# Relación entre la peroxidación lipídica y la agregación plaquetaria en pacientes ateroscleróticos

*C. Gómez Calviño* - R. Simón Carballo* - C. Coma Alfonso* - T. Sánchez de León** - E. Montero Pacheco*** R. Rodríguez Piloto****

**Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular**
**Ciudad Habana (Cuba)**

## RESUMEN

*Se estudiaron 58 pacientes hospitalizados con enfermedad arterial stenoclusiva, 32 diabéticos y 26 no diabéticos, a los que se les determinó algunos parámetros del metabolismo lipídico y función plaquetaria. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con respecto a los peróxidos lipídicos ($p<0,001$) y a los triglicéridos ($p<0,05$). En el grupo de pacientes diabéticos se encontró correlación ($p<0,05$) entre los peróxidos lipídicos y colesterol total, triglicéridos y agregación plaquetaria inducida por ADP, mientras que en el grupo de pacientes no diabéticos se encontró correlación positiva ($p<0,05$) entre los peróxidos lipídicos y el colesterol total y negativa ($p<0,05$) entre éste y el malondialdehído intraplaquetario. Como posible explicación se sugiere que las LDL modificadas por los productos de la peroxidación lipídica podrían estimular la agregación plaquetaria; y, por otro lado, que el colesterol libre acumulado en la membrana plaquetaria hasta un determinado nivel podría actuar como antioxidante, impidiendo la formación de malondialdehído intraplaquetario.*

## AUTHORS'S SUMMARY

*We studied 58 patients with arterial esteno-occlusive disease, 32 diabetics and 26 non-diabetics.*

*Some parameters of lipid metabolism and platelet function were evaluated. We show the correlations founded among these parameters and we offer a possible explanation which support this behaviour.*

## Introducción

Las lipoproteínas y las plaquetas son constituyentes de la sangre involucrados en el proceso aterosclerótico (1, 2). Una de las teorías más aceptada hoy en día con respecto a la patogénesis de la aterosclerosis es la del daño endotelial, el cual puede promover la activación plaquetaria local, la acumulación de lípidos y especialmente la acumulación de colesterol en el sitio del daño (3).

En pacientes con aterosclerosis establecida las plaquetas aparecen hiperactivas (4, 5). Tienen tiempo de vida media reducido, niveles plasmáticos elevados de proteínas específicas segregadas por las plaquetas; y adhesión, agregación y liberación plaquetaria incrementadas (5).

Los mitógenos derivados de las plaquetas, macrófagos y células endoteliales, así como los lípidos plasmáticos, pueden inducir daño endotelial y generar lesiones ateromatosas (6). Es por esto que actualmente se acepta que tanto las lipoproteínas como las plaquetas son importantes en la patogénesis de la aterosclerosis, aunque no se han alcanzado conclusiones fiables y claras al respecto.

El objetivo del presente trabajo es profundizar en el estudio de la posible influencia del metabolismo lipídico sobre la función plaquetaria, lo que pudiera ayudar al esclarecimiento de la fisiopatología de la aterosclerosis.

## Material y método

Se incluyeron en el estudio 58 pacientes hospitalizados en el Instituto de Angiología y Cirugía Vascular que padecían enfermedad arterial esteno-oclusiva, diagnosticada mediante examen hemodinámico y clínico, 30 masculinos y 28 femeninos divididos en dos grupos: 26 pacientes no diabéticos atendidos en el Servicio de Arteriología y 32 pacientes diabéticos atendidos en el Servi-

* Licenciado en Bioquímica.
** Técnica en Laboratorio Clínico.
*** Técnico Químico Analista.

cio de Angiopatía Diabética durante el año 1987.

Las muestras de sangre venosa fueron obtenidas por punción de la vena antecubital del brazo, utilizando jeringuilla plástica, en el horario de 7:00 a 8:00 a.m. después de un ayuno de 12 horas.

Ninguno de los pacientes se encontraba bajo tratamiento antiagregante plaquetario ni hipolipemiante en el momento del estudio.

Los niveles de colesterol total y del colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (colesterol-HDL) se determinaron por el método de **Abell** (7). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se midió en el sobrenadante que queda después de realizar una precipitación selectiva mediante el uso de cloruro de magnesio y ácido fosfotúngstico según **Burstein** (8).

