two-tailed test*) y una prueba de correlación de Pearson, respectivamente. El valor p < 0,05 se consideró significativo. Los datos se presentan como la media ± DS.

RESULTADOS

Al estratificar a los pacientes según sus características (Tabla 1) no se encontraron variaciones significativas en las concentraciones de LDL-LPO en el pequeño subgrupo analizado. Comparando los 21 hombres

con las 14 mujeres sin enfermedad cardiovascular, ellos demostraron una concentración más elevada de LDL-LPO sin significancia estadística (43,6 ± 21,9 versus 34,3 ± 21,4 mmol/mg⁻¹ LDL-apo B). El subgrupo de fumadores (diez hombres y dos mujeres) presentó la misma tendencia, pero algunos factores asociados, como niveles elevados de triglicéridos séricos, consumo de alcohol y la cantidad pequeña de pacientes, descartaron otros análisis estadísticos.

Los datos de laboratorio figuran en la Tabla 3, donde la distribución de individuos de acuerdo con el fenotipo de HLP mostró valores de LDL-LPO significativamente elevados para los fenotipos Iib y IV en comparación con los normolipidémicos (p < 0,01 y p < 0,02, respectivamente). De acuerdo con estos resultados, los individuos del cuartilo triglicérico más alto mostraron un incremento significativo de LDL-LPO en comparación con el más bajo: 69,2 ± 41,2 versus 22,9 ± 10,0 nmol/mg⁻¹ LDL-apo B (p < 0,001). Se halló una significancia más baja en el

Tabla 4
Concentración de LDL-LPO en 53 individuos por cuartilos de niveles de triglicéridos séricos

	<i>n</i>	Triglicéridos (nmol l ⁻¹)	LDL-LPO nmol mg ⁻¹ /LDL-Apo B	<i>p</i> *
Cuartilo 1	16	< 1,2 (106)	22,9 ± 10,0	
Cuartilo 2	12	1,2-1,8 (106-159)	31,5 ± 20,0	NS
Cuartilo 3	12	1,9-2,6 (168-230)	32,9 ± 20,9	NS
Cuartilo 4	13	> 2,6 (> 230)	69,2 ± 41,2	< 0,001

* Comparado con el cuartilo más bajo. Comparando el cuartilo 4 con el 3 y el 2: p < 0,01. Abreviaturas: Idem Tabla 3. Unidades entre paréntesis son mg/dl⁻¹.

