

Efecto del ácido ascórbico sobre el catabolismo de lipoproteínas plasmáticas de muy baja densidad

M. LEE Y J. L. RODRÍGUEZ

Dpto. de Bioquímica, Fac. de Biología, Universidad de la Habana, Cuba

Recibido: 13 de abril de 1983

Recibido: 26 de septiembre de 1983

ABSTRACT. The effect of ascorbic acid upon the cholesterol rich-lipoproteins metabolism, not reported yet in the literature, was investigated. The metabolic turnover of very low density lipoproteins (VLDL) labelled with ^{125}I was determined in New Zealand male rabbits receiving cholesterol (0.5 g/day) and ascorbic acid (0.2 g/day). The rabbits showed a reduction of serum cholesterol levels as compared to cholesterol-fed animals and the arterial content of cholesterol was lowered in the rabbits supplemented with ascorbic acid. The obtained results not only confirm the hypocholesterolemic effect of ascorbic acid but also demonstrated that VLDL from the cholesterol + ascorbic acid group as compared to cholesterol fed animals show a marked increase of its fractional catabolic rate. These findings support the hypotheses of a possible mechanism for the favourable action of ascorbic acid in the prevention of atherogenic processes.

RESUMEN. Se investigó el efecto del ácido ascórbico sobre el metabolismo de lipoproteínas ricas en colesterol, aspecto no reportado en la literatura. El recambio metabólico de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) marcadas con ^{125}I fue determinado en conejos Nueva Zelanda, machos, alimentados con dietas ricas en colesterol (0.5 g/día) y suplementos de ácido ascórbico (0.2 g/día). En estos animales se observó una reducción de los niveles de colesterol sérico respecto al grupo alimentado con dietas ricas en colesterol no suplementadas con ácido ascórbico siendo el contenido de colesterol en aorta menor en el grupo suplementado. Los resultados obtenidos no sólo confirman el efecto hipocolesterolémico del ácido ascórbico sino también demuestran que las (VLDL) del grupo que recibió colesterol + ácido ascórbico presentan un incremento marcado de su velocidad catabólica fraccional. Estos hallazgos dan base a una hipótesis acerca de un posible mecanismo para la acción favorable del ácido ascórbico en la prevención de procesos aterogénicos.

INTRODUCCION

Numerosas investigaciones realizadas en diferentes países han demostrado que un aumento en los lípidos plasmáticos está correlacionado con el desarrollo de la aterosclerosis, causa de muerte principal en los países desarrollados.

A pesar de que distintas evidencias aportadas por estudios epidemiológicos, inmunológicos y bioquímicos confirman que las lipoproteínas del plasma atraviesan el endotelio y se encuentran presentes en la íntima de las arterias, hasta el momento no ha sido posible dilucidar comple-

tamente los mecanismos de génesis y desarrollo de las lesiones arteriales en los que indudablemente el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas tiene un importante papel.

La alimentación con dietas ricas en colesterol ocasiona en el conejo modificaciones muy marcadas en la composición de las lipoproteínas del plasma. La principal clase lipoproteica que se afecta son las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que presentan en particular cambios considerables, produciéndose un rápido incremento en su concentración en plasma, así como modificaciones en su composición química y su estructura¹, lo cual trae como resultado que los mecanismos que funcionan normalmente en el catabolismo de dichas partículas disminuyen su velocidad al no constituir las (VLDL) aisladas de conejos hipercolesterolémicos un sustrato adecuado para la lipasa lipoproteica y aumentar su interacción con componentes presentes en la pared arterial. Esto habla en favor de la aterogenicidad inherente de las VLDL hipercolesterolémicas que en lugar de contener preferentemente triglicéridos presentan como componente principal colesterol esterificado y resultan metabolizadas lentamente, convirtiéndose a una velocidad menor que la normal en clases lipoproteicas de mayor densidad².

Durante los últimos años se ha prestado atención considerable a la posible relación existente entre el ácido ascórbico, el colesterol sérico y el desarrollo de la aterosclerosis existiendo en la literatura evidencias contradictorias al respecto. Varios investigadores han reportado que altas dosis de ácido ascórbico disminuyen la concentración de colesterol en sangre³⁻⁶, mientras que otros han obtenido resultados opuestos⁷⁻⁹.

