



ISSN: 1697-090X

Inicio Home

Indice del
volumen Volume
index

Comité Editorial
Editorial Board

Comité Científico
Scientific
Committee

Normas para los
autores
Instruction to
Authors

Derechos de autor
Copyright

Contacto/Contact:



LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) OXIDADAS

Pilar Calmarza Calmarza

Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España

[mpcalmarza @ salud.aragon.es](mailto:mpcalmarza@salud.aragon.es)

Rev Electron Biomed / Electron J Biomed 2008;3:52-60

[Comentario del revisor Prof. Pilar Muñiz Rodríguez PhD.](#) Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos. España

[Comentario del revisor Victoria Valls Bellés, PhD.](#) Dpto. de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. España

RESUMEN

En los últimos años se ha consolidado la teoría oxidativa de la arteriosclerosis. En este proceso se produce el atrapamiento de ldl oxidadas en la íntima arterial.

La medida de ldl oxidadas en el laboratorio es difícil, considerándose en la actualidad la medida de isoprostanos la técnica de elección para la valoración del estrés oxidativo.

PALABRAS CLAVE: oxidación ldl, arterioesclerosis, F2 isoprostanos.

SUMMARY:

During the last years the atherosclerosis oxidative theory has been consolidated. In this process the capture of oxidized ldl particles in the arterial intima is produced.

The measurement of oxidized ldl in the laboratory is difficult. Nowadays the measurement of isoprostanos is being considered the gold standard to valorate the oxidative stress.

KEY WORDS: ldl oxidation, atherosclerosis, F2 isoprostanos

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares representan hoy en día la principal causa de muerte en los países desarrollados, siendo indiscutible el papel que desempeña la arteriosclerosis en su desarrollo.

Hasta hace no mucho tiempo se consideraba la arteriosclerosis un proceso degenerativo de la pared arterial, fundamentalmente ligado al envejecimiento y, por tanto irreversible. Posteriormente se estableció la hipótesis lipídica, que asignaba un papel central a la hiperlipidemia, al identificar el depósito de grasa en la pared de ateroma.

En la actualidad es aceptada la teoría oxidativa de la arteriosclerosis que considera la lesión arterial inicial, la estría grasa y su progresión a la placa de ateroma, íntimamente asociadas a la acumulación en macrófagos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que han sido mínimamente oxidadas¹.

Los productos de oxidación lipídica se asocian directamente con la inducción, propagación y acumulación de monocitos subendoteliales y otras reacciones asociadas con la inflamación, la cual se está revelando como un proceso fundamental en el desarrollo de la placa aterosclerótica.

Así pues, la arteriosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria crónica que se desarrolla como consecuencia del atrapamiento de lipoproteínas de baja densidad en la íntima arterial. La LDL normal no tiene propiedades inflamatorias, por ello ha de sufrir alteraciones bioquímicas para convertirla en aterogénica.

También se ha demostrado que el tratamiento de ratones con probucol (potente antioxidante) inhibe la formación y progresión de las lesiones tempranas de la arteriosclerosis, lo cual confirma el papel patogénico de LDL oxidadas en la aterogénesis.

La placa ateromatosa está constituida por un núcleo lipídico, una cubierta fibrosa y un importante infiltrado linfocitario y de células mononucleares. Se desarrolla en varias etapas:

- Disfunción endotelial y formación de la estría grasa.
- Progresión de la lesión, aumentando el contenido lipídico y el infiltrado celular.
- Complicaciones de la placa, con hemorragia, necrosis, calcificación, ulceración o trombosis, y desarrollo de manifestaciones clínicas.

La estría grasa aparece ya en la infancia y está formada por macrófagos subendoteliales cargados de lípidos, células musculares lisas (CML) y, en menor proporción linfocitos T, lípidos extracelulares, proteoglicanos, colágeno y fibras elásticas. Este proceso se inicia por un trastorno en la función endotelial tras algún tipo de agresión, de manera que se altera su permeabilidad y el tránsito de sustancias entre la luz y la pared vascular.

Las células endoteliales, en condiciones normales permiten el intercambio de macromoléculas entre la luz y la estructura de la pared vascular para la nutrición de la capa media, captando entre otras sustancias las LDL circulantes.

El receptor de LDL no modificado es saturable, por lo que no permite una acumulación excesiva de lípidos en la pared vascular²⁻⁴. Sin embargo, cuando aumentan los niveles plasmáticos de LDL, también se incrementa su presencia en la pared vascular, donde se oxidarán en contacto con los radicales libres de oxígeno, liberados por las células endoteliales, los macrófagos y las células musculares lisas - CML-^{3,5}.

