

## LIPOPROTEINAS DE MUY BAJA DENSIDAD Y SUBESPECIES DE LIPOPROTEINAS DE DENSIDAD INTERMEDIA EN MUJERES POSTMENOPAUSICAS\*

GABRIELA BERG, HAYDEE HALPERIN, NESTOR SISELES, REGINA WIKINSKI

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; División Climaterio, Departamento de Ginecología, Hospital Francés, Buenos Aires

**Resumen** La mujer post-menopáusica presenta aumento de riesgo cardiovascular y paralelamente modificación del perfil lipoproteico con aumento de las lipoproteínas aterogénicas IDL y LDL. Nuestros objetivos fueron analizar la composición de las VLDL, IDL y sus subespecies IDL-1 e IDL-2, y la actividad de Lipoproteína Lipasa y Lipasa Hepática en un grupo de 12 MPM clínicamente sanas, en comparación con Controles fértiles. Los valores medios de colesterol-total y colesterol-LDL fueron significativamente mayores en el grupo MPM que en Controles ( $p < 0,005$  y  $p < 0,001$  respectivamente) mientras que el colesterol-HDL fue menor en las MPM ( $p < 0,02$ ) aun cuando ninguna presentó colesterol-HDL menor de 35 mg/dl y la media fue de 50 mg/dl. Las MPM presentaron mayor concentración plasmática de VLDL, IDLtotal e IDL-2 que las Controles ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$  y  $p < 0,001$  respectivamente). La concentración plasmática de IDL-total fue mayor en MPM que en Controles ( $33,6 \pm 3,4$  vs  $22,6 \pm 0,8$  mg/dl  $p < 0,005$ ). El aumento de IDL se debió al incremento en IDL-2 que fue de  $19,9 \pm 1,7$  vs  $11,5 \pm 0,8$  mg/dl,  $p < 0,001$ . La subfracción IDL-2 fue el  $60 \pm 2,6\%$  de la total en MPM y el  $51 \pm 2,0\%$  en las Controles,  $p < 0,02$ . Tanto en MPM como en Controles la relación triglicéridos/proteínas fue significativamente mayor en IDL-1 que en IDL-2  $p < 0,005$  y  $p < 0,01$  respectivamente. Sin embargo, dicha relación no mostró diferencias significativas cuando se compararon VLDL, IDL total e IDL-2 de MPM vs Controles por lo que la mayor concentración plasmática indicaría un mayor número de partículas en el grupo de MPM vs las Controles. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de Lipasa Hepática y Lipoproteína Lipasa entre grupos. La Lipoproteína Lipasa mostró una correlación inversa significativa con los triglicéridos-IDL total y con los triglicéridos-IDL-2 ( $p < 0,05$  en ambos casos) en el grupo Controles pero no en el grupo MPM. Se concluye que el análisis cuali y cuantitativo de las lipoproteínas muestra un perfil más aterogénico en el grupo MPM con aumento en la concentración y número de partículas de VLDL, IDL total e IDL-2.

**Palabras claves:** aterosclerosis, postmenopausia, lipasa hepática, lipoproteína lipasa, lipoproteínas plasmáticas

Numerosos estudios han demostrado que la incidencia de enfermedad cardiovascular ateros-

clerótica entre las mujeres, es considerablemente menor que en los hombres<sup>1</sup>. La prevalencia de

Recibido: 11-XII-1995

Aceptado: 10-VII-1996

\* Parcialmente presentado en las XXXVI reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, 1992.

**Dirección Postal:** Dra. Gabriela Berg, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad:  $< 1,006$  g/ml  
IDL total: Lipoproteínas de densidad intermedia: 1,006-1,025 g/ml según Krauss<sup>2</sup>.

IDL-1: Lipoproteínas de densidad intermedia, subfracción de densidad 1,006-1,015 g/ml

IDL-2: Lipoproteínas de densidad intermedia, subfracción de densidad 1,015-1,025 g/ml.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad: 1,025-1,063 g/ml.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad: 1,063-1,210 g/ml.