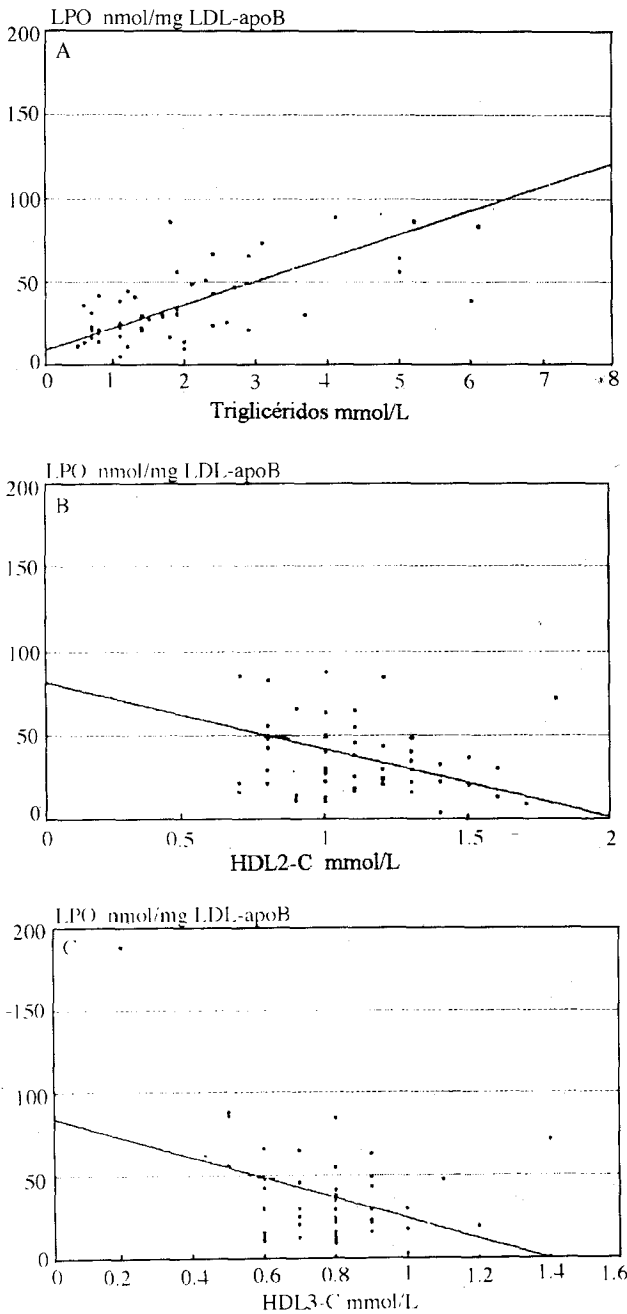


Fig. 1. Correlación estadística entre LDL-LPO y: (A) triglicéridos séricos ($y = 9,39 \pm 14,03 x$, $r = 0,73$, $p < 0,00001$, $n = 53$); (B) HDL-C ($y = 83,00 - 39,60 x$, $r = -0,37$, $p < 0,01$, $n = 53$); (C) HDL₃-C $y = 85,51 - 58,97 x$, $r = -0,38$, $p = 0,01$, $n = 45$). Apo: Apolipoproteína. HDL: Lipoproteína de alta densidad. LDL: Lipoproteína de baja densidad. LPO: Lipoperóxidos. n = Número de individuos.

cuartilo más alto y en los intermedios ($p < 0,001$) (Tabla 4).

Hubo una fuerte correlación entre los niveles de LDL-LPO y de triglicéridos séricos ($r = 0,73$, $p < 0,00001$). También se halló una correlación inversa y significativa entre LDL-LPO y el colesterol (C) HDL sérico ($r = 0,38$, $p < 0,01$). La subfracción HDL₃-C

Tabla 5
Correlación de concentración LDL-LPO con componentes de lipoproteínas séricas y glucosa

	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Triglicéridos	53	0,73	< 0,00001
Colesterol total	53	0,02	NS
LDL-C	53	-0,04	NS
HDL-C	53	-0,37	< 0,01
HDL ₂ -C	45	-0,20	NS
HDL ₃ -C	45	-0,38	= 0,01
Apo B	53	-0,05	NS
Glucosa	36	0,17	NS

Abreviaturas: Idem Tabla 3.

mostró la misma tendencia, no así la HDL₂-C (Figura 1). No se encontraron correlaciones significativas entre otros parámetros lipídicos, apo B y glucosa sérica (Tabla 5).

A partir de las asociaciones referidas, sería útil determinar la relación triglicéridos/HDL-C (TG/HDL-C) (17) como elemento de predicción de LDL oxidada. Como se esperaba, esta relación mostró una fuerte correlación con LDL-LPO ($r = 0,83$, $p < 0,00001$). El LDL-LPO estratificado en cuartilos según esta relación mostró un incremento significativo en el tercero y el cuarto cuartilos en comparación con el primero ($p < 0,02$ y $p < 0,001$, respectivamente) (Tabla 6).

Para destacar el entorno oxidativo de apo B, las concentraciones de LPO también se expresaron en moles por mol de LDL-apo B, asumiendo un peso molecular de apo B de 550 kDa. Como puede observarse en la Figura 2, hubo valores 2 y 2,5 veces más altos en los fenotipos de HLP IIIb y IV, respectivamente, en comparación con individuos normolipídicos. No se hallaron diferencias en HLP tipo IIa.

DISCUSION

Detección de LPO en lipoproteínas circulantes

La metodología desarrollada en este estudio se llevó a cabo persiguiendo dos objetivos. Primero, encontrar un método de detección lo suficientemente

Tabla 6
Concentraciones de LDL-LPO en 53 individuos en los cuartilos de la relación TG/HDL-C

	<i>n</i>	TG/HDL-C	LDL-LPO nmol/mg ¹ /LDL-Apo B	<i>p</i> *
Cuartilo 1	14	< 1,00	23,7 ± 10,5	
Cuartilo 2	13	1,00-1,46	24,8 ± 11,4	NS
Cuartilo 3	13	1,50-2,45	41,7 ± 21,3	< 0,02
Cuartilo 4	13	> 2,45	68,4 ± 41,6	< 0,001

* Comparado con el primer cuartilo.