Los monocitos se activan y se convierten en macrófagos, los cuales expresan receptores para VLDL y receptores de LDL modificada (también llamados receptores "scavenger" o "basurero"). Estos receptores reconocen las LDL modificadas por oxidación, acetilación o peroxidación, y no presentan contrarregulación.

Los macrófagos y las CML activados fagocitan las LDL modificadas, hidrolizan y reesterifican el colesterol, almacenándolo en gotitas lipídicas, transformándose así en las llamadas células espumosas^{5,6}. El acúmulo de estas células ricas en contenido lipídico constituye la estría grasa.

Las células espumosas continúan acumulando lípidos hasta que se lisan, con lo que liberan su contenido al espacio extracelular. La LDL oxidada en concentraciones bajas y medias estimula la proliferación celular⁷ y las plaquetas activadas liberan factor plaquetario 4 (PF4), que bloquea la captación de LDL por su receptor celular, acumulándose una mayor concentración de LDL en el espacio extracelular, lo cual favorece su oxidación.

El PF4 se une a LDL oxidada, y el complejo PF4/LDL ox se une a proteoglicanos de la superficie celular y es interiorizado por macrófagos, CML y células endoteliales. El PF4 tiene también propiedades quimiotácticas para monocitos e induce su diferenciación a macrófagos⁸. El proceso inflamatorio perpetúa y amplifica el proceso aterogénico.

La LDL oxidada en concentraciones elevadas tiene un efecto citotóxico que favorece la apoptosis de CML, macrófagos y linfocitos T, especialmente en la zona subendotelial, la cápsula fibrosa y los hombros de la placa^{5, 8, 9-12}, lo cual disminuye la resistencia y predispone a la ruptura de la placa.

Asimismo, las células apoptóticas y los restos celulares liberan citocinas citoplasmáticas, las cuales tienen un efecto quimiotáctico sobre otros monocitos circulantes, perpetuando así los fenómenos inflamatorios intraplaca.

METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD

Las LDL humanas se definen como una población de lipoproteínas que se aíslan por ultracentrifugación en un rango de densidades entre 1.019-1.063 Kg /l. Cada partícula LDL contiene 1600 moléculas de esteres de colesterol y 170 moléculas de triglicéridos que forman un core lipídico central. Este core está rodeado por una monocapa de 700 moléculas de fosfolípidos, principalmente lecitina y pequeñas cantidades de esfingomielina y lisolecitina así como 600 moléculas de colesterol libre. Embebida en la capa exterior hay una proteína grande, llamada apolipoproteína B₁₀₀.

Aparece como consecuencia de la metabolización plasmática de VLDL e IDL. Es una partícula muy rica en colesterol, siendo la

responsable del transporte del 70% del colesterol en suero. Su papel principal consiste en la liberación del colesterol procedente del hígado a las células de los tejidos periféricos. Las LDL son captadas por las células hepáticas y de tejidos periféricos mediante el receptor específico apo B/E o receptor de LDL, el cual reconoce las apo B₁₀₀.

En este proceso se forman endosomas que, al fusionarse con lisosomas, provocan la hidrólisis de la apo B₁₀₀ y del colesterol esterificado¹³, permitiendo así la captación celular del colesterol. El colesterol libre procedente de las LDL es de nuevo esterificado por la acción de la enzima ACAT (acil CoA -colesterol-aciltransferasa) para poder ser almacenado en las células.

Un exceso de colesterol libre internalizado produce tres respuestas en la célula:

- 1.- Inhibe la síntesis de HMG CoA reductasa (enzima reguladora de la síntesis de colesterol), con la finalidad de no sintetizar más colesterol de novo.
- 2.- Activa la enzima ACAT (Acil CoA-colesterol-aciltransferasa), permitiendo así el almacenamiento del exceso de colesterol en forma de esteres de colesterol.
- 3.- Inhibe la síntesis de receptores apo B/E, siendo captadas menos LDL y aumentando su concentración plasmática.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son las encargadas en última instancia de transportar el colesterol restante hacia el hígado para su eliminación, principalmente en forma de ácidos biliares.

El principal órgano responsable de la degradación de LDL es el hígado, que procesa entre el 50-60% de colesterol que se encuentra en plasma en forma de LDL.

MODIFICACIONES OXIDATIVAS DE LDL

La arteriosclerosis constituye una alteración importante del metabolismo de los lípidos en la íntima arterial, donde la concentración de LDL es muy elevada, debido a que el colágeno y los proteoglicanos forman una barrera de permeabilidad análoga a la endotelial que mantiene a la LDL dentro de la íntima por mucho tiempo (su vida media es de semanas a meses frente a los dos o tres días de semivida plasmática).

