

Los radicales libres en la sangre arterial y venosa. Su relación con la patogenia de la aterosclerosis

H. MOSSO, A. BOVERIS, O. VACCAREZZA, C. GIULIVI, M. J. NOVOA BERMUDEZ,
F. LUCESOLI, M. J. ANTUNEZ

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA - Hospital Militar "Cirujano Mayor Dr. Cosme Argerich", Buenos Aires

Trabajo recibido para su publicación: 12/90. Aceptado: 4/91

Dirección para separatas: Ayacucho 1510, (1112) Buenos Aires, Argentina

Los radicales libres oxigenados intervienen en la patogenia del envejecimiento y en los mecanismos que llevan a la aterosclerosis. Son especies químicas que tienen un electrón no apareado en su capa externa. Las formas activadas del oxígeno son: el oxígeno singulete, el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidróxilo. Son de vida media corta, reactivos e inestables. La lipoperoxidación se produce como resultado de la acción del oxígeno, del ozono, de las radiaciones o de numerosos tóxicos sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas. Solamente sobreviven los organismos que desarrollan un sistema de defensa antioxidante. La presencia de lipoperóxidos se demuestra en tejidos mediante la técnica de la quimioluminiscencia y en la sangre con el método del ácido 2-tiobarbitúrico, que permite dosar el malondialdehído. Los radicales libres dañan las estructuras celulares, membranas y mitocondrias, desnaturalizan las lipoproteínas y ácidos nucleicos y alteran los sistemas enzimáticos y los factores de la hemostasia. El hierro y el cobre aceleran el proceso de lipoperoxidación. El presente trabajo tuvo como objeto el estudio del malondialdehído en sangre proveniente del ventrículo derecho (prepulmón) y del ventrículo izquierdo (postpulmón) de pacientes sometidos a estudios hemodinámicos. Se evaluó el papel que cumple el pulmón en la oxidación de lipoproteínas y su implicancia en la patogenia de la aterosclerosis. Los resultados indican que: a) La proporción de malondialdehído es mayor en la sangre proveniente del ventrículo izquierdo que en la del ventrículo derecho. b) La sangre a su paso por el pulmón debe sufrir un proceso de oxidación que desnaturaliza a las lipoproteínas LDL nativas, transformándolas en oxidadas que, si son captadas por los macrófagos que penetran a través del endotelio, pueden contribuir a la formación de las lesiones ateromatosas. c) El aumento de malondialdehído postpulmón podría ser consecuencia directa de una mayor presión parcial de oxígeno en la sangre arte-

rial con respecto a la venosa. De ello se deduce que el lecho arterial estaría más expuesto al estrés oxidativo que el lecho venoso. d) En consecuencia, la sangre que sale del ventrículo izquierdo tendría más capacidad aterogénica.

La presencia de lipoperóxidos en las placas ateroscleróticas de la aorta fue demostrada por primera vez por Glavind y colaboradores,¹ quienes descubrieron que existe correlación entre el grado de lesiones ateroscleróticas y los niveles de lipoperóxidos en el tejido arterial.

Mosso y colaboradores,² en experiencias realizadas en seres humanos, demostraron que en los pacientes ateroscleróticos coronarios, cerebrales y periféricos, el proceso de lipoperoxidación es más activo que en los controles normales y que en los viejos es mayor que en los jóvenes. Se deduce, en consecuencia, que los lipoperóxidos circulantes y los radicales libres oxigenados son un factor para tener en cuenta dentro de los mecanismos patogénicos que llevan a la aterosclerosis y al proceso de envejecimiento.

Como se sabe, la incidencia de aterosclerosis aumenta con la edad. Esto puede ser debido, entre otros, a los siguientes factores:

- 1) Cantidad elevada de ácidos grasos poliinsaturados en los lípidos de la pared arterial.
- 2) Alto grado de insaturación de los ácidos grasos hallados en la vejez, que favorece la lipoperoxidación.
- 3) Niveles séricos elevados de hierro y cobre que catalizan la reacción y por ende aceleran la lipoperoxidación.

De este modo, la permanente lipoperoxidación en el plasma puede iniciar la aterogénesis al dañar el endotelio de la pared arterial.

La secuencia metabólica sería la siguiente:

- 1) Incremento de los productos de oxidación de las lipoproteínas que agreden el endotelio y facilitan la deposición de lipoproteínas aterogénicas en la pared arterial.
- 2) Proliferación de peroxisomas con aumento del peróxido de hidrógeno.
- 3) Los productos de lipoperoxidación activan la fosfolipasa A₂ e inactivan la PGI₂ sintetasa, con lo cual aumenta el TXA₂, que favorece la agregación plaquetaria y la liberación del factor de crecimiento y del oxígeno activado, con el consiguiente daño endotelial.
- 4) La agregación plaquetaria estimula la cascada metabólica del ácido araquidónico y se libera malondialdehído, que modifica

la Apo B de la lipoproteína de baja densidad.