MPM: Mujeres post-menopáusicas

la insuficiencia coronaria aumenta luego de la menopausia y el perfil lipoproteico se modifica paralelamente con aumento en plasma de triglicéridos, colesterol total y colesterol-LDL. Otra lipoproteína asociada con coronariopatías es la IDL<sup>2</sup> que también se encuentra aumentada en la post-menopausia<sup>3, 4, 5</sup>. Esta asociación entre lipoproteínas séricas y mortalidad cardiovascular fue más estudiada en hombres y recién en los últimos 15 años fue incluida la mujer post-menopáusica a partir de su participación en las cohortes estudiadas por clínicas de investigación de lípidos. El mayor riesgo de enfermedad cardiovascular que se observa en las mujeres luego de la menopausia, inclusive en aquellas que han sufrido ovariectomía temprana, ha llevado a atribuir a la disminución de estrógenos, un importante papel en la aterogénesis. Los estrógenos tienen un efecto directo sobre el metabolismo de las lipoproteínas aumentando la síntesis de receptores B:E<sup>6, 7</sup> donde se catabolizan parte de las IDL y las lipoproteínas de baja densidad. Por otro lado estimulan la relajación de la pared arterial<sup>8, 9</sup>. Por lo tanto la disminución de estrógenos en esta etapa de la vida de la mujer, justifica el aumento en la concentración de lipoproteínas aterogénicas<sup>10</sup> y el incremento de riesgo cardiovascular.

Austin y cols<sup>11</sup> han descrito el fenotipo B que es más aterogénico que el A. Los autores señalan que el fenotipo B se caracteriza por la presencia de aumento de triglicéridos plasmáticos, y mayor masa de VLDL e IDL las que generan una LDL más densa y pequeña. Las VLDL, IDL y LDL son estructural y funcionalmente heterogéneas. Estudiando la heterogeneidad de la IDL, Musliner y Krauss describieron 2 subespecies, IDL-1 e IDL-2 que se pueden diferenciar por sus densidades y tamaños, siendo la IDL-2, más pequeña y densa, relativamente empobrecida en triglicéridos y enriquecida en colesterol<sup>12</sup> y precursora de subespecies de LDL más densas y aterogénicas.

En la relación precursor-producto de las lipoproteínas plasmáticas juegan un importante papel las enzimas lipolíticas post-heparínicas, Lipoproteína Lipasa y Lipasa Hepática. La Lipoproteína Lipasa hidroliza los triglicéridos de Quilomicrones y VLDL originando remanentes de Quilomicrones, IDL y LDL rica en triglicéridos<sup>13</sup>, la Lipasa Hepática interviene en el catabolismo de IDL y de LDL rica en triglicéridos originando

LDL típicas. Recientemente se ha informado que existe un aumento en la actividad de Lipoproteína Lipasa en mujeres post-menopáusicas, sin cambios en la actividad de Lipasa Hepática<sup>14</sup>. Otros autores han demostrado que la Lipasa Hepática es modulada por los esteroides sexuales existiendo una relación inversa con los estrógenos que podría modificar la composición de las lipoproteínas en la post-menopausia y explicar en parte las alteraciones en el perfil lipoproteico<sup>15</sup>.

Los objetivos de este trabajo fueron analizar la composición de las VLDL, IDL y sus subespecies IDL-1 e IDL-2 y la actividad de la Lipoproteína Lipasa y Lipasa Hepática, en un grupo de MPM clínicamente sanas en comparación con Controles fértiles, para evaluar el efecto del climaterio femenino sobre el metabolismo de las lipoproteínas y el riesgo aterogénico consiguiendo, enfocando el estudio en la heterogeneidad de la familia de IDL, que es la menos conocida.

## Materiales y métodos

### *Pacientes y métodos*

Las mujeres post-menopáusicas (grupo MPM, n = 12) fueron reclutadas consecutivamente entre pacientes que concurrían a la consulta en la división Climaterio del Hospital Francés, con edades comprendidas entre 49 y 57 años, con 1 a 10 años de amenorrea, sin tratamiento hormonal. Su índice de masa corporal fue menor a 27 kg/m<sup>2</sup>, no hubo en el grupo fumadoras, hipertensas ni diabéticas, ninguna presentó algún tipo de enfermedad crónica.

El grupo de Controles fértiles (Controles, n = 11), fue seleccionado entre mujeres que trabajan en el Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital de Clínicas, con edades entre 26 y 38 años. Todas eran clínicamente sanas, normolipémicas, con un índice de masa corporal entre 23 y 26 kg/m<sup>2</sup>, no eran fumadoras, no presentaban historia de enfermedad cardiovascular ni otra enfermedad que afectara el metabolismo lipídico.

Ninguna de las pacientes o controles, recibía hipolipemiantes, ni tomaba drogas que afectaran el metabolismo lipídico. Todas las pacientes y controles dieron su consentimiento para la realización del estudio, luego de haber recibido la información correspondiente.