La oxidación de LDL es un proceso mediado por radicales libres, que produce numerosos cambios estructurales, todos los cuales dependen de un evento inicial común: la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en las partículas LDL.

Los radicales libres son especies reactivas de oxígeno capaces de existir independientemente con uno o más electrones no apareados en su último orbital y que para estabilizarse reaccionan con otras moléculas, modificándolas. Entre los radicales libres se incluyen los derivados del oxígeno, cuya reducción monovalente da lugar al ión superóxido (O₂⁻) y su reducción divalente da lugar a H₂O₂, que puede generar el más reactivo de los radicales libres: el radical hidróxilo (HO·).

Son moléculas muy inestables y como consecuencia muy reactivas dañando de forma directa el DNA, lípidos y proteínas y pueden ser un rasgo prominente de muchas enfermedades agudas y crónicas entre las que se encuentra el cáncer y la enfermedad cardiovascular. Asimismo, los radicales libres al inducir la peroxidación de los lípidos de la membrana, alteran las propiedades de la misma, pudiendo inactivar los receptores de membrana o las enzimas que pueden alterar la función celular normal.

Además la LDL oxidada por sí misma se ha identificado como un potente estímulo para la formación vascular de radicales de oxígeno originándose así un círculo vicioso. Varios estudios implican al anión superóxido como agente que promueve la oxidación de los lípidos de LDL, mediada por las células musculares lisas y los monocitos-macrófagos.

El óxido nítrico y el peroxinitrito son otros oxidantes relevantes para la oxidación de LDL producidos por las células endoteliales y los macrófagos. Ciertas enzimas celulares tales como lipoxigenasa¹⁴, que convierte los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en hidroperóxidos pueden también oxidar LDL. Asimismo, la mieloperoxidasa secretada por los fagocitos, y los productos originados tras su acción (ácido hipocloroso y el radical tirosil) promueven también la oxidación de las lipoproteínas. Existen por tanto numerosos mecanismos de oxidación de LDL. In vitro, las LDL pueden ser modificadas oxidativamente en presencia de metales de transición, tales como hierro y cobre.

La oxidación de LDL se inicia por las especies reactivas de oxígeno que sustraen un hidrogenión (H⁺) de un doble enlace en los PUFA, lo cual se sigue de una reordenación molecular que da lugar a la formación de dobles enlaces conjugados, conocidos como dienos conjugados (CD)¹⁵. El contenido total de ácidos grasos unidos a la partícula de LDL es de 2700, la mitad de los cuales son ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido linoleico. Durante esta primera fase de iniciación de la oxidación de LDL, ésta se detiene debido a la presencia de antioxidantes endógenos contenidos en la partícula LDL.

Posteriormente se produce una segunda fase rápida de propagación, cuando los antioxidantes ya se han consumido e implica la abstracción de otro hidrogenión (H⁺) por el radical peroxy (LOO·) de otro PUFA, produciendo la formación de los hidroperóxidos lipídicos. También se forman lisofosfolípidos.

La fase de propagación se sigue de una fase de descomposición o degradación durante la cual se rompen los dobles enlaces formándose aldehídos. Los principales aldehídos formados son: malonaldehído (MDA), 4 hidroxinoneal (HNE) y hexanal, los cuales pueden reaccionar con los grupos amino de apo B₁₀₀. Además el colesterol de las LDL puede oxidarse a oxisteroles como 7

cetocolésterol¹⁶.

Durante el proceso de oxidación de LDL también se producen cambios en su mitad proteica^{15,17}. Se producen roturas del esquema peptídico y la derivatización de algunos aminoácidos (el grupo amino de la cadena lateral de lisina puede condensarse con aldehídos como 4 hidroxinonenol o dialdehído malónico).

Tras la oxidación se produce un incremento en la carga negativa de las partículas LDL posiblemente debido a la formación de bases de Schiff entre grupos amino cargados positivamente y grupos aldehído, y entonces son reconocidas por los receptores scavenger de los macrófagos presentes en la íntima media de las arterias. La neutralización de los residuos lisina positivamente cargados inhibe el reconocimiento por los receptores de LDL. La proteína Apo B₁₀₀ sufre una escisión oxidativa que conduce a su fragmentación.

Otra modificación reconocida recientemente puede ser la producción local de ácido hipocloroso por las células inflamatorias de la placa con la consiguiente aparición de radicales clorados como las proteínas clorosil.