- 5) La APO se activa por el malondialdehído y la LDL no es reconocida por los receptores Apo B-E hepáticos y extrahepáticos.
- 6) La LDL modificada penetra entonces en los macrófagos, forma las células espumosas por la vía de receptores no regulables y aumenta el colesterol esterificado internamente.

Desde la aparición de las teorías tradicionales de la aterogénesis, como la de la incrustación y la de la imbibición, se fueron desarrollando otras nuevas.

A partir de 1976, Ross y colaboradores³ hicieron una importante contribución al encontrar que las plaquetas pueden liberar el denominado factor de crecimiento, que es uno de los más potentes que se conocen en biología.

Desde este punto de vista, para poner en movimiento el proceso aterogénico es necesaria la presencia de un trombo plaquetario. Las plaquetas se romperían liberando al factor de crecimiento que al difundirse en la pared arterial hacia las células musculares lisas de la túnica media provocaría su proliferación.

La acción de los radicales libres en la aterogénesis se relaciona con la moderna teoría de la inflamación. El incremento de colesterol sanguíneo va acompañado de una mayor adherencia de mononucleares, principalmente monocitos, a la superficie del endotelio, los que penetran a través de la luz y se depositan en la íntima.

Estos monocitos se transforman, en el tejido arterial, en macrófagos que fagocitan las gotas de grasa que aparecen como burbujas en el citoplasma.⁴

OBJETIVOS

Determinación de malondialdehído en sangre venosa periférica y en sangre proveniente de los ventrículos derecho e izquierdo (pre y post pulmón) perteneciente a pacientes sometidos a estudio hemodinámico, para evaluar el proceso de lipoperoxidación en ambos sectores y el papel que cumple el pulmón en la oxidación de las lipoproteínas plasmáticas que circulan por él y su posible implicancia en la patogenia de la aterosclerosis.

MATERIAL Y METODO

Selección de pacientes

Se evaluaron 18 pacientes de sexo masculino entre 39 y 71 años de edad (promedio 64,8 años) con coronariopatías, valvulopatías y miocardiopatías. Estos pacientes fueron sometidos a cateterismo de cavidades derechas e izquierdas con la técnica habitual y en los coronarios se realizó cineangiocoronariografía, en el Servicio de Hemodinamia del Hospital Militar Central Cir. Mayor Dr. Cosme Argerich.

A todos los pacientes se les efectuó historia clínica, con antecedentes heredofamiliares de detección de factores de riesgo y examen físico completo, electrocardiograma radiografía de tórax, análisis y ecocardiograma.

Se extrajeron 10 ml de sangre heparinizada del ventrículo derecho e izquierdo y de una vena periférica.

Determinación de malondialdehído (MDA)

Los estudios se realizaron en la Cátedra de Físicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Los pacientes tenían 12 horas de ayuno. Se centrifugó la sangre entera, previamente incubada durante 30 minutos a 37°C, a 4.500 rpm, durante 10 minutos, y se separó el suero.

La formación de malondialdehído como medida de lipoperoxidación se determinó por una modificación del método del ácido tiobarbitúrico (TBA).⁵ El dosaje de malondialdehído en material biológico se basa en su reacción con ácido tiobarbitúrico, con eliminación de dos moléculas de agua para dar un pigmento cristalino rosado con máximo de absorción entre 532 y 535 nm. La reacción debe llevarse a cabo a pH 2-3, ya que la acidez es esencial para la formación del complejo MDA-TBA y un exceso de ácido concentrado puede inhibir la formación de color.⁶

Se colocó 0,4 ml de suero en un tubo de centrifuga, se precipitó con 0,6 ml de ácido tricloroacético 10% a 0°C y se centrifugó durante 5 minutos. El sobrenadante (0,6 ml) se incubó durante 90 minutos a 60°C, con 0,6 ml de TBA 0,67% p/v en agua destilada. Después de enfriar a temperatura ambiente, las muestras fueron leídas a 535 nm en un espectrofotómetro Metrolab 325 digital (RC 325 BD). Los resultados se expresaron como nmol/ml suero (μM) con un coeficiente de extinción E: $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

DISCUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que en todos los casos, excepto en tres, es mayor la proporción de MDA en la sangre proveniente del ventrículo izquierdo (postpulmón) que en la sangre del ventrículo derecho (postpulmón) ($p < 0,001$) y que en la sangre de vena periférica. Esto lleva a postular que la sangre que sale del ventrículo izquierdo es más aterogénica que la sangre que entra en el ventrículo derecho.

