

Lipoperóxidos plasmáticos en pacientes ateroescleróticos

Dres.: HECTOR ENRIQUE MOSSO, REGINA W. de WIKINSKI, ILDEFONSA HERNAEZ, MARIA L. PAVIOLO, HALINA GROSMAN

RESUMEN

Los lipoperóxidos son el producto de la acción del ozono, del oxígeno hiperbárico, del déficit de vitamina E, de las radiaciones, etc. sobre los ácidos grasos poliinsaturados libres o esterificados. Con el objeto de evaluar el proceso de lipoperoxidación en la aterosclerosis se tomaron muestras de sangre venosa en pacientes divididos en los siguientes grupos: Grupo A: 30 pacientes ateroescleróticos, 22 de ellos coronarios, edad media 60,6 años; 27 % de mujeres. Grupo B: 10 controles no ateroescleróticos, edad media 49,1 años, 50 % de mujeres. Grupo C: 24 pacientes ateroescleróticos, edad media 60 años; 12,5 % de mujeres. Grupo D: 26 adultos normales, edad media 24,8 años; 19 % de mujeres. A 10 pacientes del grupo A, con infarto de miocardio previo, se les determinó la diferencia arterio-venosa de lipoperóxidos. Los análisis de lipoperóxidos de los grupos A y B se realizaron en el laboratorio del Hospital de Clínicas y las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro Gilford. Los resultados se informan en nanomoles de malonaldehído/ml de suero, utilizándose el coeficiente de extinción molecular de este compuesto ($1,56 \times 10^5$).

Los resultados de los análisis realizados en el laboratorio del Instituto Modelo se obtuvieron en un Spectronic 20 Bausch y Lomb por lo cual se expresan en densidades ópticas.

Los resultados fueron los siguientes (Media \pm ES). Grupo A: $1,59 \pm 0,11$. Grupo B: $1,18 \pm 0,18$, siendo el grupo A significativamente mayor que el grupo B ($p < 0,01$). Los siguientes resultados se expresan en densidad óptica. Grupo C: $0,025 \pm 0,0028$; Grupo D: $0,018 \pm 0,0006$ siendo el grupo C significativamente mayor que el Grupo D ($p < 0,01$). No se observó diferencia arteriovenosa en los casos estudiados. Tampoco hubo diferencias con relación al sexo y edad.

También se realizaron estudios de lípidos que comprendieron colesterol, ácidos grasos no esterificados, Triglicéridos y lipidograma electroforético con el fin de tipificar las hiperlipemias, cuando se encontraron, según Fredrickson.

INTRODUCCION

Los lipoperóxidos son el producto de la acción del ozono, del oxígeno hiperbárico, de las radiaciones y del déficit de vitamina E, sobre los ácidos grasos poliinsaturados libres o esterificados.

La presencia de lipoperóxidos en las placas ateroscleróticas aórticas fue demostrada por Glavind y cols. (1, 2, 3) quienes examinando extractos de lípidos procedentes de aortas humanas normales y ateroescleróticas pudieron demostrar que existía correlación entre el grado de lesión aterosclerótica y la presencia de peróxidos en el tejido arterial.

Trabajando con extractos lipídicos, de lesiones ateroescleróticas, Harland y cols. (4) encontraron concentraciones elevadas de ésteres de colesterol con ácidos grasos, semejantes a los obtenidos por peroxidación del ácido linolénico.

En trabajos anteriores, Mosso, Ibarra y cols. (5) pudieron demostrar mediante estudios histológicos e histoquímicos de segmentos de arterias humanas tomadas in vivo, la presencia de triglicéridos en la pared arterial, con la disminución simultánea de esterases inespecíficas y de adenosintrifosfatasa (fig. 1 a 3).

Los conceptos referentes a la influencia depresiva de la lipoperoxidación sobre la actividad de diversas enzimas nos indujeron a plantear la hipótesis que uno de los mecanismos determinantes del secuestro de lípidos en la pared arterial podría ser la lipoperoxidación que impediría la degradación normal de ácidos grasos. De esta manera los lipoperóxidos formados en la pared arterial y los circulantes en el plasma sanguíneo jugarían un rol en la etiopatogenia de la aterosclerosis.



Figura 1: Detalle de la capa media arterial, con gran acúmulo de substancia grasa en el intersticio, en zona histológicamente normal. Aceite rojo O-hematoxilina, 250x.