La oxidación de las partículas LDL dependerá de la cantidad de sustancias antioxidantes tanto de origen endógeno, sintetizadas por el propio organismo como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión reductasa (GPX) o la paraoxanasa (POX), como de origen exógeno provenientes de la dieta como vitamina E, C, beta carotenos y polifenoles. También dependerá de las características de las partículas LDL: a mayor tamaño y menor densidad de la partícula, mayor resistencia a la oxidación¹⁸. Asimismo, presentan mayor susceptibilidad las partículas con mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados (18) así como las partículas glicosiladas.

La oxidación de LDL ocurre principalmente dentro del microambiente de la íntima arterial y las células que participan directamente en la formación de la placa de ateroma son los monocitos, que al madurar en el espacio subendotelial se transforman en macrófagos. En el estado de macrófagos adquieren la capacidad de reconocer e internalizar la LDL oxidada, a través de los receptores scavenger.

Las LDL oxidadas son pobremente degradadas en los lisosomas, por lo que tienden a acumularse en el citoplasma, a diferencia de las LDL nativas. Esto lleva a una sobrecarga de colesterol intracelular, el cual resulta citotóxico y conduciría a la lisis celular. El macrófago se defiende reestirificándolo con ácidos grasos por medio de la enzima Colesterol Acil Transferasa, así lo disuelve junto con triglicéridos y fosfolípidos en vacuolas y se produce la formación de células espumosas, desarrollándose así la estricta grasa.

A diferencia del receptor de LDL nativa (R-LDL), la actividad del receptor scavenger (RS) no es inhibida por altos niveles de colesterol intracelular, lo cual añadido a una ineficiente degradación contribuye a la acumulación masiva de colesterol¹⁹. Se ha clonado y caracterizado una familia de receptores scavenger, que incluyen los RS desde la clase A hasta la F y que tienen la capacidad de unir LDL oxidada en las células animales²⁰.

Los principales grupos de receptores scavenger son el tipo A que incluye dos isoformas que poseen similares propiedades de unión, designadas como clase A (SRA-I y SRA-II) respectivamente y el tipo B formado por SRB-I, CD36, y CLA-1. El receptor CD36 es uno de los mejor estudiados y corresponde a una glicoproteína de membrana que une específicamente LDL oxidada. Un cuarto tipo de receptor es la proteína macrosialina de macrófagos de ratón (homóloga a CD68 humana) y pertenece también a la clase B. Recientemente, se ha descubierto un nuevo receptor (LOX-1) que se expresa en células endoteliales y también en otras células presentes en la placa ateromatosa²¹ cuya expresión puede ser suprimida por lovastatina.

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LDL OXIDADADA

La LDL oxidada produce varios efectos biológicos que pueden contribuir a la iniciación y progresión del proceso de arteriosclerosis. Los antioxidantes tales como probucol, alfa tocoferol, hidroxitolueno butirato (BHT) y N, N' difenilfenil enediamina se ha demostrado que disminuyen el grado de oxidación de LDL y las lesiones ateromatosas en los modelos animales de arteriosclerosis.

Durante la oxidación de LDL, inicialmente se forman en el espacio subendotelial LDL mínimamente modificadas, las cuales pueden inducir la adhesión de leucocitos a la superficie de la célula endotelial arterial (gracias a su interacción con un receptor del tipo VCAM-1) y la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y el factor estimulante de colonias de los macrófagos (M-CSF) por el endotelio²². Esto produce el reclutamiento de los monocitos hacia el endotelio y la migración hacia el espacio subendotelial, donde M-CSF promueve su diferenciación de monocitos a macrófagos tisulares^{23,24}.

Los macrófagos a su vez pueden modificar LDL-MM a formas más oxidadas. LDL oxidada no es reconocida por el receptor para LDL normales y en cambio es reconocida por el receptor scavenger en los monocitos-macrófagos y su captación, como ya dijimos no es regulada por el contenido de colesterol intracelular. Esto produce acumulación de colesterol en los macrófagos y formación de células espumosas.

Además de las moléculas de adhesión de leucocitos M-CSF y MCP-1, y NF-kb (implicado en la transcripción de un importante número de genes involucrados en el proceso inflamatorio), las LDL oxidadas pueden estimular la secreción de diversas interleucinas, a partir de los macrófagos, entre las cuales se encuentran:

- Interleucina-1 (IL-1)²⁵. IL-1b induce la proliferación y adhesividad endotelial a los leucocitos²⁶. Se ha encontrado en las lesiones arterioscleróticas mRNA de IL-1b.
- Factor de necrosis tumoral TNFalfa, el cual junto con IL-1 favorece la producción local de factores de crecimiento (de

origen plaquetario y trofoblástico) que intervienen en la evolución y complicación de la placa. El último es un potente inductor de NF- κ B.