### *Muestras*

Las muestras de sangre se obtuvieron de pacientes y controles por punción venosa, luego de 12 horas de ayuno. El suero se separó por centrifugación a baja velocidad, antes de 1 hora y se agregó EDTA disódico, 1,5 mg/

ml de suero y 0,1 mg/ml de azida sódica para inhibir la degradación peroxidativa de las lipoproteínas y el crecimiento bacteriano. El plasma se guardó a 4°C hasta su procesamiento, dentro de las 48 hs y se dividió en dos alícuotas. Una alícuota se utilizó para la determinación de triglicéridos, colesterol total, colesterol-LDL y colesterol-HDL. La otra se usó para la separación y análisis de VLDL, IDL y sus subfracciones.

Para la determinación de la actividad de Lipasa Hepática y Lipoproteína Lipasa, las pacientes recibieron una inyección intravenosa de 60 UI de heparina Abbott/kg de peso corporal. Las muestras de plasma postheparínico, obtenidas por punción venosa en el brazo contralateral se recogieron en tubos en baño de hielo, la sangre se centrifugó inmediatamente a 2500 rpm a 4°C durante 10 minutos y el plasma se conservó a -70°C hasta su posterior procesamiento dentro de los 30 días.

#### *Métodos analíticos generales y actividad enzimática*

El colesterol total y los triglicéridos plasmáticos se determinaron en autoanalizador discreto ABA-VP (Abbott, Estados Unidos) por métodos enzimáticos, estandarizados por Boehringer Mannheim (Alemania), con estándares y controles en cada corrida. El coeficiente de variación para el colesterol fue menor de 3% y para triglicéridos menor de 4%.

El colesterol-HDL se determinó por precipitación con ácido fosfotúngstico y  $MgCl_2$ <sup>16</sup> Boehringer Mannheim (Alemania) y medida enzimática del colesterol en el sobrenadante. El colesterol-LDL se determinó según Wieland y Seidel<sup>17</sup>. El control de calidad se realizó desde el momento inicial de las precipitaciones con pools de sueros de concentración media, baja y alta que se conservan a -70°C. El coeficiente de variación intraensayo fue de 4,3% para el colesterol-HDL y de 4,7% para el colesterol-LDL. La actividad de la Lipasa Hepática se midió según el método de Francone y cols<sup>18</sup> modificado en este laboratorio<sup>3</sup>, la actividad de la Lipoproteína Lipasa se midió según el método de Baginski y col<sup>19</sup> midiendo el glicerol liberado según el método de Carlson<sup>20</sup>. Los coeficientes de variación intraensayo fueron de 8% para la Lipasa Hepática y de 8,7% para la Lipoproteína Lipasa.

#### *Separación de VLDL, IDL, IDL-1, IDL-2 y Análisis de las fracciones*

Para analizar la composición química de VLDL, de IDL y sus subfracciones IDL-1 e IDL-2, éstas se separaron por ultracentrifugación secuencial<sup>21</sup> en el intervalo de densidades < 1,006 g/ml para VLDL, 1,006-1,025 g/ml para IDL total, 1,006-1,015 g/ml para IDL-1 y 1,015-1,025 g/ml para IDL-2. La selección de las densidades para la separación de IDL y sus subfracciones se realizó según Krauss<sup>2</sup>.

Para ello, 10 ml de plasma se distribuyeron en tubos de policarbonato (referencia: 03020, volumen 10 ml), se superpuso una capa de solución Buffer de NaCl 0,154 M Tris 0,001 M, EDTA 1,7 mM de densidad 1,006 g/ml y pH 7,4 y se ultracentrifugó 20 horas a 105000 xg a 15°C en una ultracentrífuga Sorvall OTD55B con rotor de ángulo fijo 865-1 para separar VLDL.

El infranadante se separó en 2 fracciones, una destinada a separar IDL total, se llevó a densidad 1,025 g/ml con NaCl sólido, y se superpuso una solución buffer de la misma densidad. La IDL total se separó luego de 18 horas de ultracentrifugación en las condiciones arriba expuestas. La segunda fracción, destinada a separar las subfracciones de IDL, se llevó primero a densidad 1,015 g/ml con NaCl sólido y se superpuso una solución buffer de la misma densidad. Se ultracentrifugó 18 horas en las condiciones antes señaladas y se separó IDL-1 del sobrenadante. El infranadante se llevó a densidad 1,025 g/ml con NaCl sólido, y se superpuso una solución buffer de la misma densidad, la IDL-2 se separó luego de 18 horas de ultracentrifugación en las mismas condiciones. La pureza de las fracciones de VLDL e IDL se determinó por electroforesis en gel de agarosa<sup>22</sup>.