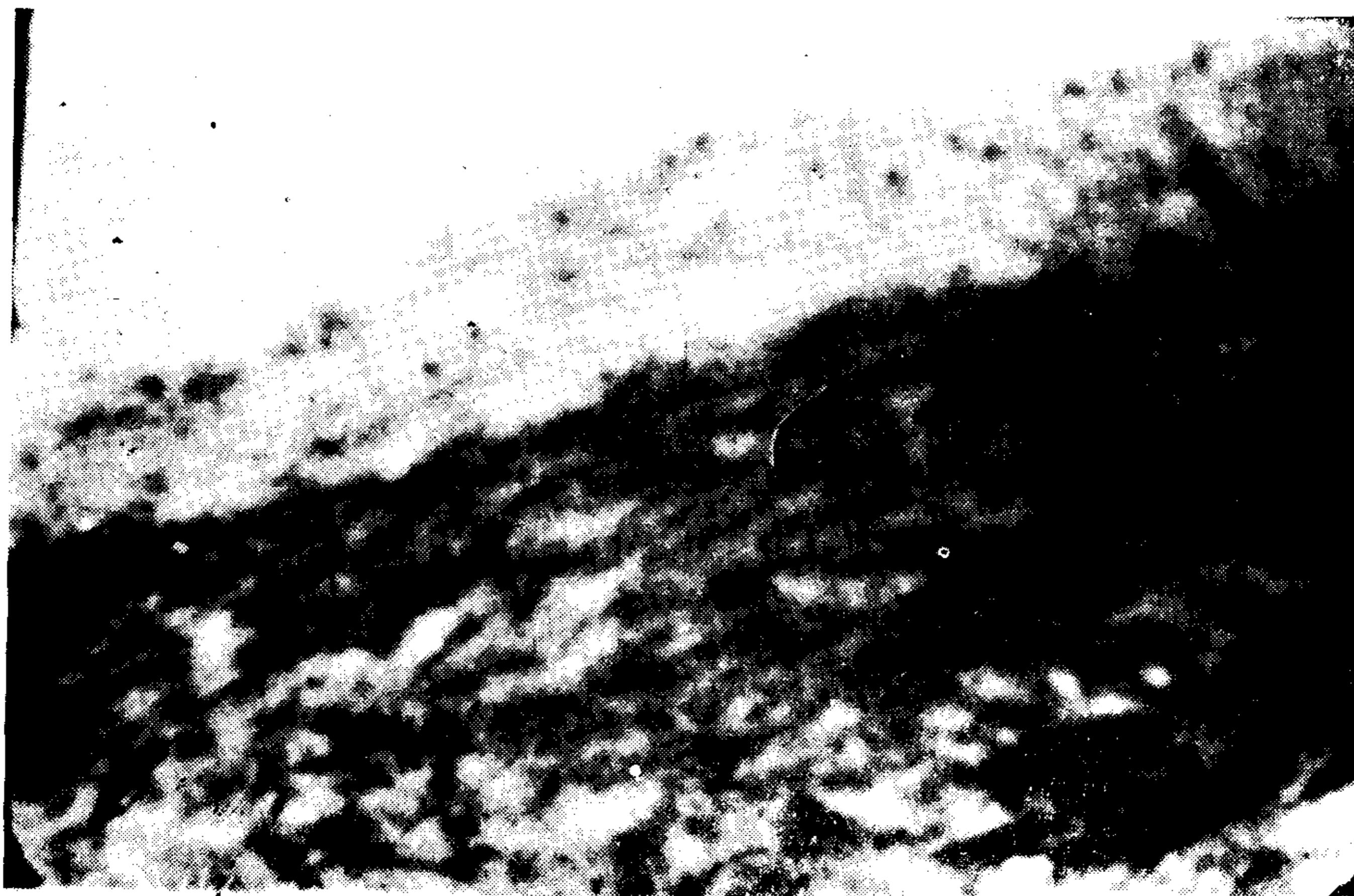


Figura 2: Pared arterial con reacción negativa para esterasas inespecíficas. Intima engrosada, Esterasas inespecíficas, 100 x.

En este trabajo se informan los resultados de la comparación de los niveles de lipoperóxidos circulantes en el plasma de pacientes ateroscleróticos y de controles normales.