La sangre del ventrículo derecho representa la sangre recolectada en el organismo y el hígado, la que a su paso por el pulmón se oxigena, oxidándose parcialmente y desnaturizándose las lipoproteínas LDL nativas del hígado, las que se transforman en LDL oxidadas, más aterogénicas, pues se incorporan con mayor facilidad a las células mononucleares y a los linfocitos transformados en macrófagos en el subendote-

Tabla 1
Malondialdehído en sueros arteriales y venosos
centrales y periféricos

Paciente	Arterial postpulmón (μM)	Venoso prepulmón (μM)	Sangre periférica (μM)	Relación arterial/venoso
1	3,85	1,73	0,90	2,22
2	3,14	1,90	5,00	1,65
3	4,30	1,96	1,35	2,20
4	2,95	2,44	2,11	1,21
5	5,50	2,31	1,32	2,40
6	1,54	1,41	1,15	1,10
7	4,49	1,99	1,99	2,26
8	0,51	0,26	0,83	1,96
9	3,59	1,66	0,90	2,16
10	4,31	3,14	3,72	1,37
11	1,70	0,48	1,23	3,54
12	0,67	0,73	1,29	0,92
13	1,19	0,55	0,41	2,16
14	0,89	1,23	1,01	0,72
15	2,40	1,23	2,10	1,95
16	0,72	0,22	0,13	3,27
17	3,61	1,46	1,96	2,47
18	1,52	1,92	0,60	0,79
$\bar{x} \pm \text{ESM}$	$2,60 \pm 0,38$	$1,48 \pm 0,19$	$1,56 \pm 0,29$	$1,91 \pm 0,19$

$p < 0,001$ entre suero arterial postpulmón y suero venoso prepulmón (centrales).

lio. Por otra parte, los lipoperóxidos generados postpulmón lesionan a su vez al endotelio arterial y favorecen la adhesividad de los monocitos, linfocitos y plaquetas que se incorporan a la pared arterial, transformándose en macrófagos que fagocitan los lípidos circulantes y se convierten en células espumosas, que han de constituir luego las estrías grasas y más tarde la placa de ateroma.⁷

Nuestros hallazgos señalarían el papel que cumple el tejido pulmonar en el metabolismo de las lipoproteínas, especialmente la LDL, y en su oxidación, contribuyendo de este modo a la patogenia de la aterosclerosis que, como se sabe, desarrolla casi exclusivamente en el territorio arterial postpulmón y no en el territorio venoso prepulmón, a pesar de que las lipoproteínas circulan por ambos territorios. El aumento de MDA postpulmón podría ser consecuencia directa de una mayor presión parcial de O₂ en la sangre arterial con respecto a la venosa. De ello se deduce que el lecho arterial estaría más expuesto al estrés oxidativo que el lecho venoso.

Por otra parte, las arterias tienen una capa muscular con xantinoxidasa que las venas no tienen y por lo tanto estarían también más expuestas.

Las células espumosas se originan en los monocitos circulantes que se han introducido debajo del endotelio arterial, aunque algunas son derivadas de las células musculares lisas de la túnica media. La alteración de las LDL lleva a la acumulación de colesterol esterificado en los monocitos-macrófagos humanos.⁸ La captación de las LDL por parte de las arterias, dando lugar a la formación de células espumosas y estrías grasas, puede hacerse por un camino independiente de los receptores LDL. Se han visto lesiones ricas en células espumosas en pacientes y en animales deficientes en receptores LDL funcionantes. La carga de lípidos de los macrófagos puede ocurrir mediante la toma de β -VLDL, que es rica en colesterol y para la cual el receptor LDL tiene gran afinidad.