TG: Triglicéridos. Otras abreviaturas: Idem Tabla 3.

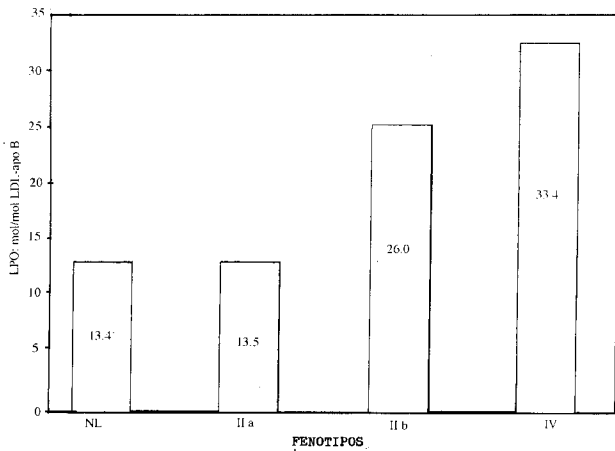


Fig. 2. LDL-LPO expresado en mol/mol LDL-*apo B* de acuerdo con el fenotipo de hiperlipoproteinemia. NL: Normolipidémico. Otras abreviaturas: Idem Figura 1.

simple como para que sea usado en laboratorios clínicos. Otros autores también informaron sobre técnicas que evitan ultracentrifugaciones para aislar LDL (18) o LDL + VLDL (19) y luego medir la susceptibilidad a la oxidación de las fracciones obtenidas con sales de Cu^{2+} . Segundo, la posibilidad de detectar lipoperoxidación *in vivo*, ya que no está establecido definitivamente que una reducción de la resistencia de LDL a la oxidación *in vitro* sea indicativa del proceso real que ocurre *in vivo*. La susceptibilidad a la oxidación depende de la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y/o del contenido antioxidante de la LDL circulante. Más aun, si hay niveles altos de LPO preformado, la menor disponibilidad de ácidos grasos poliinsaturados podría generar una prolongación del tiempo de latencia y la reducción de formación de dienos. Chajes y colaboradores (20) informaron sobre una correlación inversa entre peróxidos lipídicos del plasma y concentración final de dienos luego del agregado de sales de Cu^{2+} a la LDL aislada.

La dificultad para detectar LPO en la LDL nativa fue revisada por Esterbauer y colaboradores. (5) La determinación de TBARS no es lo suficientemente específica ni sensible, porque la fuente de malondialdehído (MDA) son ácidos grasos con más de dos enlaces dobles, siendo el ácido linoleico (18:2) el poliinsaturado predominante en LDL (aproximadamente el 90%). (21) Técnicas más avanzadas, como HPLC combinada con quimioluminiscencia, que miden específicamente los hidroperóxidos, no los detectan en la LDL nativa de individuos sanos o encuentran concentraciones muy bajas en plasma entero. Por otra parte, un método yodométrico corregido para la detección específica de hidroperóxidos lipídicos (22) dio cuenta de valores de $4,0 \pm 1,7 \mu M$ en plasma entero.

La evidencia de lipoproteínas circulantes oxidadas se demostró en diversas publicaciones recientes. En la fracción LDL + VLDL de ratas diabéticas, el incremento de LPO fue atribuido a una mayor absorción de lípidos oxidados. (23) Los mismos autores informaron más tarde sobre un incremento de LPO en los quilomicrones de pacientes diabéticos después de la ingestión de una dieta oxidada. (14) La detección de fluorescencia en la LDL nativa mediante espectroscopia fluorescente tridimensional, (24) la medición de niveles en plasma de 2-isoprostanos (una serie de prostaglandinas F_2 que se forman *in vivo* por la oxidación de lípidos que contienen el radical araquidonil, independientemente de la ciclooxigenasa) (25, 26) y los resultados obtenidos con anticuerpos monoclonales específicos contra LDL oxidada (8) son indicativos, también, de estrés oxidativo *in vivo*.