MATERIAL Y METODO

Los estudios se realizaron en dos centros universitarios, habiéndose examinado por el mismo equipo médico un total de 90 perso-



Figura 3: Pared arterial con placa de ateroma en la íntima. Reacción positiva en capa media. Ausencia de ATPasa en la superficie de la placa. ATPasa, 100 x.

nas que comprendían 54 pacientes con manifestaciones viscerales de aterosclerosis y 36 controles adultos y jóvenes normales.

Los casos seleccionados se dividieron en cuatro grupos de pacientes:

Grupo A: Constituido por 30 pacientes ateroscleróticos asistidos en el Hospital de Clínicas, con edades de 32 a 80 años, de los cuales el 27 % eran mujeres.

Grupo B: 10 pacientes controles no ateroscleróticos asistidos en el Hospital de Clínicas, con edades de 33 a 70 años; el 50 % eran mujeres.

Grupo C: Formado por 24 pacientes ateroscleróticos asistidos en el Instituto Modelo de Clínica Médica, con edades de 43 a 87 años; e 12,5 % mujeres.

Grupo D: 26 normales, jóvenes alumnos del Instituto Modelo, con edades entre 23 y 37 años, de los cuales el 19 % eran mujeres.

Todos los grupos fueron sometidos previamente a un examen clínico completo, con electrocardiograma, radiografía de tórax, fondo de ojo, y exámenes de laboratorio convencionales, incluido el lipidograma. A conti-

nuación de un ayuno de 12 horas, se procedió a tomar una muestra de sangre venosa, utilizándose los siguientes métodos de laboratorio:

Lípidos totales, método de Chabrol y Charonnat (6)

Triglicéridos: método de Carlson (7)

Colesterol: método de Huang y Chen (8)

Lipoproteínas: técnica electroforética de Lees y Hatch (9)

Lipoperóxidos: técnica del ácido 2-tiobarbitúrico (10)

En lo que respecta a la estimación de los lipoperóxidos, el método empleado fue el de la reacción del ácido 2-tiobarbitúrico con el "pellet" lipoproteico que se produce al reaccionar el suero sanguíneo con el ácido fosfotúngstico en medio sulfúrico. En tales condiciones reaccionan los lipoperóxidos dando un color rosado que se lee a 535 m μ . La expresión de los resultados en densidad óptica depende del aparato de lectura, por lo que se han utilizado espectrofotómetros con alto nivel de reproducción.

Los análisis de los grupos A y B se realizaron en el laboratorio del Hospital de Clínicas y las lecturas se hicieron en un es-

pectrofotómetro Gilford. Los resultados se informan en nanomoles de malonaldehído/ml de suero, utilizándose el coeficiente de extinción molecular de este compuesto ($1,56 \times 10^6$). Los resultados de los análisis de los grupos C y D se obtuvieron en un Spectronic 20 Bausch & Lomb, por lo que se expresan en densidades óptimas.

RESULTADOS

Grupo A: El grupo de 30 pacientes ateroscleróticos mostró $1,59 \pm 0,11$ (media \pm ES) de lipoperóxidos expresados en nanomoles de malonaldehído/ml de suero. Este grupo comprendía 13 pacientes de 32 a 59 años cuyo promedio fue 1,62 n/moles de malonaldehído/ml de suero, mientras que los 17 pacientes restantes, de 60 a 80 años de edad, tenían una media de 1,54. No se comprobó diferencia significativa según las edades.

En 10 pacientes de este grupo se dosaron lipoperóxidos en sangre arterial y venosa, sin que se advirtiera diferencia significativa.

Grupo B: Los pacientes controles tenían un promedio \pm ES de $1,18 \pm 0,18$ n/moles de malonaldehído/ml de suero. Se realizó el test de Student y se encontró que los valores hallados en el grupo A eran estadísticamente superiores al grupo B ($p < 0,01$).

Grupo C: Los 24 pacientes ateroscleróticos tenían un promedio \pm error St. de $0,025 \pm 0,0028$ de densidad óptica medida a 535 m μ . En el grupo de 12 pacientes de 43 a 59 años, el promedio era de 0,025, cifra que se repetía en el grupo de 12 pacientes de 60 a 87 años.

Grupo D: Los 26 jóvenes normales tenían un promedio de $0,018 \pm 0,0006$ de densidad óptica. Comparados los grupos C y D se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0,01$).

En todos los grupos, no se observó correlación entre hiperlipemias y lipoperóxidos.