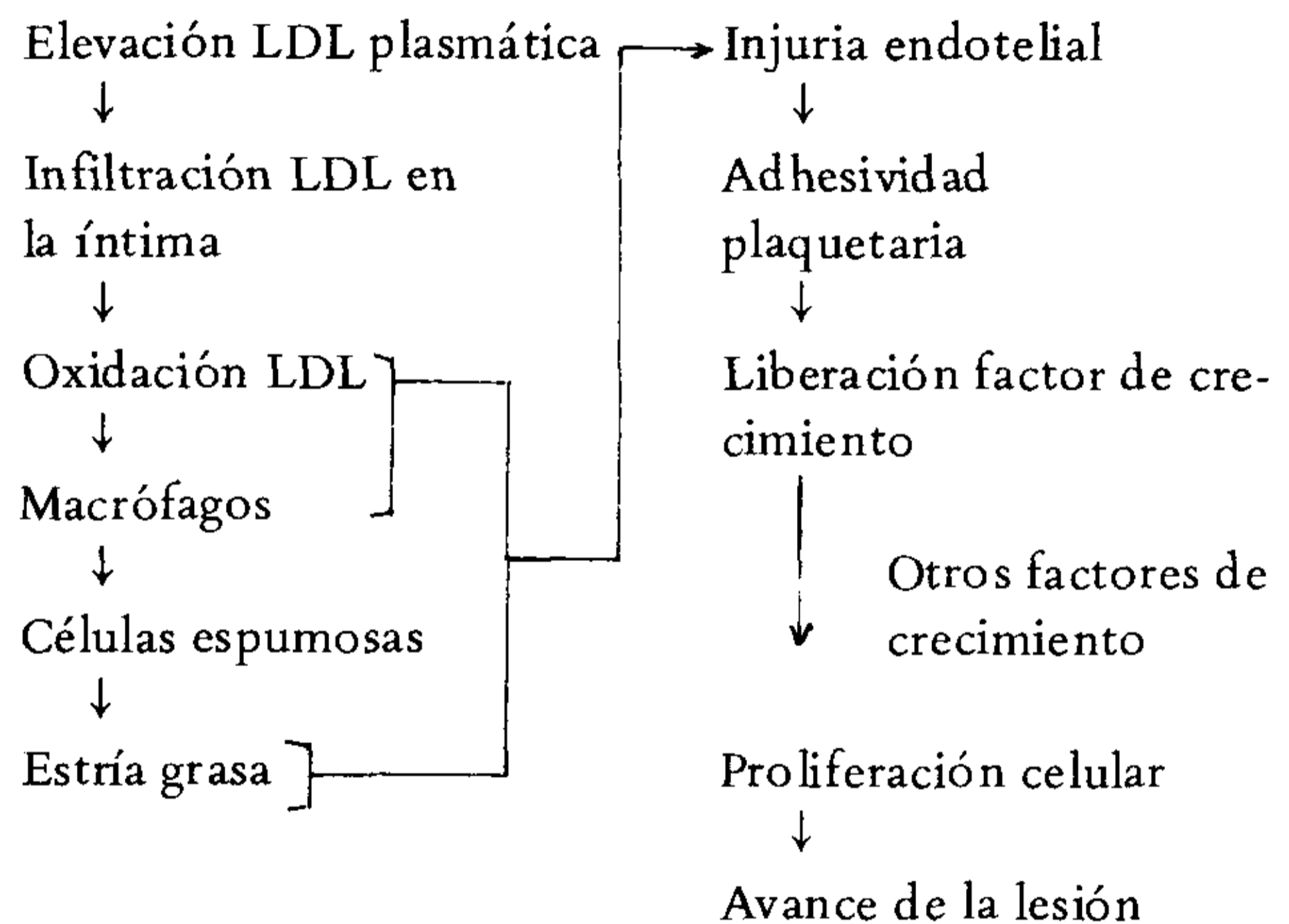
Goldstein y colaboradores⁹ observaron que la acetilación química convierte a las LDL en una forma reconocida específicamente por monocitos-macrófagos, que es captada más fácilmente que las LDL nativas. Dicha toma es atribuida a un nuevo receptor específico, que es el acetil LDL receptor.

Al producirse modificaciones en el metabolismo de las LDL, a nivel del endotelio se transforman en LDL oxidadas por acción de los radicales libres, oxidación que creemos se realiza durante el pasaje de la sangre a través

del tejido pulmonar; las LDL oxidadas son más activas y citotóxicas que las LDL nativas.¹⁰ Esta alteración del metabolismo de las LDL nativas en la pared arterial (subendotelio), ocasionada por los radicales libres y lipoperóxidos, provoca la rotura de la membrana endotelial, injuria que estimula a su vez la agregación plaquetaria, con lo cual continúa el proceso de la aterogénesis. Lo que se inició como un fenómeno similar a la inflamación, se transforma posteriormente en un proceso degenerativo.

Para algunos autores, la oxidación de las LDL probablemente no ocurre en la circulación, sino dentro de la pared arterial, pues opinan que si la oxidación fuera generada en el plasma, podría ser destruida por el hígado.^{11,12} Pero de acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo y con los resultados obtenidos, la oxidación se haría en el pulmón, y así las moléculas de LDL oxidadas que circulan en la sangre postpulmón, altamente citotóxicas, lesionarían el endotelio arterial antes de su destrucción hepática.