Los niveles séricos de triglicéridos se determinaron según el método de **Graffneter** (9).

Los niveles séricos de peróxidos lipídicos se determinaron mediante el método de **Satab** (10), utilizando 1,1,3,3 tetraetoxipropano como standard.

La agregación plaquetaria inducida por ADP y epinefrina se realizó según el método de **Born** (11), utilizando plasma rico en plaquetas obtenido por centrifugación de la sangre fresca empleando como anticoagulante citrato de sodio al 3,8% (proporción 1/10, v/v), con un conteo de plaquetas de aproximadamente $250 \times 10^9$/l; y ADP y epinefrina a concentraciones finales de 2,81 uM y 12,15 uM, respectivamente.

Los niveles intraplaquetarios de malondialdehído se determinaron según el método de **Stepanauskas y Norden** (12), basados en la reacción de éste con el ácido tiobarbitúrico y utilizando 1,1,3,3 tetraetoxipropano como standard, y N-etil maleimida como bloqueador de la prostaglandin peroxidiisomerasa.

Se calcularon las medias y desviaciones standard de cada uno de los parámetros estudiados. La comparación de las medias entre ambos grupos se realizó mediante el test **t** de Student. Además, para cada grupo se calculó una matriz de correlación con el objetivo de analizar la posible correlación existente entre los parámetros estudiados.

**Tabla 1**

**Valores de la media y desviación standard de los parámetros estudiados en pacientes con enfermedad arterial esteno-oclusiva comparados con el rango normal para sujetos sanos**

| | Pacientes (X ± D.S.) | Rango Normal |
|---|---|---|
| Peróxidos lipídicos (mmol/ml suero) | 3,18 ± 0,54 | 2,46 - 4,72 |
| Colesterol total (mmol/l) | 5,63 ± 1,87 | 3,87 - 6,5 |
| Colesterol-HDL (mmol/l) | 1,22 ± 0,36 | 1,09 - 1,37 |
| Triglicéridos (mmol/l) | 1,66 ± 1,02 | 0,40 - 1,7 |
| RAD (%) | 22,03 ± 7,39 | mayor de 20 |
| Agregación plaquetaria con ADP (%) | 56,54 ± 19,73 | 31,0 - 75,0 |
| Agregación plaquetaria con epinefrina (%) | 46,34 ± 20,70 | 20,0 - 74,0 |
| MDA intraplaquetario (mmol/$10^9$ plaquetas) | 3,29 ± 2,52 | 0,17 - 2,70 |

N=58.
RAC: Relación de aterogénesis del colesterol.
MDA: Malondialdehído.

## Resultados

En la Tabla 1 se muestran los valores de la media y desviación standard de cada uno de los parámetros estudiados en el total de pacientes, comparados con los valores de referencia establecidos para humanos sanos. Se observa que todos los valores se encontraron dentro del rango normal establecido para humanos sanos.

El resultado de la comparación, entre ambos grupos, de cada uno de los parámetros estudiados del metabolismo lipídico se muestra en la Figura 1. Los niveles de peróxidos lipídicos fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes no diabéticos ($p < 0,001$), mientras que los niveles de triglicéridos resultaron significativamente mayores en el grupo de pacientes diabéticos ($p < 0,05$).

En la Figura 2 se muestra el resultado de la comparación, entre ambos grupos de pacientes, de los parámetros estudiados de la función plaquetaria. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis de correlación simple realizado entre los parámetros del metabolismo lipídico y función plaquetaria en el grupo de pacientes diabéticos. Se obtuvo correlación positiva estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los peróxidos lipídicos y colesterol total, tri-