- Interferón (IFN) derivado de Linfocitos T activados inhibe la proliferación de músculo liso y la síntesis de formas intersticiales de colágeno. Estas citocinas amplían los fenómenos inflamatorios locales activando a los linfocitos T que participan en la cascada inflamatoria, con otras muchas interleucinas como IL-6.

Se ha demostrado que la interacción de PCR con LDL oxidada incrementa la unión/captación de LDL oxidadas o nativas por los macrófagos.

El papel de *Clamidia Pneumoniae* en la arteriosclerosis no se conoce bien pero parece ser que la infección por Clamidia aumenta la acción inflamatoria de las LDL oxidadas en la pared vascular, conduciendo a necrosis celular más que a apoptosis.

En general, los efectos biológicos que produce LDL oxidada pueden describirse como sigue:

- Es quimiotáctica para los monocitos y es un inhibidor potente de la movilidad de los macrófagos, promoviendo así la retención de los mismos en la pared arterial, y el progresivo infiltrado inflamatorio en la misma.
- Asimismo, pueden afectar negativamente la cascada de la coagulación induciendo la síntesis y expresión del factor tisular y del inhibidor del activador del plasminógeno-1²⁷. Esto hace que se reduzca la función fibrinolítica y que se favorezca el estado protrómbotico.
- De igual modo pueden alterar la expresión de genes inducibles tales como el gen que controla la síntesis del factor tumoral de necrosis y el del factor de crecimiento derivado de plaquetas²⁸.
- Inhibe el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) que media la vasorelajación²⁹.
- Otra propiedad aterogénica de LDL modificada es su inmunogenicidad. Las LDL modificadas por MDA estimulan la formación de autoanticuerpos y los agregados de LDL son internalizados por los macrófagos vía receptores Fc³⁰. Esto puede promover la acumulación posterior de colesterol. La presencia de autoanticuerpos frente a LDLox se ha correlacionado positivamente con la progresión de la arteriosclerosis.
- Reduce la síntesis de NO e induce la disfunción endotelial y la vasoconstricción.
- La producción normal de NO por el endotelio como respuesta a factores neurohumorales y dependientes del flujo sanguíneo induce vasodilatación e inhibición de la activación y agregación plaquetaria y refuerza la barrera protectora de la pared vascular.
- Cuando disminuye la producción de NO, aumenta la adhesividad y la migración celular a través del endotelio y facilita la aparición de "huecos" en la superficie interna vascular a causa de la apoptosis de las células endoteliales.
- La LDL oxidada también interfiere con el aclaramiento de restos celulares por los macrófagos a través del bloqueo del receptor fosfatidilserina, presente en la superficie de los macrófagos.
- Es citotóxica y forma nuevos epítomos en las LDL desencadenando la reacción inflamatoria mediada por los linfocitos T que las reconocen como extrañas. Esto puede promover la disfunción endotelial y la evolución de la estría grasa hacia una lesión más avanzada
- La formación de O₂(-) inducida por las LDL oxidada tiene un fuerte impacto en el remodelado de los tejidos, produciendo crecimiento celular (proliferación celular o hiperplasia o muerte celular apoptótica).
- El colesterol oxidado también produce daño en las células endoteliales.

DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

La LDL oxidada es una lipoproteína proaterogénica que se acumula en la pared vascular y contribuye a la patogénesis de la disfunción vascular temprana en el desarrollo de la arteriosclerosis.

Las defensas celulares antioxidantes son inadecuadas para inactivar completamente las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) generadas, debido a la producción excesiva de ROS/RNS o a la pérdida de defensas antioxidantes o por ambos.

Existen varios marcadores in vitro de estrés oxidativo/ nitrosativo, incluyendo ROS/RNS, pero la mayoría de ellos son de limitado valor in vivo pues les falta sensibilidad y/o especificidad o requieren métodos invasivos. Debido a que los productos moleculares formados a partir de la reacción ROS/RNS con las biomoléculas son más estables que ROS/RNS, habitualmente medimos la concentración de sus productos diana, incluyendo la peroxidación lipídica y los productos finales de la oxidación de proteínas³¹⁻³⁴.

Anteriormente se medía indirectamente el estrés oxidativo como susceptibilidad de LDL a la oxidación así como los autoanticuerpos producidos frente a las LDL oxidadas.