Asociación de LPO con otras anomalías metabólicas

En el presente estudio, realizado con el método ya descrito, los individuos ubicados en los primeros cuartiles de niveles de triglicéridos mostraron valores de LDL-LPO que están de acuerdo con los que se informaron anteriormente para LDL nativa, o sea, 10-30 $nmol/mg^{-1}$ LDL-proteína. (5) Según El-Saadani y colaboradores, (9) la sensibilidad de esta prueba yodométrica es inferior a 1 $nmol/ml^{-1}$ de LPO y expresa la cantidad total de éstos. La fracción de lipoproteína aislada en nuestro estudio, la cual incluye LDL + IDL, muestra una fuerte correlación entre sus concentraciones de LPO y los niveles de triglicéridos séricos, lo cual podría atribuirse a una mayor disponibilidad de sustrato para oxidación, teniendo en cuenta que por cada mol de triglicérido hay 3 moles de ácidos grasos, aunque no todos ellos son poliinsaturados.

La correlación inversa hallada entre LDL-LPO y HDL-C podría ser un factor dependiente de la conocida correlación inversa entre el último parámetro y los triglicéridos. No obstante, estudios recientes hacen hincapié en el efecto protector de la HDL contra la oxidación y sugieren que la paraoxonasa, una enzima asociada con HDL, es el compuesto responsable de esta inhibición. (27) La correlación inversa significativa entre LDL-LPO y HDL₃-C sustenta la propiedad que posee la HDL₃ de aumentar la acción protectora del ácido ascórbico contra la peroxidación de la LDL. (28)

Por el contrario, no se encontraron correlaciones entre LPL-LPO y otros parámetros lipídicos y la glucosa. Sin embargo, Lavy y colaboradores (29) informaron sobre el incremento de la oxidación de lipoproteínas *in vitro* en pacientes hipercolesterolémicos, o TBARS elevado en la diabetes mellitus, (30) lo cual

está de acuerdo con la mayor oxidación obtenida cuando la LDL fue incubada con glucosa a concentraciones semejantes al estado diabético. (31) La discrepancia con nuestros resultados podría deberse a los niveles moderadamente altos de colesterol y glucosa de los individuos en estudio (Tabla 3).

Potencial efecto aterogénico de la hipertrigliceridemia

La fuerte correlación entre LDL-LPO y triglicéridos hallada en este estudio sugiere un efecto aterogénico potencial de la hipertrigliceridemia. Estudios anteriores también mostraron esta relación en el embarazo (13) y la diabetes, (32) y Stringer y colaboradores (33) informaron una correlación débil, aunque significativa, entre los niveles de LPO y triglicéridos plasmáticos, pero no entre los niveles de LPO y colesterol plasmático, en pacientes con enfermedad arterial oclusiva documentada angiográficamente. El hecho de que la IDL esté incluida en el precipitado polianiónico obtenido con nuestro método podría reforzar el estado oxidativo. Esta fracción, un remanente de lipoproteínas ricas en triglicéridos, asociada con niveles bajos de HDL fue relacionada con la progresión de enfermedad arterial coronaria (EAC) con evaluación angiográfica. (34)

Sin embargo, los mismos triglicéridos de LDL aumentaron la susceptibilidad de la LDL a la oxidación y se correlacionaron con la gravedad de la aterosclerosis coronaria. (11) De hecho, la elevada subfracción pequeña y densa de LDL, que frecuentemente va acompañada de hipertrigliceridemia, es más susceptible a la oxidación y se considera que es un factor de riesgo aterogénico. (12, 35) Algunos mecanismos de oxidación similares a los de las LDL también fueron descritos para β -LDL y VLDL. (36, 37)

Estos descubrimientos llevan a especular sobre el papel aterogénico de la hipertrigliceridemia, que aún es controversial porque, aunque fue apoyada por análisis monovariados, esta asociación independiente desapareció cuando se tuvieron en cuenta otros parámetros, como las concentraciones de HDL-C. En contraposición, después de 19 años de seguimiento, los resultados del Estudio Prospectivo de Estocolmo (Stockholm Prospective Study) establecieron que los niveles de ayuno de los triglicéridos en plasma actúan como factor de riesgo independiente. (38) En épocas más recientes, la experiencia PROCAM (39) llegó a la conclusión de que, a pesar de que la relación entre triglicéridos e incidencia de EAC desaparecía cuando el análisis estadístico multivariado tenía en cuenta el colesterol o HDL-C, la hipertrigliceridemia es un factor de riesgo adicional cuando coincide con una relación LDL-C/HDL-C alta ($> 5,0$). El European Atherosclerosis Research Study (40) y el

Helsinki Heart Study (41) también apoyaron el efecto aterogénico de la hipertrigliceridemia.