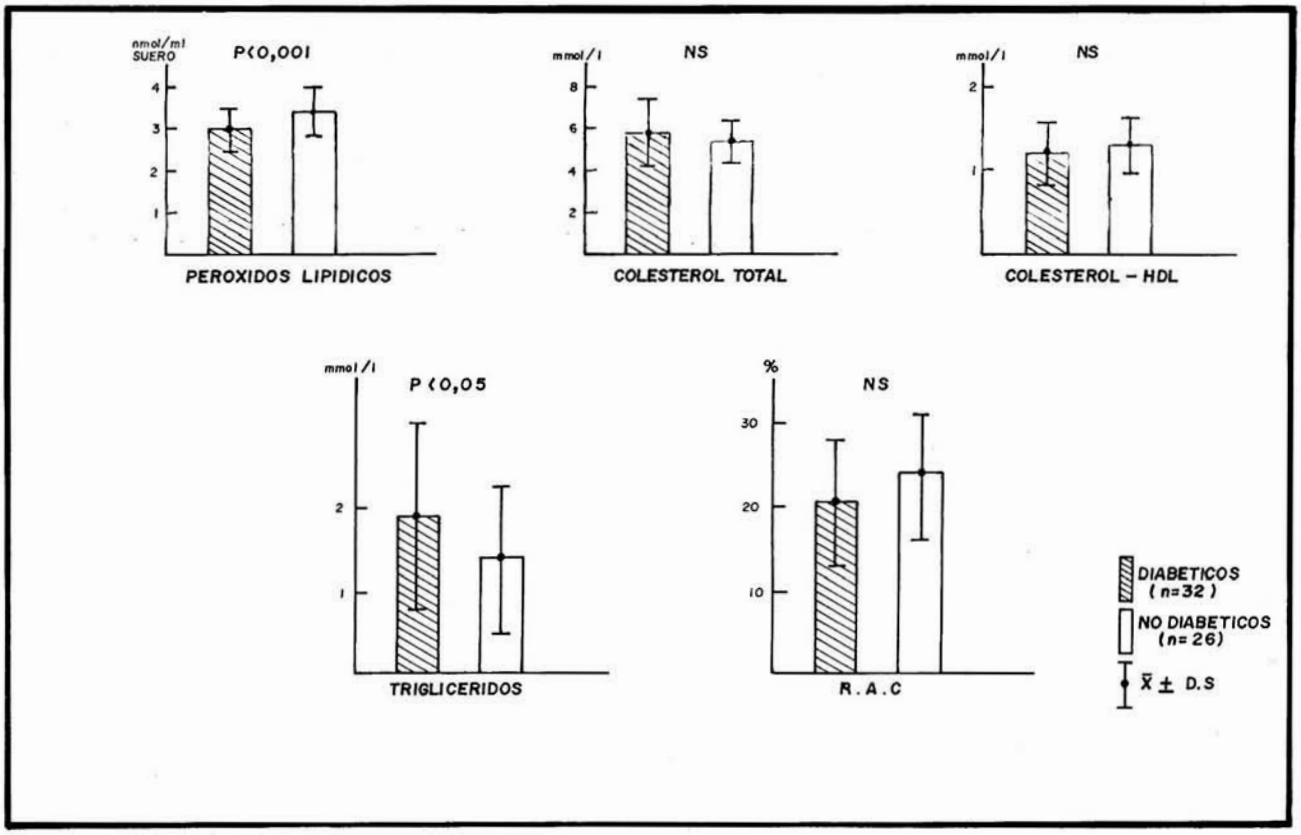


**Fig. 1 - Comportamiento de los parámetros lipídicos en ambos grupos.**

**Tabla 2**

**Análisis de correlación simple entre parámetros del metabolismo lipídico y función plaquetaria en pacientes diabéticos**

| Parámetros | r |
|---|---|
| Peróxidos lipídicos/colesterol total | 0,35487* |
| Peróxidos lipídicos/triglicéridos | 0,36646* |
| Peróxidos lipídicos/agregación plaquetaria con ADP | 0,41516* |

r: Coeficiente de correlación.
*: $p<0,05$.

**Tabla 3**

**Análisis de correlación simple entre parámetros del metabolismo lipídico y función plaquetaria en pacientes no diabéticos**

| Parámetros | r |
|---|---|
| Peróxidos lipídicos/colesterol total | 0,51465* |
| MDA intraplaquetario/colesterol total | — 0,49848* |

r: Coeficiente de correlación.
*: $p<0,05$.

glicéridos y agregación plaquetaria inducida por ADP. Sin embargo, en la Tabla 3, que refleja el mismo análisis en el grupo de pacientes no diabéticos, se observa que sólo se obtuvo correlación estadísticamente significativa ($p<0,05$) entre los peróxidos lipídicos y el colesterol total (positiva) y entre el malondialdehído intraplaquetario y el colesterol total (negativa).