Las LDL se aíslan del plasma en EDTA (1 g/l) por ultracentrifugación secuencial en solución de BrNa o por centrifugación vertical en gradiente. Posteriormente para la oxidación se incubaba el plasma a 37° C en PBS durante 8 horas con 5 micromol/l de cobre. Los productos de peroxidación lipídica aumentan sustancialmente entre 30 y 60 minutos, tras el inicio de la incubación y alcanza un máximo a los 120 minutos³⁵. La relación de absorbancia a 232 nm/ absorbancia a 203 nm es un indicador significativo de la oxidación de LDL.

Además, la peroxidación lipídica genera una variedad de productos finales de descomposición estables, principalmente aldehídos reactivos alfa, beta insaturados tales como malonaldehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 2-propenal (acroleína)³⁶⁻³⁷ e isopropanol^{38,39}, los cuales pueden medirse en plasma y orina, como índice indirecto de estrés oxidativo. Sin embargo, tanto la medida de lípidos, hidroxiácidos grasos o MDA y HNE en orina pueden estar influidos por la dieta y no deben utilizarse como índice de peroxidación lipídica a no ser que se controle estrictamente la dieta.

Uno de los principales problemas para su determinación *in vivo* es que la oxidación de las lipoproteínas ocurre en el interior de la pared arterial más que en la circulación. Incluso si se produce en ésta, la medición de las concentraciones de estas lipoproteínas modificadas puede ser difícil y no refleja la extensión de la oxidación que se produce en la pared arterial. Además, las lipoproteínas modificadas se aclaran rápidamente de la circulación por los receptores scavenger y por ello su permanencia en plasma es corta y las concentraciones son demasiado bajas para su medida.

También, la generación de anticuerpos monoclonales que reconocen distintos epítomos específicos de oxidación ha permitido el desarrollo de ensayos específicos y sensibles para la medida de LDL circulantes en plasma.

El test que se utiliza con mayor frecuencia para la determinación de la oxidación de LDL en plasma es el que mide las sustancias reactivas al ácido barbitúrico (TBARS)⁴⁰. En este test el cromógeno se forma por la reacción de una molécula de malonaldehído (MDA) con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA). Se calienta la muestra con TBA bajo condiciones ácidas y se lee el complejo MDA-TBA formado a 532 nm. Esta determinación no es específica para MDA, puesto que los azúcares y los aminoácidos pueden también formar estos complejos y además se forma una cantidad significativa de peróxidos durante el calentamiento. El ensayo implica precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético y para aumentar la sensibilidad el complejo MDA/TBA puede extraerse en un solvente orgánico (butanol) y medirlo fluorimétricamente.

También se ha utilizado con frecuencia la medida de LDL oxidadas circulantes basada en la reacción de estas partículas con distintos anticuerpos. Algunos autores hallaron un anticuerpo monoclonal que reaccionaba específicamente con LDL oxidada pero no con LDL nativa, LDL modificada por MDA, acetil LDL o LDL glicada. Usando este anticuerpo en combinación con un anticuerpo anti apo B, Toshima y colaboradores desarrollaron un método ELISA que mide LDL oxidada en plasma⁴¹.

Holvoet et al idearon otra técnica ELISA que mide LDL oxidada en plasma, en la que utilizaban anticuerpos monoclonales que tenían alta afinidad para las lisinas de apolipoproteína B modificadas con MDA. Pero estos análisis no están estandarizados y existen algunos problemas como la naturaleza de la oxidación de la partícula LDL, los lugares de oxidación que deben medirse y los métodos de obtención de los anticuerpos.

La medida de antioxidantes como alfa tocoferol, retinol y 5 carotenoides (luteína, criptoxantina, licopeno y alfa4 beta caroteno) también es otro método que puede emplearse para la determinación de estas partículas y puede llevarse a cabo mediante HPLC en fase reversa. La determinación simultánea de estos antioxidantes se realiza tras precipitación con etanol y extracción con hexano. También puede determinarse la actividad de enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

Existen otros muchos métodos para su determinación entre los que cabe destacar la medida de las proteínas carboniladas, las cuales se generan por la oxidación de muchas cadenas laterales de aminoácidos. Es el marcador de oxidación proteica severa más utilizado y se han desarrollado varios ensayos para su medida.