Relación entre la hipótesis de la infiltración de lípidos y la hipótesis de la injuria endotelial^{13,14}



SUMMARY

Oxygen free-radicals are apparently involved in the pathogenesis of ageing and in the mechanisms that lead to atherosclerosis. Oxygen free-radicals are chemical species that have one unpaired electron in their external layer. Active oxygen is a concept that includes several oxygen-derived chemical species that are biologically active, such as superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and singlet oxygen. They are reactive, unstable, and have a short mean life. Lipoperoxidation is produced as result of the action of oxygen, ozone and radiation or of numerous toxic substances on the polyunsaturated fatty acids of the biological membranes. The organisms that survive are the ones that have devel-

oped systems of antioxidant defense. The presence of lipoperoxides in tissues is shown by means of chemiluminescence and by the method of the 2-thiobarbituric acid in blood, which allows to dose malondialdehyde a by-product of lipoperoxidation. Free-radicals damage the cell structures, membrane and mitochondria, denature lipoproteins and nucleic acids and alter the enzymatic systems and hemostatic factors. Iron and copper accelerated the process of lipoperoxidation. This paper reports on the levels of malondialdehyde in blood coming from the right ventricle (prelung) and from left ventricle (postlung) in patients undergoing hemodynamic tests. The role of lung in oxidation of lipoproteins and their implications in pathogenesis of atherosclerosis is evaluated. The results show that: a) The proportion of malondialdehyde is greater in blood coming from the left ventricle than from the right ventricle. b) As blood flows through the lung must suffer an oxidation process that denatures the native LDL lipoproteins, transforming them in oxidated lipoproteins which if they are hold by macrophages that penetrate through the endotelium may contribute to the formation of atheromatous lesions. c) The increase of postlung malondialdehyde could be a direct consequence of a greater pressure of O₂ in arterial blood in relation to venous blood. It can be deduced that the arterial would be more exposed to oxidation stress than the venous bed. d) Therefore, blood flowing from the left ventricle would have more atherogenic capacity.

BIBLIOGRAFIA

1. Glavin J, Hartmann S, Clemmesen J, Jessen KE, Dam H: The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. *Acta Path et Microbiol Scandinav* 30: 1-6, 1952.
2. Mosso HE, Ibarra R, Ruggiero HA, Wikinski RW, Paglione AM, Mollerach M, Torales MR, Venticinque R: Etiopatogenia de la Aterosclerosis. Ed Universitaria de Buenos Aires, 1978.
3. Ross R, Glomset JA: The pathogenesis of atherosclerosis. *New Engl J of Med* 295: 369-377, 4240-425, 1976.
4. Majno G, Zand T, Nunnari JJ, Joris I: La conexión entre dieta y aterosclerosis: nuevas perspectivas. *Cardiovascular Medicine* 9 (1), 1982. (Tomado de *Fronteras en Cardiología*, Ciba-Geigy, vol 2, número 4.)
5. Bernheim F, Bernheim ML, Wilburn KM: The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. *J Biol Chem* 174: 257-264, 1948.
6. Bird RP, Draper HH: Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Meth Enzymol*. Ed L Parker. Academic Press Inc, London, 105: 299-305, 1984.
7. Heinecke JW, Baker H, Rosen H, Chait A: Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest* 77: 757-761, 1986.
8. Fogelman AM, Shechter L, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA: Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2214-2218, 1980.
9. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown E: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 333-337, 1979.
10. Morel DW, Di Corleto PE, Chisom GM: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoproteins in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 4: 357-364, 1984.
11. Nagelkerke JF, Havekes L, van Hinsbergh VN, van Berkel J: In vitro catabolism of biologically modified LDL. *Arteriosclerosis* 4: 256-264, 1984.
12. Steinbrecher HP, Witzum JL: Decrease in reactive amino groups during oxidation of endothelial cell modification of LDL: Correlation with changes receptor mediated catabolism. *Arteriosclerosis* 1: 135-143, 1987.
13. Steinberg MD: Metabolism of lipoproteins and their role in the pathogenesis of atherosclerosis. In: Gotto AM, Paoletti R (eds): *Atherosclerosis Reviews*, Vol 18. In: Stokes J III, Mancini M (eds): *Hypercholesterolemia: Clinical and Therapeutic Implications*. Raven Press, New York, 1988, pp 1-23.
14. Steinberg MD, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witzum JL: Beyond cholesterol. Modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl J Med* 320: 915-924, 1989.