El Adult Treatment Panel II (42) señala el riesgo adicional que representa la hipertrigliceridemia cuando se encuentra asociada con hipercolesterolemia. Este estudio recomienda, asimismo, tener en cuenta este parámetro cuando se administran drogas para el tratamiento de LDL-C elevado. Más aun, después de una oxidación *in vitro* moderada, los pacientes con HLP fenotipo IIb mostraron una mayor toma por parte de los macrófagos en comparación con los de fenotipo IIa, (43) lo cual está muy de acuerdo con los hallazgos de nuestro estudio. Considerando los LPO en moles por mol de LDL-apo B, es notable que haya moles de LPO dos y dos veces y media más elevados por cada mol de apo B en los fenotipos IIb y IV, respectivamente, en comparación con individuos normolipidémicos o HLP de tipo IIa (Figura 2). Esta especulación apunta a que el entorno más oxidativo de apo B en los fenotipos IIb y IV facilita los posibles cambios de sus epítopes, (44) los cuales, a su vez, inhibirían su unión con los receptores de LDL, aumentando la toma de lipoproteínas por parte de los macrófagos. Incluso las HLP de tipo IV, sin incremento de apo B y con niveles moderadamente elevados de colesterol (Tabla 3), podrían ser aterogénicas por este mecanismo.

Asociación de TG elevados-HDL-C bajo (la relación TG/HDL-C), LDL pequeña y densa, resistencia a la insulina y LPO

Dos factores de riesgo combinados, TG altos-HDL-C bajo, se consideran una característica de la resistencia a la insulina (45) y Jeppesen y colaboradores (17) demostraron que la relación entre ambos parámetros es un elemento potente de predicción de riesgo aterogénico. A su vez, la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina se asocian con la preponderancia de LDL pequeña y densa, que fue descrita como la subfracción de LDL más aterogénica. (46, 47)

Una nueva evaluación del Estudio Framingham (48) llegó a la conclusión de que la combinación de niveles $TG > 1,7 \text{ mmol l}^{-1}$ - $HDL < 1,03 \text{ mmol l}^{-1}$ es un factor independiente de riesgo de EAC y se informó que en estos puntos de corte hay predominio de LDL pequeña y densa. Según nuestros datos, estas cifras coinciden con los individuos situados en los cuartiles tercero y cuarto de la relación TG/HDL-C, quienes también muestran un incremento significativo de la concentración LDL-LPO (Tabla 6).

Sobre la base de todas estas asociaciones fundamentales halladas en la literatura médica y de nuestros propios resultados, se podría especular que una relación $TG/HDL-C > 2,5$ podría ser útil para predecir un alto riesgo aterogénico dado el cúmulo de factores asociados: resistencia a la insulina, hipertri-

gliceridemia - bajo HDL-C, LDL pequeña y densa y peroxidación lipídica. Los individuos con esta relación se podrían seleccionar como candidatos para llevar a cabo una determinación de LDL-LPO y un tratamiento adecuado.

Las conclusiones a las que se podría arribar en nuestro estudio son dos. Primero, la posibilidad de emplear un método simple y sensible para detectar peroxidación lipídica *in vivo* en laboratorios clínicos. Segundo, la fuerte correlación de LDL-LPO con los triglicéridos y la relación TG/HDL-C, así como el incremento significativo de LDL-LPO en HLP de tipos IIb y IV sustentan el potencial aterogénico de las lipoproteínas ricas en TG y el efecto protector de HDL.

SUMMARY

SCREENING OF LIPOPEROXIDES PREFORMED IN LOW DENSITY LIPOPROTEIN ISOLATED BY A POLYANION PRECIPITATION METHOD. ITS RELATIONSHIP WITH SERIC TRIGLYCERIDE LEVELS