En vista a la polémica existente y por la relevancia que revestiría la utilización del ácido ascórbico en la prevención o tratamiento del extenso problema de salud que constituye la aterosclerosis, nuestro interés ha sido estudiar el efecto de un suplemento dietético de ácido ascórbico sobre los lípidos del suero y de los tejidos en conejos alimentados con dietas ricas en colesterol, así como estudiar las posibles modificaciones inducidas en el catabolismo de las VLDL circulantes, aspecto que no ha sido reportado hasta el momento.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 18 conejos Nueva Zelandia, machos, de aproximadamente 3 kg de peso corporal, los que fueron alojados en jaulas individuales y divididos en 3 grupos: 6 fueron alimentados con pellet comercial para conejos (conejina), suplementado con 0.5 g de colesterol diariamente, 6 recibieron la dieta anterior descrita, suplementada además con 0.2 g de ácido ascórbico cada día y el resto constituyó el grupo control.

Al inicio del experimento y en las semanas 1 y 3 después de haber comenzado el tratamiento dietético se realizaron extracciones de sangre para la determinación de las concentraciones de lípidos séricos. A las 4 semanas de tratamiento dietético se realizó el experimento de catabo-

lismo y luego fueron sacrificados los animales, tomándose muestras de aorta e hígado para el análisis de lípidos. Los lípidos fueron extraídos por el método de Folch y cols.¹⁰ y se tomaron alícuotas del extracto cloroformico para cuantificar colesterol, por el método de Pearson y cols.¹¹ y fosfolípidos según Sinouen y Wertman¹², siendo estos métodos los empleados para cuantificar los lípidos séricos.

Para el estudio del catabolismo se aislaron las VLDL por ultracentrifugación preparativa a una densidad 1.006 g/mL, 15°C y 140,000 g durante 16 horas y posteriormente fueron marcadas con 125 I según el método de Mc Farlane¹³, modificado por Bilheimer y cols.¹⁴. El 125 I fue removido por diálisis contra solución de NaCl 0.15 M conteniendo 0.01 % de EDTA, pH 7.4 durante aproximadamente 24 horas a 4°C con al menos 4 cambios de la solución de diálisis. Las lipoproteínas marcadas presentaron un comportamiento similar a sus homólogos no marcadas según se comprobó en la electroforesis en gel de agarosa¹⁵. La eficiencia del procedimiento fue de 11.3 % y la radioactividad asociada a proteína del 86 %.

La solución de 125 I-VLDL fue inyectada a los conejos en la mañana y se extrajeron muestras de sangre a diferentes intervalos de tiempo para determinar el decrecimiento de la radioactividad en el tiempo. Las lecturas fueron realizadas en un gamma espectrómetro Wilj 2001. Para el análisis del catabolismo se utilizó un modelo de dos compartimientos cuya solución viene dada por una ecuación biexponencial, calculándose los diferentes parámetros cinéticos: alfa, beta, velocidad catabólica fraccional (V.C.F.) y tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de las partículas, según Notari¹⁶ y Matthews¹⁷.

$$VCF = \frac{1}{A' / \alpha + B' / \beta}$$

donde: $A' = A/Po$; $B' = B/Po$ y $Po = 100$

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó según el test T de Student.

RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los niveles de colesterol sérico a través del período experimental en el grupo control (C), grupo hipercolesterolémico (HC) y grupo tratado con ácido ascórbico (HC + AA). A partir de la 1ra. semana se observó la elevación de los niveles de colesterol en el grupo hipercolesterolémico en relación con el grupo control ($p < 0.001$). El grupo tratado con ácido ascórbico presentó una menor elevación del colesterol sérico con una diferencia significativa de $p < 0.05$.

Los niveles de fosfolípidos séricos se incrementaron en el grupo hipercolesterolémico ocho veces por encima de los valores del grupo control a la 3ra. semana y existió la tendencia a la menor elevación de este parámetro en los conejos tratados con ácido ascórbico (Tabla II). La

elevación del colesterol sérico se relacionó en particular con el incremento del mismo en la fracción β más pre β lipoproteínas. En el grupo tratado con ácido ascórbico se observó una menor elevación (Fig. 1).

TABLA I

Niveles de colesterol sérico (mg/dL) en conejos de los grupos control (C), hipercolesterolémico (HC) y tratado con ácido ascórbico (HC + AA)

	Período experimental (semanas)		
	0	1	3
C (6)	77.43 \pm 20.05 ^a	76.30 \pm 15.30	68.30 \pm 16.85
HC (6)	83.51 \pm 29.51	968.41 \pm 466.50	1391.87 \pm 551.89
HC + AA (6)	80.10 \pm 24.54	595.99 \pm 318.89	867.56 \pm 452.20

a: $\bar{x} \pm d.s.$

$p < 0.001$ (C vs HC) a partir de la semana 1.