COMENTARIOS

Los resultados obtenidos nos permiten dejar establecido que los lipoperóxidos se encuentran incrementados en el plasma de los pacientes ateroscleróticos, con niveles estadísticamente significativos con respecto a los controles. No encontramos, en cambio, diferencias con relación al sexo o a la edad, ni tampoco entre la sangre arterial y venosa en los grupos considerados.

No se observó correlación entre el nivel de lipoperóxidos y la tasa de lipoproteínas, colesterol y triglicéridos.

Nuestros resultados pueden considerarse como un complemento del hallazgo realizado por Glavnid (1), quien demostró la presencia de lipoperóxidos en aortas ateromatosas. De ambos hechos puede inferirse que los lipoperóxidos constituyen un factor a tener en cuenta entre todos los que de un modo u otro intervienen en la etiopatogenia de la aterosclerosis.

La importancia de los lipoperóxidos circulantes o depositados se desprende de las investigaciones realizadas por diversos autores (11, 12, 13, 14, 15, 16) que demuestran que el proceso de la lipoperoxidación produce los siguientes fenómenos: a) alteración de las proteínas y lipoproteínas; b) inactivación y destrucción de enzimas; c) alteración de la membrana celular, de las partículas subcelulares e inhibición de la división celular; d) modificación de la hemostasia.

Los hidroperóxidos de metilinooleato tienen un efecto importante sobre la estabilidad de las β lipoproteínas en el suero humano y en el del pollo (17). La implicancia de este fenómeno es grande dada la conocida relación entre hiperbeta lipoproteína y ateromatosis.

Mediante el proceso de lipoperoxidación se inactivan ciertas enzimas que poseen grupos sulfhidrilos (ureasa, glioxalasa) y ribonucleasa. Recientemente Mickel y cols. (18, 19) han demostrado que los lipoperóxidos inhiben la lecitin-colesterol-acyltransferasa en el plasma por alteración de los grupos sulfhidrilos. El papel de la lecitin-colesterol-acyltransferasa en la transferencia de grupos acilo de la lecitina al colesterol implica un rol importante en el catabolismo de las pre β lipoproteínas, consideradas factor de riesgo en la aterosclerosis. Los lipoperóxidos pueden producir un bloqueo metabólico con falla en el catabolismo de las pre β lipoproteínas y reducción de la transferencia de colesterol a las alfa lipoproteínas.

Con respecto a la hemostasia, Barrowcliffe y cols. (20) comunican el efecto que los productos de la autooxidación de los ácidos grasos ejercen sobre la coagulación de la sangre. Los lipoperóxidos y sus productos de degradación están implicados en la

agregación plaquetaria. Okuma y cols. (21) consideran que la acción de los lípidos peroxidados sobre las plaquetas puede ser una de las causas de que la trombina y otros agentes induzcan su agregación y contribuyen a la hipercoagulabilidad intravascular.