En la actualidad la medida de F2 Isoprostanos, debido a la estabilidad de estos compuestos, se considera el mejor método para determinar el estrés oxidativo. Los F2 Isoprostanos son compuestos que contienen un anillo F prostano (de tipo F2 prostaglandinas) y son generados *in vivo* mediante radicales libres por acción no enzimática. Se produce la peroxidación de ácido araquidónico esterificado y se secreta en la circulación, después actúan las fosfolipasas antes de eliminarse en orina como isoprostanos libres. Su vida media es muy corta, son antagonistas de prostaglandinas y existen diversos métodos para su cuantificación.

El inconveniente es que una vez liberados en la circulación son rápidamente metabolizados y eliminados. La espectrometría de masas es el gold standard para determinar los F2 Isoprostanos, presenta alta sensibilidad y especificidad (detecta concentraciones del orden de picogramos), pero también se están estudiando inmunoensayos sobre todo por su bajo coste y su sencillez.

Se ha de distinguir entre la fracción libre y la esterificada, la fracción esterificada se hidroliza para dar lugar a la fracción libre. Frecuentemente se miden en orina (método no invasivo) en la cual no se forman artefactualmente por autooxidación y son estables y no hay una variabilidad individual significativa en la concentración urinaria de isoprostanos en las personas sanas.

Así pues la medida recomendada para la determinación del estrés oxidativo es la determinación de Isoprostanos, los cuales presentan las siguientes características:

- Son químicamente estables.
- Son productos específicos de peroxidación.
- Se forman *in vivo*.
- Están presentes en cantidades detectables en todos los tejidos normales y fluidos biológicos, por lo que podemos conocer un rango de normalidad.
- Aumentan con la injuria oxidativa.
- No se afectan por el contenido lipídico de la dieta.
- Representan el mejor índice del estatus de estrés *in vivo* en humanos.

REFERENCIAS

- 1.- Witzum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994; 344: 793-795.
- 2.-Penn MS, Sidel GM, Chisolm GM. Relative significance of endothelium and internal elastic lamina in regulating the entry of macromolecules into arteries *in vivo*. *Circ Res* 1994; 74: 74-82.

- 3.- Steinberg D, Lewis A. Conner memorial lecture: oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95: 1062-1071.
- 4.- Fuhrman B, Judith O, Keidar S, Ben-Yaish L, Kaplan M, Aviram M. Increased uptake of LDL by oxidized macrophages is the result of an initial enhanced LDL receptor activity and a further progressive oxidation of LDL. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 34-46.
- 5.- Kaplan M, Aviram M. Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxanasa. *Clin Chem Lab Med* 1999, 37: 777-787.
- 6.- Mitchinson MJ. The new face of atherosclerosis. *Br J Clin Pract* 1994; 48: 149-151.
- 7.- Chatterjee S. Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Moll Cell Biochem* 1992; 111: 143-147.
- 8.- Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, Kowalska MA, Bdeir K, Leitersdorf E et al. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low density lipoprotein to vascular wall cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 6187-6193.
- 9.- Isner JM, Kearney m, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and reestenosis. *Circulation* 1995, 91: 2703-2711.
- 10.- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657-671.
- 11.- Han DKM, Handenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Lian G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 1995; 147: 267-277.
- 12.- Björkerud S, Björkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells) and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 1996; 149: 367- 380.
- 13.- Mathews CK, Van Holde KE. Metabolismo lipídico I: Ácidos Grasos, Triglicéridos y Lipoproteínas. En *Bioquímica. Mac. Graw- Hill Interamericana* 1998; 693-696.
- 14.- Hogg N, Darley-Usmar DM, Graham A, Moncada S. Peroxynitrite and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 358-362.
- 15.- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in the oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:341-390.
- 16.- Kritharides L, Jessup W, Gifford J, Dean RT. A method for defining stages of LDL oxidation by separation of cholesterol and cholesterol ester oxidation products using high pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 1993; 213: 79-89.
- 17.- Parthasarathy S, Rankin SM. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Prog Lipid Res* 1992; 31: 127-143.
- 18.- Beard CM, Barnard J, Robbins D, Ordovas JM, Shafer EJ. Effects of diet and exercise on qualitative and quantitative measures of LDL and its susceptibility to oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 201-207.
- 19.- Hoppe G, O'Neil J, Hoff H. Inactivation of lysosomal proteases by oxidized low density lipoprotein is partially responsible for its poor degradation by mouse peritoneal macrophages. *J Clin Invest* 1994; 94: 1506-1512.
- 20.- De Vries HE, Ronken E, Reinders JH, Buchner B, Van Berckel TJC, Kuiper J. Acute effects of oxidized low density lipoprotein on metabolic responses in macrophages. *FASEB J* 1998; 12: 111-118.
- 21.- Draude G, Hrbotocky N, Lorenz RL. The expression of lectin like oxidized low density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down regulation by lovastatina. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 383-386.
- 22.- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 1995; 91 : 2488-2496.
- 23.- Parra Pallares S, Albaladejo Oton MD, Martínez Hernández P. Modificaciones cualitativas de las lipoproteínas. Implicaciones fisiopatológicas. *An Med Intern* 2000, 17:317-323.
- 24.- Ross R, Fuster V. La patogenia de la arteriosclerosis. En: Fuster V, Ross R, Topol EJ editores. *Aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria*. Barcelona: Springer- Verlag Ibérica S. A.; 1997; 489-508.