$p < 0.05$ (HC vs HC + AA) a partir de la semana 1

() número de animales

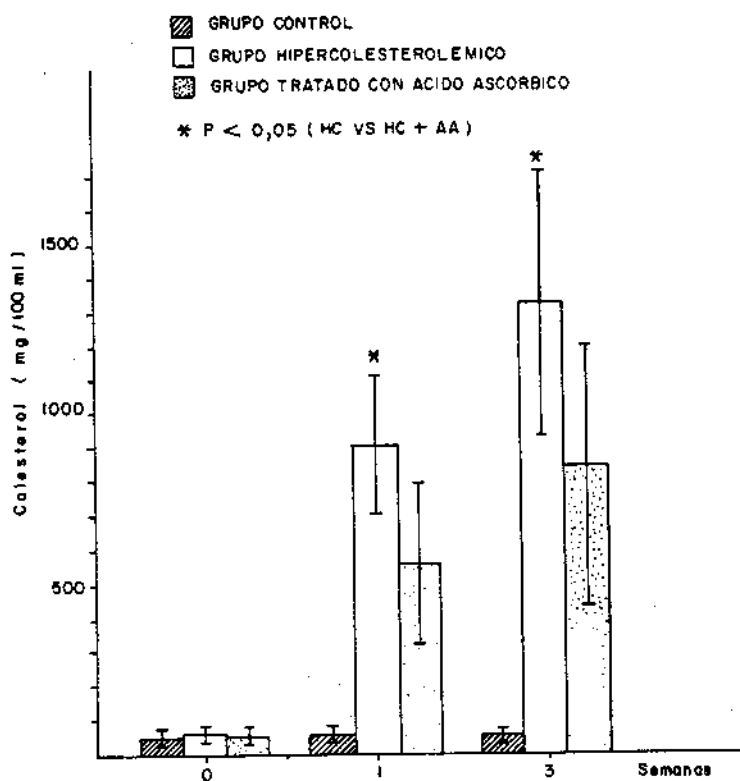


Fig. 1. Contenido de colesterol en $\beta + \text{pre } \beta$ lipoproteínas.

TABLA II

Niveles de fosfolípidos séricos (mg/dL) en conejos de los grupos control (C), hipercolesterolémico (HC) y tratado con ácido ascórbico (HC + AA)

	Período experimental (semanas)		
	0	1	3
C (6)	129.3 ± 18.6 ^a	124.3 ± 22.7	118.2 ± 15.3
HC (6)	140.3 ± 18.6	393.5 ± 96.6	892.0 ± 241.4
HC + AA (6)	129.8 ± 21.5	395.8 ± 193.1	662.4 ± 125.7

a: $\bar{x} \pm d.s.$

p < 0.001 (C vs HC) semana 3

n.s. (HC vs HC + AA)

() número de animales

De modo análogo se comprobó un mayor incremento en la relación del colesterol en β/α lipoproteínas en el grupo hipercolesterolémico en relación con el grupo tratado con ácido ascórbico y el grupo control (Tabla III).

TABLA III

Cambios en la relación colesterol β/α lipoproteínas del suero en conejos de los grupos control (C), hipercolesterolémico (HC) y tratado con ácido ascórbico (HC + AA)

	Período experimental (semanas)		
	0	1	3
C (6)	1.32	1.10	0.96
HC (6)	1.60	13.72	18.72
HC + AA (6)	1.59	8.10	13.52

() número de animales

En la Tabla IV se muestra el contenido de colesterol y fosfolípidos en aorta e hígado de los conejos de los grupos control, hipercolesterolémico y tratado con ácido ascórbico. Como se observa el contenido de colesterol en hígado fue superior en los conejos hipercolesterolémicos en relación al grupo control (p < 0.001) y al compararlo con el grupo tratado con ácido ascórbico se observaron diferencias significativas entre ellos (p < 0.05). Este último presentó diferencias significativas con el grupo control (p < 0.05). El contenido de colesterol en aorta mostró también una tendencia a una menor acumulación en el grupo tratado con ácido ascórbico.

Al estudiar el catabolismo de las VLDL aisladas de conejos hipercolesterolémicos tratados con ácido ascórbico se observó que estas partículas tienen favorecida su degradación en relación con las VLDL aisladas de conejos hipercolesterolémicos. Los parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de decrecimiento de la radioactividad en sangre en el tiempo para los tres grupos de animales se observan en la Tabla V. Al comparar los valores de tiempo de vida media ($T_{1/2}$) de la fase lenta para los tres grupos estudiados se observa que el menor valor corresponde al grupo control y que en el grupo hipercolesterolémico hay un aumento de más de dos veces en relación con el grupo control. El valor obtenido para el grupo tratado con ácido ascórbico se encuentra más cercano a los obtenidos para el grupo control. Lo mismo sucede con los valores obtenidos para la velocidad catabólica fraccional (V.C.F.) correspondiente al grupo hipercolesterolémico presentando un valor de cinco veces menor a la calculada para el grupo control, observándose menores modificaciones en este parámetro en el grupo que recibió ácido ascórbico.