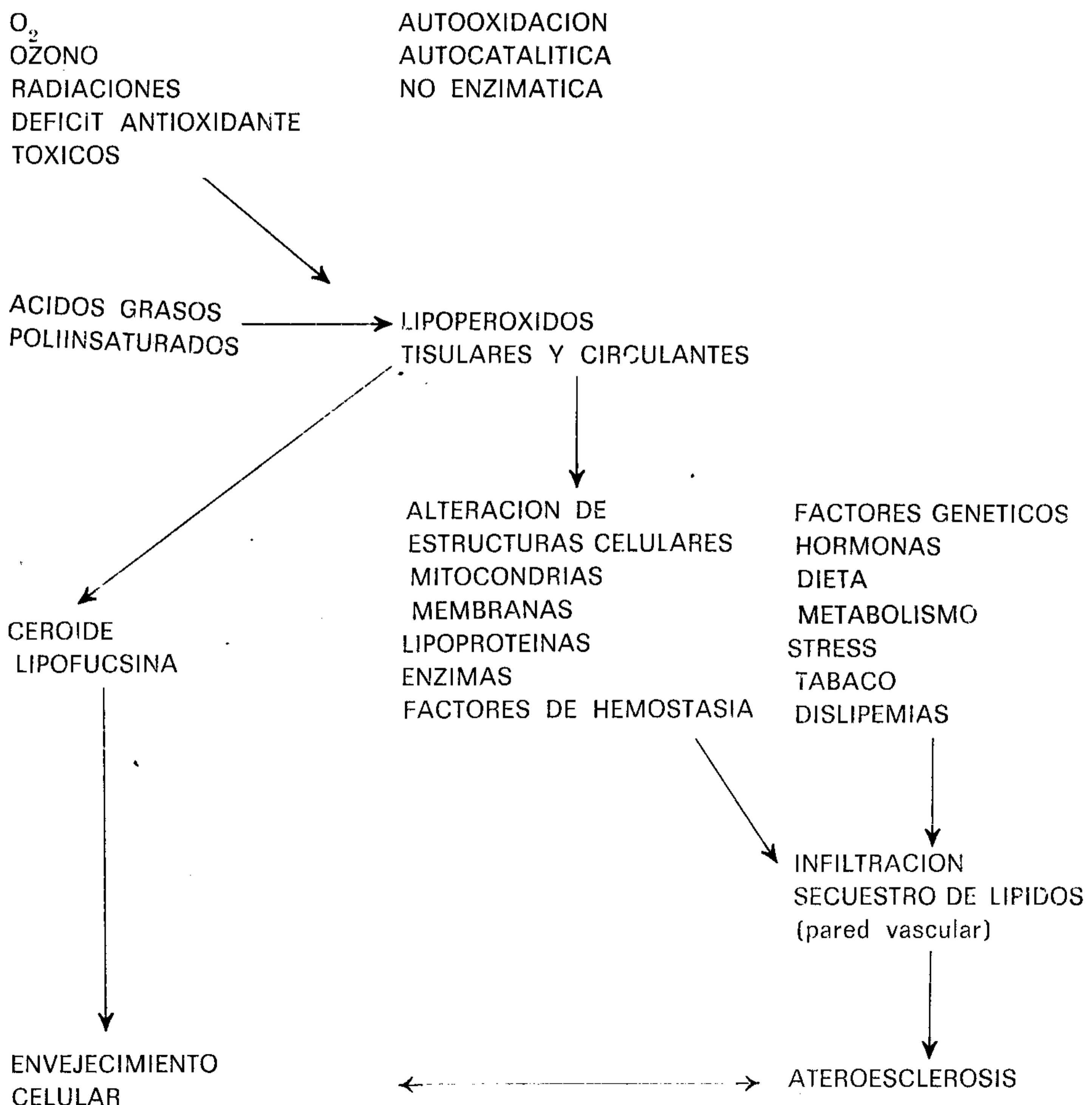
De los estudios comentados hasta ahora se deduce que la lipoperoxidación podría constituir uno de los mecanismos biológicos mediante el cual se favorece la infiltración o el secuestro de lípidos en la pared arterial, a través de la inhibición enzimática que dicho proceso produce (cuadro 1):

Nuestros estudios histoquímicos realizados sobre biopsias de arterias y venas (5)

parecen guardar correlación con estos hallazgos, puesto que encontramos esclerosis e intensa infiltración por grasas neutras en la túnica interna y en la media de las arterias ateromatosas, notándose que dichas lesiones desarrollaban preferentemente en los sectores arteriales donde había una modificación del complejo enzimático de la pared arterial consistente en la ausencia de adenosintrifosfatasa y de esterasa inespecífica. La salida del colesterol esterificado de las placas ateromatosas requiere su hidrólisis previa (22) catalizada por la colesterol esterasa, ya que la transferencia de colesterol se realiza al estado libre. El déficit de esterasa observado en las paredes arteriales atero-

CUADRO 1

LIPOPEROXIDACION



escleróticas justificaría, por lo tanto, su depósito. La presencia de lipoperóxidos que derivan de los lípidos circulantes y de los lípidos de las membranas, y la presencia de radicales libres dan la pauta del secuestro de lípidos.

La influencia de los lipoperóxidos sobre el catabolismo de los triglicéridos y sobre los ácidos grasos poliinsaturados que los componen tiene un antecedente en los interesantes trabajos de Goshal y cols. (23, 24, 25), en los que se demuestra que el tetracloruro de carbono promueve la peroxidación de los lípidos microsomales del hígado, lo cual podría ser responsable del deterioro del mecanismo secretor de triglicéridos. La descomposición peroxidativa precede y podría ser causa de la acumulación anormal de grasa y de la alteración de la síntesis de triglicéridos.