- 25.- Thomas CE, Jackson RL, Ohlweiler DF, Ku J. Multiple lipid oxidation products in LDL induce interleukin 1-b release from human blood mononuclear cells. *J Lipid res* 1994; 35: 417-427.
- 26.- Libby P, Hansson GK. Involvement of the human immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest* 1991; 64: 5-15.
- 27.- Latron Y, Chautan M, Anfosso F, Alessi MC, Nalbhone G, Lafont H, et al. Stimulating effect of oxidized LDL on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1991, 11. 1821-1829.
- 28.- Hamilton TA, ma GP, Chilsom GM. Oxidized LDL suppresses the expression of tumor necrosis factor alpha mRNA in stimulated murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1990; 144: 2343-2450.
- 29.- Ohgushi M, Kugiyama K, Fukunaga K, Murohara T, Sugiyama S, Miyamoto E, et al. Protein Kinase C inhibitors prevent impairment of endothelium-dependent relaxation by oxidatively modified LDL. *Arterioscler Thromb* 1993; 13. 1525-1533.
- 30.- Gisinger C, Virella GT, Lopes Virella MF. Erythrocyte bound LDL immune complexes lead to cholesterol accumulation in human monocyte derived macrophages. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 59: 37-52.
- 31.- Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell g, Lungarella G, et al. Proteins as biomarkers of oxidative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24: 55-99.
- 32.- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231-255.
- 33.- Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol* 2000; 99: 15-24.
- 34.- Pryor WA. *Bioassays for oxidative stress status (BOSS) 2001: 286 pp Elsevier Science BV Amsterdam.*
- 35.- Okada M, Ito Y, Inano K, Miida T and Matsuto T. Structural changes in oxidative modification of low density Lipoprotein: Investigation using lipid peroxidation products, surface charge, and spectrophotometric patterns. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 173-178.
- 36.- Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003; 42.318-343.
- 37.- Carini M, Aldini G, Facino RM. Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. *Mass Spectrom Rev* 2004;23:281-305.
- 38.- Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trnds Pharmacol Sci* 2002; 23. 360-366.
- 39.- Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress *FASEB J* 2004; 18: 1791-1800.
- 40.- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540.
- 41.- Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, Shimamura K, Kimura j, Michishita I, Suzuki T, and Nagai R. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2243-2247.

Comentario del revisor Prof. Pilar Muñiz Rodríguez, PhD. Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos. España

En la actualidad es conocida la implicación de las LDL oxidadas en las enfermedades cardiovasculares resultado de un estrés oxidativo como consecuencia de un incremento en la formación de radicales libres. La autora del trabajo hace una revisión de las LDL oxidadas su implicación en la salud, desarrollando el mecanismo de acción a través del cual forman las placas ateroscleróticas y describiendo detalladamente los efectos biológicos de dichas lipoproteínas.

En el trabajo la autora describe y discute diferentes métodos para determinar el estrés oxidativo, centrándose principalmente en aquellos que permiten evaluar la oxidación de las LDL.

Comentario del revisor Victoria Valls Bellés, PhD.

Dpto. de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. España

En la actualidad es conocida la modificación oxidativa de las LDL por los radicales libres y su implicación en el desarrollo de la aterosclerosis. Son muchos las investigaciones dirigidas a la prevención de la oxidación de dichas moléculas con el objetivo de prevenir el desarrollo de la aterosclerosis y de las enfermedades asociadas.

El artículo es una revisión bibliográfica sobre las LDL oxidadas y su papel en la patología cardiovascular. En este trabajo, la autora hace una descripción del metabolismo de las LDL así como las implicaciones biológicas causadas por las LDL oxidadas.

Asimismo, hace una descripción de las técnicas que pueden ser utilizadas para cuantificar parámetros del metabolismo oxidativo, como son las diferentes metodologías que cuantifican daño a lípidos, y las técnicas para determinar las LDL oxidadas

Recibido: 20 de julio de 2008.

Publicado: 22 de septiembre de 2008.