TABLA IV

Contenido de colesterol y fosfolípidos ($\bar{x} + d.s.$) en aorta e hígado de conejos de los grupos control (C) hipercolesterolémico (HC) y tratado con ácido ascórbico (HC + AA)

	Colesterol ^a		Fosfolípidos ^a	
	Aorta	Hígado	Aorta	Hígado
C (6)	0.68 ± 0.16	1.17 ± 0.67	2.77 ± 0.19	8.12 ± 3.86
HC (6)	1.26 ± 0.40	11.80 ± 3.80	4.67 ± 1.24	25.08 ± 13.2
HC + AA (6)	0.98 ± 0.40	6.32 ± 2.85	4.80 ± 1.62	21.61 ± 5.43
	b	c	b	b

() número de animales

a: mg/g de tejido fresco

b: no significativo

c: $p < 0.001$ (C vs HC)

$p < 0.05$ (HC vs HC + AA)

$p < 0.05$ (C vs HC + AA)

DISCUSION

En el presente estudio se ha comprobado que en una etapa experimental temprana se produce en el grupo de animales alimentado con una dieta rica en colesterol una elevación notable y estadísticamente significativa del colesterol sérico respecto a los niveles que presenta el grupo control. Este incremento refleja la elevación del colesterol en la fracción

β más pre β lipoproteínas, lo cual se pone de manifiesto en el aumento de la relación colesterol en β/α lipoproteínas en este grupo.

TABLA V

Parámetros cinéticos del catabolismo de las 125 I-VLDL aisladas de conejos de los grupos control (C), hipercolesterolémico (HC) y tratado con ácido ascórbico (HC + AA) al ser inyectadas en sus propios grupos

Parámetros cinéticos	VLDL-C	VLDL-HC	VLDL-HC + AA
Alfa	- 3.960	- 1.980	- 2.772
Beta	- 0.073	- 0.033	- 0.048
T $\frac{1}{2}$ fase rápida (h)	0.175	0.350	0.250
T $\frac{1}{2}$ fase lenta (h)	9.40	20.80	14.20
V.C.F. (h^{-1})	0.301	0.059	0.113
K _{2,1} (h^{-1})	0.967	0.103	0.192
K _{1,2} (h^{-1})	2.764	0.764	1.491

Al estudiar el catabolismo de las VLDL aisladas del grupo hipercolesterolémico se observó una disminución en su catabolismo dada por una mayor retención de la radioactividad en suero en el período de tiempo estudiado, un aumento del tiempo de vida media y una disminución de la velocidad catabólica fraccional respecto al grupo control. Esto confirma que las alteraciones en el metabolismo de estas partículas se producen en un período de tiempo corto (4 semanas) de suministrar a conejos una dieta rica en colesterol. Estas partículas son pobremente catabolizadas por animales del grupo control, lo cual corrobora la aterogenicidad inherente a estas partículas independientemente de las alteraciones que se produzcan en los mecanismos normales de la pared arterial durante el desarrollo de la aterosclerosis. Además de las modificaciones en las lipoproteínas séricas se produjo un incremento en el contenido de colesterol en aorta e hígado siendo significativo este incremento para el tejido hepático.

Ha sido planteado que la concentración de colesterol en sangre y tejidos está regulada por la conversión de colesterol en sales biliares y que se requieren niveles adecuados de ácido ascórbico para que esta transformación ocurra, dada su función generalmente aceptada como promotor de los mecanismos de hidroxilación. Se ha sugerido que el ascorbato afecta la síntesis o degradación del sistema 7-alfa hidroxilante, en particular el componente citocromo P-450¹⁸. Por otra parte, Mumma y Verlangieri¹⁹ han sugerido que el ácido ascórbico está involucrado en la excreción del colesterol sulfatado y Nambisan y Kurup²⁰, observaron que en animales que reciben bajas dosis de ácido ascórbico, el metabolismo del sulfato está disminuido, afectando el contenido de glicosami-

noglicanos sulfatados en la pared arterial, lo cual es una característica de los estados ateroscleróticos.