De esta manera, por analogía, podría plantearse la hipótesis de que la presencia de triglicéridos en la pared arterial sería debida a la falta de remoción de los mismos (secuestro) como consecuencia de la intervención del mecanismo de la lipoperoxidación sobre los ácidos grasos que componen a dichos triglicéridos

En síntesis, el hallazgo de Glavind acerca de la presencia de lipoperóxidos en las arterias ateromatosas; nuestras comprobaciones referentes al aumento de lipoperóxidos circulantes en el plasma de pacientes ateroscleróticos, y la infiltración de triglicéridos en la pared arterial conjuntamente con el déficit de ciertas enzimas (ATPasa y esterasa inespecífica), así como las comprobaciones efectuadas por diversos autores referentes a la acción de los lipoperóxidos sobre las membranas celulares, sobre la inactivación de enzimas, y sobre la desnaturalización de lipoproteínas parecen guardar cierta relación lógica que lleva a establecer que los lipoperóxidos formados en la pared arterial y los circulantes en el plasma pueden desempeñar un papel importante en la aterogénesis.

CONCLUSIONES

Nuestros hallazgos nos permiten poner de manifiesto que en el conjunto de aterosclerosis coronarios, cerebrales y periféricos que hemos estudiado, el proceso de la

lipoperoxidación es más activo que en los controles, ya sean éstos adultos mayores o jóvenes, lo cual puede correlacionarse con los datos obtenidos por otros autores en arterias ateromatosas. El efecto de los lipoperóxidos sobre la actividad de enzimas que intervienen en el catabolismo de lípidos, sobre lipoproteínas, sobre estructuras celulares y subcelulares y sobre fenómenos de hemostasia, proporcionaría una explicación adicional al secuestro de lípidos en la pared arterial.

Los lipoperóxidos circulantes se constituirían de esta manera en un factor más a tener en cuenta dentro de la amplia gama de mecanismos patogénicos que llevan a la aterosclerosis.

Como las bases racionales del tratamiento deben dirigirse a controlar todos los posibles factores, habida cuenta la naturaleza multifactorial de la aterosclerosis, deducimos que al margen de otras soluciones terapéuticas ya reconocidas, debería incluirse el uso de principios antioxidantes para neutralizar los efectos deletéreos de los lipoperóxidos, y para que, de este modo, se pueda prevenir su repercusión sobre el proceso del envejecimiento.

Por otra parte, el fácil acceso a la muestra sanguínea y su rápida manipulación, así como la reproducción de los resultados en dos laboratorios diferentes aseguran la confiabilidad de las observaciones y permiten la evaluación del proceso de lipoperoxidación en el laboratorio clínico.

SUMMARY

Lipoperoxides are the product of the action of ozono, hiperbaric oxigen, vitamin E defficiency, radiations, etc. on the poli-insaturated free fatty acids. With the view of evaluate the lipoperoxidation progress in the atheromatous disease, we took samples of venous blood from patients divided into the following groups:

Group A: 30 atherosclerotic patients, 22 coronary, middle aged 60,6 years, 27 % women.

Group B: 10 controls without atherosclerotic disease, middle aged 49,1 years, 50 % women

Group C: 24 atherosclerotic patients, middle aged 60 years, 12,5 % women.

Group D: 26 young normal adults, middle aged 24,8 years, 19 % women.

We determined the difference arterio-venous of lipoperoxides in 10 patients from group A, with myocardial infarction.

The lipoperoxides of groups A and B were made in the Laboratory of the Clinic Hospital and the readings were made by a espectofotometre Gilford. The results are informed in nanomoles of malonaldehido/ml of serum, utilizing the molecular extinction coefficient of this compound ($1,56 \times 10^6$).

The results of the analysis made in the Laboratory of the Model Institute (groups C and D) were obtained in a Spectronic 20 Bausch & Lobs, and they are expressed in optic density.

The results were the following (media \pm SE):

Group A: $1,59 \pm 0,11$.

Group B: $1,18 \pm 0,18$.

Group A es significantly great than group B ($p < 0,01$).

The following results are expressed in optic density:

Group C: $0,05 \pm 0,0028$.

Group D: $0,018 \pm 0,0006$.

Group C is significantly great than group D ($p < 0,01$).

We did not observed difference between arterious and venous lipoperoxides, neither relating to sex and age.

We made also lipids studies (Cholesterol, free fattyacids, triglycerides and lipoproteins) and their classification according Fredrickson.

CONCLUTIONS

Our results permit determine that in atherosclerotic coronary patients, in cerebral vascular and in peripheral vascular disease, the lipoperoxidation process has more activity than in the control persons, wich can be correlated with the data obtained by other authors in atheromatous artery.