## Discusión

En el presente trabajo se investigó la posible relación existente entre algunos parámetros del metabolismo lipídico y la función plaquetaria en dos grupos de pacientes con enfermedad arterial esteno-oclusiva, diabéticos y no diabéticos.

El comportamiento diferente obtenido entre ambos grupos con respecto a los niveles de peróxidos lipídicos (Figura 1) pudiera deberse a

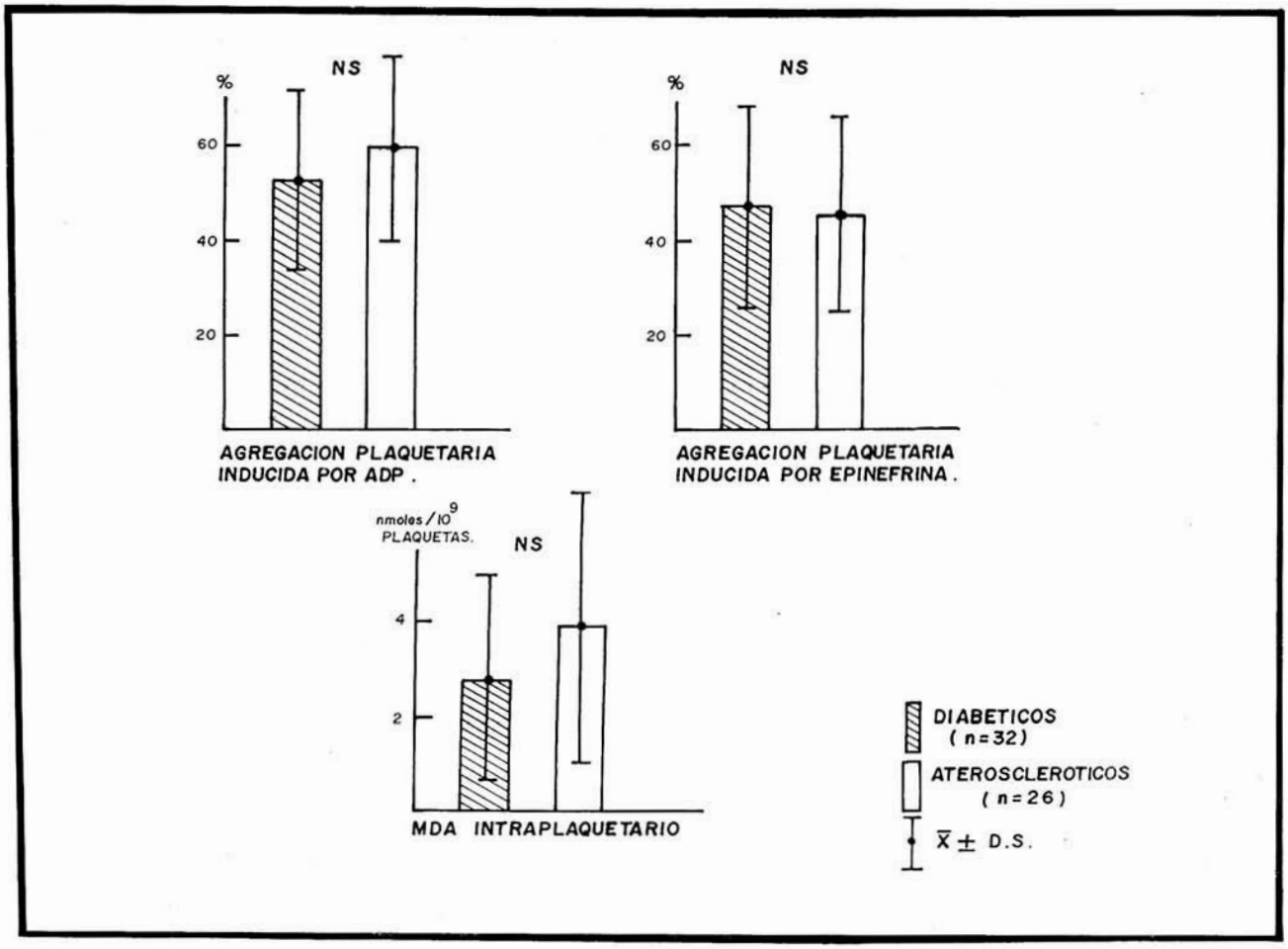


**Fig. 2 - Comportamiento de los parámetros de la función plaquetaria en ambos grupos.**

que los pacientes diabéticos incluidos en el estudio recibieron tratamiento con insulina después de su ingreso hospitalario con el objetivo de mejorar sus niveles de glucosa en sangre. Estudios en cultivo de fibroblastos normales expuestos a insulina muestran un aumento de un 25 a un 35% en la captación, consumo y degradación de LDL-$I^{125}$ debido a un aumento en el número de receptores de LDL (13); mientras que pacientes diabéticos no insulino dependientes sometidos a tratamiento con insulina muestran, a la semana, un aumento en la degradación de LDL-$I^{125}$ en monocitos frescos (14). Esta situación pudiera favorecer un menor tiempo de circulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y por ende una disminución de los procesos de peroxidación lipídica en estas fracciones lipoproteicas.

Por otro lado, se observó un comportamiento diferente entre ambos grupos con respecto a los triglicéridos séricos, encontrándose los niveles más elevados en el grupo de pacientes diabéticos. La hipertrigliceridemia es un desorden lipídico muy frecuente en este tipo de pacientes. Un aumento de los triglicéridos es considerado un factor de riesgo en las enfermedades ateroscleróticas (15). No obstante a lo antes expuesto, los valores de triglicéridos hallados en los pacientes diabéticos estudiados se encontraban en el rango normal para sujetos sanos, aunque por encima de los valores obtenidos para los pacientes no diabéticos. Esto también pudiera estar determinado por el tratamiento a que fueron sometidos los primeros para el control de su metabolismo glicémico, además de que en su mayoría eran pacientes obesos.