Los datos reportados en el presente trabajo señalan que la administración de ácido ascórbico junto al colesterol a conejos disminuye marcadamente el grado de hipercolesterolemia alcanzado, lo cual habla en favor del efecto hipocolesterolémico del mismo y posiblemente antiaterosclerótico.

El metabolismo de lipoproteínas ricas en colesterol se ve favorecido en los animales que reciben suplementos de ácido ascórbico. Estos resultados son de gran relevancia por el hecho de que en el conejo hipercolesterolémico una característica principal es su dificultad en catabolizar las VLDL circulantes lo cual trae como consecuencia una captación y permanencia, incrementada de estas partículas en la pared arterial, aun en los casos de animales que tengan un endotelio normal, situación que puede ser similar a la hiperlipoproteíнемia tipo III en el humano donde las partículas VLDL grandes, ricas en colesterol, son lentamente degradadas a unidades lipoproteicas más pequeñas²¹. La metabolización incrementada de VLDL en el grupo tratado con ácido ascórbico puede ser un factor importante en determinar una menor acumulación de lípidos en los tejidos de estos animales. En efecto, nuestros resultados indican un menor contenido de colesterol, en aorta e hígado de los animales tratados con ácido ascórbico respecto al grupo hipercolesterolémico. Esto sugiere que el tratamiento con ácido ascórbico induce una menor acumulación de colesterol en los tejidos ante un consumo igual de colesterol dietético.

Al evaluar el impacto de estos hallazgos respecto a la incidencia de la aterosclerosis en el humano, debemos señalar que varios investigadores soviéticos, encabezados por Miasnikova, han utilizado la vitamina C regularmente por vía oral o inyección intravenosa como medida terapéutica en pacientes con aterosclerosis²².

Los conocimientos actuales sobre el papel del ácido ascórbico en la prevención del proceso aterosclerótico se encuentran en su mayoría en el nivel empírico, aunque se hace evidente que el consumo de ácido ascórbico puede ser un factor importante en los niveles de colesterol sérico y el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas, por lo que se debe seguir profundizando en su papel a nivel molecular.

REFERENCIAS

1. RODRÍGUEZ J. L., GHISELLI G. C., TORREGGIANI D. AND SIRTORI C. R. *Atherosclerosis* 23, 73, 1976.
2. RODRÍGUEZ J. L., CATAPANO A., GHISELLI G. C. AND SIRTORI C. R. *Atherosclerosis* 23, 85, 1976.
3. SOKOLOFF M., MORI M., SAELHOF C., CONNELL B. AND IMAI T. *J. Nutr.* 91, 67, 1967.
4. SPITTLE C. R. *Lancet* 2, 1280, 1971.
5. NAMBISAN B. AND KURUP P. A. *Atherosclerosis* 19, 243, 1974.

6. SLOCUM M., POND W. G. AND WALKER E. F. *Nutr. Reports Internat.* 17, 2, 1978.
7. ELWOOD P. C., HUGHES R. E. AND HURLEY R. J. *Lancet* 2, 1197, 1970.
8. ANDERSON T. W., REID D. B. W. AND BEATON G. H. *Lancet* 2, 876, 1972.
9. GATEMBY-DAVIES J. D. AND NEWSON J. *Am. J. Clin. Nutr.* 26, 1039, 1976.
10. FOLCH J., LEES M. AND SLOANE-STANLEY G. A. *J. Biol. Chem.* 226, 497, 1957.
11. PEARSON S., STERN S. AND MC GOVACK T. H. *Anal Chem.* 25, 813, 1953.
12. SINOUSEN D. G. AND WERTMAN M. J. *Biochem.* 66, 767, 1946.
13. MC FARLANE A. S. *Nature* 182, 53, 1958.
14. BILHEIMER D. W., EISENBERG S. AND LEVY R. I. *Biochim. Biophys. Acta* 260, 212, 1972.
15. NOBLE R. P. *J. Lipid Res.* 9, 693, 1968.
16. NOTARI R. E. *Biopharmaceutics and Pharmacokinetics-An Introduction*, Marcel Dekker, New York, 1971.
17. MATTHEWS C. M. E. *Phys. Med. Biol.* 2, 36, 1957.
18. BJÖRKEM I. AND KALLNER A. *J. Lipid Res.* 17, 4, 1976.
19. MUMMA R. O. AND VERLANGIERI A. J. *Fed. Proc.* 30, 370, 1971.
20. NAMBIAN B. AND KURUP P. A. *Atherosclerosis* 22, 3, 1975.
21. BILHEIMER D. W., EISENBERG S. AND LEVY R. J. *Circulation* 44, 186, 1971.
22. SIMONSON E. AND KEYS A. *Circulation* 24, 1239, 1961.