The effect of lipoperoxides on the enzymatic activity which acts in the lipids catabolism; on the lipoproteins, on celular and subcelular structures and on haemostatic process should give as an aditional explanation to lipids deposition into the arterial wall.

Circulatory lipoperoxides should be a new factor to be considered into the complex pathogenic mechanism of atherosclerosis.

As the rational basis of treatment must be oriented to the control of all the posible factors, knowing the multifactorial nature of atherosclerosis, we deduct that besides the others therapeutic solutions, should be including the use of antioxidants principles to neutralize the deletereous effects of lipoperoxides, and be able then to prevent their repercution on the age process.

The easy access to the samples blood and their rapid methodology, as the reproduction of

the results in two different laboratories too, assure the confiability of the observations and permit the evaluation of the lipoperoxidation process on the clinic laboratory.

BIBLIOGRAFIA

1. Glavind, J.; Hartmann, H.; Clemmesen, J.; Jes-sen, K. E. y Dam, H.: Acta Path. et Microbiol. Scandinav., 30: 1, 1952.
2. Capalna, S.: Rev. Roum. Physiol., 5, 3: 217, 1968.
3. Glavind, J. y Tryding, N.: Acta Physiol. Scand., 49: 97, 1960.
4. aHrland, W. A.; Gilbert, J. D.; Brooks, Ch. J. W.: Biochim. et Biophys. Acta, 316: 378, 1973.
5. Mosso, H. E.; Ibarra, R.; Berreta, J. A.; Wil-kinski, R. W. de; Halperin, H. K. de; Battellini, R.; Flichman, J. C. y Alvarez, J.: Conceptos en Cedicina, vol. 11, nº 5, 6 y 7, págs. 25, 31 y 11, 1975-1976.
6. Chabrol, E. y Charonnat, R.: Clinica Chimica Acta, V. 22, nº 4, pág. 571, 1968.
7. Carlson, L. A., Jr.: Atherosclerosis Res., 3: 334, 1963.
8. uanHg, T. C.; Chen, C. P.; Wafler, V. y Raftery, A.: 9nal. Chem., 33: 1405, 1961.
9. Lees, R. S. y Hatch, F. T., Jr. Lab. Clin. Med., 61: 518, 1963.
10. Tappel, A. L. y Zalkin, M.: Arch. Biochem. Biophys., 80: 326, 1959.
11. Hochstein, P. y Ernster, Y.: Ciba Found. Symp. on cellular injury, Londres, 1964, J 5 A. Churchill Ltd., p. 123.
12. Okuma, M.; Baldini, M. y Steiner, B.: Blood, 34: 712, 1969.
13. Desai, I. D. y Tappel A. L.: J. Lipid Res., 4: 204, 1963.
14. Wilbur, K. M.; Kenaston, C. B.; Wolfson, N.; Ottolenghi, A. y Gaulden, M. E.: Anat. Res., 120: 708, 1954.
15. Chow, C. K. y Tappel, A. L.: Lipids, 7: 518, 1972.
16. Roubal, W. T. y Teppel, A. L.: Arch. Biochem. and Biophys., 113: 5, 1966.
17. Symposium on Foods Lipids and their Oxidation. Ed. H. W. Schultz PhD. The Avi Publishing Co. Inc., 1962, Westport, Connecticut.
18. Mickel, H. S. y Fould, E. L.: Lipids, 5: 663, 1970.
19. Mickel, H. S.; Foulds, E. L. y Clark, D. A.: Lipids, 7: 121, 1972.
20. Barrowcliffe, T. W.; Gutteridge, J.M.C. y Dorman-dy, T. L.: Thrombos. Diathes. Haemorrhagica, 33: 271, 1975.
21. Okuma, M.; Steiner, M. y Baldini, M.: J. Lab. Clin. Med., 77: 728, 1971.
22. Myant, N. B.: Biochem. Soc. Symp., nº 33, R. S. M. Smellie Ed. Acad. Press, 1971.
23. Goshal, A. K. y Recknagel, R. O.: Life Scie., 4: 1521, 1965.
24. Recknagel, R. O. y Goshal, A. K.: Lab. Invesig., 15: 132, 1966.
25. Goshal, A. K.; Porta, E. A. y Hartroft, W. S.: Am. J. Patho., 54: 275, 1969.