We describe a simple and sensitive methodology developed for detection of preformed lipid peroxides (LPO) in low-density lipoprotein (LDL). The iodometric assay of El-Saadani et al (J Lipid Res, 1989; 30: 627-630) was adapted to the fraction containing LDL isolated by polyanion precipitation avoiding ultracentrifugation. This fraction also includes intermediate density lipoprotein. We performed the stratification of 53 individuals by their serum triglyceride levels (TG) and the highest quartile showed a highly significant elevation of LDL-LPO compared with the lowest one (69.2 ± 41.2 vs 22.9 ± 10.0 nmol/mg Ldl-apoB, $p < 0.001$). LDL-LPO concentration also showed a strong correlation with TG ($r = 0.73$, $p < 0.00001$) and significant inverse correlations with high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and HDL 3-C subfraction ($r = -0.37$, $p < 0.01$ and $r = -0.38$, $p = 0.01$, respectively). The TG/HDL-C ratio, which is closely associated with insulin resistance, was strongly correlated with LDL-LPO ($r = 0.83$, $p < 0.00001$). Significant elevations of LPO were seen in phenotypic hyperlipoproteinemias (HLP) IIb and IV ($p < 0.01$ and $p < 0.02$, respectively). When we expressed LPO in mol/mol of LDL-apoB, 2 and 2.5 fold higher values were found in types IIb and IV HLP, respectively, compared with normolipidemic subjects. This finding suggests a more oxidative environment for apo B in both phenotypes. No variations in LPO were found in type IIa HLP. This simple essay for *in vivo* detection of LDL-LPO, emphasizes the possible

atherogenic effect of TG through their oxidative capacity and suggests the integration of LPO to the cluster of associated risk factors: high TG, low HDL-C and insulin resistance.

Key words Lipid peroxides - Triglycerides - HDL-C - Atherogenesis

Reconocimientos

Agradecemos el apoyo técnico que nos brindó la estudiante Filomena Durante Costas y a la Srta. Olga Valseche por el mecanografiado del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

1. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 1989; 320: 915-924.
2. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci 1988; 85: 9748-9752.
3. Steinberg D and Workshop Participants. Antioxidants in the prevention of human atherosclerosis. Summary of the Proceedings of a National Heart, and Blood Institute Workshop: September 5-6, 1991, Bethesda, Maryland. Circulation 1992; 85: 2338-2344.
4. Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. J Clin Invest 1984; 74: 1890-1894.
5. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Rad Biol Med 1992; 13: 341-390.
6. Morel DW, Chisolm GM. Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. J Lipid Res 1989; 30: 1827-1834.
7. Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. Arteriosclerosis 1988; 8: 79-87.
8. Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T y col. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. J Lipid Res 1996; 37: 45-53.
9. El-Saadani M, Esterbauer H, El-Sayed M, Goher M, Nassar AY, Jurgens G. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent. J Lipid Res 1989; 30: 627-630.
10. Assmann G, Jabs HU, Kohnert U, Nolte W, Schriewer H. LDL cholesterol determination in blood serum following precipitation of LDL with polyvinylsulfate. Clin Chim Acta 1984; 140: 77-83.
11. Regnstrom J, Nilsson J, Tornvall P, Landou CH, Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. Lancet 1992; 339: 1183-1186.
12. Graaf J, Hak-Lemmers HLM, Hectors MPC, Demacker PM, Hendriks JCM, Stalenhoef AFH. Enhanced susceptibility to *in vitro* oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. Arterioscler Thromb 1991; 11: 298-306.
13. Maseki M, Nishigaki I, Hagihara M, Tomoda Y, Yagi K. Lipid peroxide levels and lipid content of serum lipoprotein fractions of pregnant subjects with or without pre-eclampsia. Clin Chim Acta 1981; 115: 155-161.
14. Strapans I, Rapp JH, Pan XM, Kim KY, Feingold RK. Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized 1 lipid in chylomicrons of human serum. Arterioscler Thromb 1994; 14: 1900-1905.
15. Demacker PN, Hijmans AG, Brenninkmeijer BJ, Jansen AP, van't Laar A. Five methods for determining low-density li-