La correlación positiva entre los niveles de peróxidos lipídicos séricos y colesterol total y triglicéridos está en concordancia con lo reportado por **Loeper** y col. (16). **Wada** y col. (17) encontraron que los peróxidos lipídicos inhiben la actividad de la lipasa lipoproteica y por tanto la hi-

drólisis de los triglicéridos plasmáticos. Los resultados del presente trabajo apoyan lo planteado por estos autores.

Hay que destacar la correlación positiva encontrada entre los niveles de peróxidos lipídicos y la agregación plaquetaria inducida por ADP en el grupo de pacientes diabéticos. La fracción lipoproteica de baja densidad (LDL) es la que tiene mayores niveles de peróxidos lipídicos y a su vez es la principal transportadora de colesterol en el hombre. Se ha demostrado que las plaquetas poseen receptores específicos para las LDL (18) y que estas lipoproteínas incrementan la activación plaquetaria (19). En cambio, las plaquetas circulantes pueden tener la capacidad de modificar las lipoproteínas, la interacción plaqueta-LDL resulta en la formación de MDA-LDL; y recientemente se ha mostrado, in vitro, la producción de LDL modificada por las plaquetas, la cual activa a las plaquetas normales y causa acumulación de colesterol en los macrófagos (20, 21). En consecuencia, pudiera esperarse que las LDL modificadas por los productos de la peroxidación lipídica influyeran sobre la agregación plaquetaria estimulándola.

Por otro lado, la incubación de plaquetas con liposomas ricos en colesterol resulta en un incremento en el colesterol plaquetario (22). Sin embargo, las plaquetas sólo son capaces de tomar el colesterol libre del plasma y no los ésteres del colesterol (23). Por tanto, pudieran sugerirse que la elevación del colesterol sérico hasta un nivel determinado, favorecería la acumulación de colesterol libre en la membrana plaquetaria, el que actuaría como antioxidante impidiendo la formación de endoperóxidos y por consiguiente la síntesis intraplaquetaria de malondialdehído y tromboxano $A_2$. De esta manera se explicaría la correlación negativa encontrada entre el colesterol total y el malondialdehído intraplaquetario en el grupo de pacientes ateroscleróticos no diabéticos, teniendo en cuenta que los niveles de colesterol total obtenidos se encontraban dentro del rango normal.

## BIBLIOGRAFIA


1. SMALL, D. M.: Cellular mechanisms for lipid deposition in atherosclerosis. «N. Engl. J. Med.», 297: 873-877, 924-929, 1977.
2. ROSÉ, R.; GLOMSET, J. A.: The pathogenesis of atherosclerosis. «N. Engl. J. Med.», 295: 368-377, 420-425, 1976.
3. STEINBERG, D.: Lipoproteins and atherosclerosis: A look back and a look ahead. «Arteriosclerosis», 3: 283-301, 1983.
4. WEKSLER, B. B.; NACHMAN, R. L.: Platelets and atherosclerosis. «Am. J. Med.», 71: 331-333, 1981.
5. FUSTER, V.: Role of platelets in the development of atherosclerotic disease and possible interference with platelet inhibitor drugs. «Scand. J. Haematol.», 27: 1-34 (Suppl. 38), 1981.
6. AVIRAM, M.; BROOK, G.: Platelet activation by plasma lipoproteins. «Prog. Cardiovasc. Dis.», 30: 61-72, 1987.
7. ABELL, L. L.; LEVY, B. D.; VENDELL, F. G.: A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and mostration of its specificty. «J. Biol. Chem.», 195: 337-340, 1952.
8. BURSTEIN, M.; SHOLONSK, H. C.; WARFIK, R.: Rapid method for the isolation of lipoprotein from human serum by precipitation with polyanions. «J. Lipid Res.», 11: 583-587, 1970.
9. GRAFFNETER, D.: Zjedmodusene stanaveni triglyceridu prodiagnostiku hyperlipidemii. «V. Nitr. Lik.», 19: 808-813, 1973.
10. SATAB. R.: Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by colorimetric method. «Clin. Chim. Acta», 90: 37-45, 1978.
11. BORN, G. V. R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. «Nature», 94: 927-931, 1962.
12. STEPANAUSKAS, M.; NORDEN, K.; HEINS, H.: Die Bestimmung der bildungsrate von malondialdehyd (MDA) in thrombozyten. «Z. Med. Labor-Diagn.», 23: 332-338, 1982.
13. CHAIT, A.; BIERMAN, E. L.; ALBERS, J. Z.: Low density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts. Mechanism of insulin-induced stimulation. «J. Clin. Invest.», 64: 1309-1319, 1979.
14. HENZE, A.; CHAIT, A.: Lyposomal enzyme activities and low density lipoproteins receptors in circulating mononuclear cells. Effect of insulin therapy in diabetic patients. «Diabetología», 20: 625-629, 1981.
15. ZIMMERMANN, B. R.: A prospective study of peripheral occlusive arterial disease in diabetes initial lipid and lipoproteins findings. «Mayo Clin. Proc.», 561, 233, 1981.
16. LOEPER, J. et al.: Lipid peroxidation during human atherosclerosis. «IRCS Med. Sci.», 11: 1034-1935, 1983.
17. WADA, K. et al.: The inhibitory effect of lipid peroxide on the activity of the membrane-bound and solubilized lipoprotein lipase. «Jpn. Circ. J.», 47: 837-842, 1983.
18. CURTISS, L. K.; PLOW, E. F.: Interaction of plasma lipoproteins with human platelets. «Blood», 64: 365-374, 1984.
19. AVIRAM, M.; BROOK, J. G.: Selective release from platelet granules by plasma lipoproteins. «Biochem. Med.», 32: 30-33, 1984.
20. AVIRAM, M.: Platelet modified low density lipoprotein: Studies in normals and in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. «Clin. Biochem.», 1987. En prensa.
21. AVIRAM, M. et al.: Platelet modified lipoproteins induced by thrombin: Effect of whole blood and plasma. «Isr. J. Med. Sci.». En prensa.
22. SHATTIL, S. J. et al.: Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation. «J. Clin. Invest.», 55: 636-643, 1975.
23. SCHICK, B. P.; SCHICK, P. K.: Cholesterol exchange in platelets, erythrocytes and megakaryocytes. «Biochim. Biophys. Acta», 833: 281-290, 1985.