- poprotein cholesterol compared. *Clin Chem* 1984; 30: 1797-1800.
16. Neuman MP, Neuman HR, Neuman J. Significant increase of high-density-lipoprotein₂-cholesterol under prolonged simvastatin treatment. *Atherosclerosis* 1991; 91: S11-19.
 17. Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Cynelberg R. Relation of high TG-low HDL cholesterol to the incidence of ischemic heart disease. An 8-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1114-1120.
 18. Sutherland WHF. Oxidation of heparin-isolated LDL by hemin. The effect of serum components. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1966-1975.
 19. Dujovne CA, Harris WS, Colle Gerrond LL, Fan J, Muzio F. Comparison of effects of probucol versus vitamin E on ex vivo oxidation susceptibility of lipoproteins in hyperlipoproteinemia. *Am J Cardiol* 1994; 74: 38-42.
 20. Chajes V, Sattler W, Stultschning M, Kostner GM. Photometric evaluation of lipid peroxidation products in human plasma and copper oxidized low density lipoproteins: correlation of different oxidation parameters. *Atherosclerosis* 1996; 121: 193-203.
 21. Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res* 1987; 28: 495-509.
 22. Cramer GL, Miller JF, Pendleton RB, Lands WEM. Iodometric measurement of lipid hydroperoxides in human plasma. *Anal Biochem* 1991; 193: 204-211.
 23. Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Feingold RK. The effect of oxidized lipids in the diet on serum lipoprotein peroxides in control and diabetic rats. *J Clin Invest* 1993; 92: 638-643.
 24. Koller E, Quehenberger O, Jurgens G, Wolfbeis OS, Esterbauer H. Investigation of human plasma low density lipoprotein by three-dimensional fluorescence spectroscopy. *Febs Lett* 1986; 198: 229-234.
 25. Morrow JD, Roberts J. Quantification of noncyclooxygenase derived prostanoids as a marker of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1991; 10: 195-200.
 26. Morrow JD, Frei B, Longmire AW y col. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-Isoprostranes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995; 332: 1198-1203.
 27. Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993; 294: 829-834.
 28. Yoshikawa M, Sakuma N, Hibino T, Sato T, Iwata S, Fujinami T. HDL₃ enhances the protective action of ascorbic acid against LDL peroxidation. *Abstracts Atherosclerosis X, Montreal* 1994; 52.
 29. Laxy A, Brook GJ, Dankner G, Ben Amotz A, Aviram M. Enhanced in vitro oxidation of plasma lipoproteins derived from hypercholesterolemic patients. *Metabolism* 1991; 40: 794-799.
 30. Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE y col. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; 98: 469-475.
 31. Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 1994; 94: 771-778.
 32. Nishigaki I, Hagihara M, Tsunekawa H, Maseki M, Yagi K. Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fraction of diabetic patients. *Biochem Med* 1981; 25: 373-378.
 33. Stringer MD, Gorog PC, Freeman A, Kakkar VV. Lipid peroxides and atherosclerosis. *Br Med J* 1989; 298: 281-284.
 34. Phillips NR, Waters D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation* 1993; 88: 2762-2770.
 35. Austin A, Breslow JL, Hennekens CH, Buring E, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260: 1917-1921.
 36. Parthasarathy S, Quinn MT, Schwenke DC, Carew TE, Steinberg D. Oxidative modification of beta-very low density lipoprotein. Potential role in monocyte recruitment and foam cell formation. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 398-404.
 37. Mohr D, Stoker E. Radical-mediated oxidation of isolated human very-low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1186-1192.
 38. Carlson LA, Bottiger LE. Risk factors for ischaemic heart disease in men and women. Results of the 19-year follow-up of the Stockholm Prospective Study. *Acta Med Scand* 1985; 218: 207-211.
 39. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol* 1992; 70: 733-737.
 40. Rosseneu M, Fruchart JC, Bard JM y col. Plasma apolipoprotein concentrations in young adults with a parental history of premature coronary heart disease and in control subjects. The EARS Study. *Circulation* 1994; 89: 1967-1973.
 41. Heinonen OP, Huttunen JK, Manninen V y col. The Helsinki Heart Study I: Coronary heart disease incidence during an extended follow-up. *J Intern Med* 1994; 235: 41-49.
 42. Summary of the Second Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA* 1993; 269: 3015-3023.
 43. Ishikawa Y, Inadera H, Shirai K y col. Moderate oxidation of hypertriglyceridemic low-density lipoprotein causes apolipoprotein B epitope change and enhances its uptake by macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1126: 60-64.
 44. Clavey V, Lestavel-Delattre S, Copin C, Bard JM, Fruchart JC. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII and E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 963-971.
 45. Laws A, Reaven GM. Evidence for an independent relationship between insulin resistance and fasting plasma HDL-cholesterol, triglyceride and insulin concentrations. *J Intern Med* 1992; 231: 25-30.
 46. Reaven GM, Chen YDI, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense, low density lipoprotein particles. *J Clin Invest* 1993; 92: 141-146.
 47. Mykkanen L, Haffner SM, Rainwater DL, Karhapa P, Miettinen H, Laakso M. Relationship of LDL size to insulin sensitivity in normoglycemic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1447-1453.
 48. Castelli WP. Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am J Cardiol* 1992; 70: 3H-9H.