La composición química de las fracciones se determinó midiendo: colesterol, triglicéridos y fosfolípidos enzimáticamente con reactivos estandarizados por Boehringer Mannheim (Alemania), y proteínas totales por el método de Bradford<sup>23</sup> utilizando una solución de albúmina como estándar (Sigma A-6003, Chemical Company).

Para cada fracción separada, la concentración lipoproteica (mg/dl de plasma) se calculó por adición de las concentraciones de colesterol-total, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas totales. Debido a que el colesterol esterificado se expresa por su contenido en colesterol, la masa de ácidos grasos esterificados con colesterol no se incluye en los valores calculados. Por lo tanto, nuestros cálculos subestiman en un 5-10% la concentración lipoproteica en plasma<sup>24</sup>.

#### *Evaluación de los Resultados*

El análisis de los resultados se realizó por el test de Student para grupos independientes. Las correlaciones se calcularon por el coeficiente r de Pearson.

## **Resultados**

Los valores medios de colesterol-total y colesterol-LDL fueron significativamente mayores en el grupo de MPM que en Controles ( $p < 0,005$  y  $p < 0,001$  respectivamente) mientras que el colesterol-HDL fue menor ( $p < 0,02$ ) (tabla 1).

TABLA 1.— Concentración plasmática de lípidos y lipoproteínas en mujeres postmenopáusicas (MPM) y controles, expresadas en mg/dl de plasma, media  $\pm$  ES

	MPM (n = 12)	Controles (n = 11)	P
Colesterol total	233 $\pm$ 10,5	190 $\pm$ 6,4	< 0,005
Colesterol-LDL	161 $\pm$ 8,0	113 $\pm$ 6,8	< 0,001
Colesterol-HDL	50 $\pm$ 2,7	64 $\pm$ 3,9	< 0,02
Triglicéridos	104 $\pm$ 15,5	72 $\pm$ 5,3	ns

TABLA 2.— Concentración plasmática total, triglicéridos, colesterol, fosfolípidos y proteínas en VLDL, IDL total y sus subfracciones IDL-1 e IDL-2 en MPM y Controles. Los valores se expresan en mg/dl de plasma, media  $\pm$  ES

	MPM (n = 12)	Controles (n = 11)	P
<b>VLDL</b>			
Concentración plasmática	72,5 $\pm$ 15,6	35,1 $\pm$ 3,5	< 0,05
Triglicéridos	42,9 $\pm$ 9,6	18,4 $\pm$ 2,0	< 0,025
Colesterol	10,2 $\pm$ 2,5	5,6 $\pm$ 0,7	ns
Fosfolípidos	13,8 $\pm$ 2,9	7,9 $\pm$ 0,9	ns
Proteínas	5,6 $\pm$ 1,1	3,2 $\pm$ 0,3	< 0,05
<b>IDL total</b>			
Concentración plasmática	33,6 $\pm$ 3,4	22,6 $\pm$ 1,4	< 0,005
Triglicéridos	10,5 $\pm$ 1,6	6,2 $\pm$ 0,7	< 0,025
Colesterol	8,7 $\pm$ 1,0	4,3 $\pm$ 0,3	< 0,001
Fosfolípidos	10,6 $\pm$ 1,2	9,9 $\pm$ 0,5	ns
Proteínas	3,8 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,5	< 0,005
<b>IDL-1</b>			
Concentración plasmática	1,7 $\pm$ 2,1	11,1 $\pm$ 1,1	ns
Triglicéridos	6,3 $\pm$ 1,4	3,7 $\pm$ 0,4	ns
Colesterol	2,3 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,1	ns
Fosfolípidos	3,8 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 0,4	ns
Proteínas	1,3 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	ns
<b>IDL-2</b>			
Concentración plasmática	19,8 $\pm$ 1,7	11,5 $\pm$ 0,8	< 0,001
Triglicéridos	4,1 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,3	< 0,005
Colesterol	6,4 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 0,2	< 0,001
Fosfolípidos	6,8 $\pm$ 0,7	5,2 $\pm$ 0,3	ns
Proteínas	2,5 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,1	< 0,001

Nueve de las 12 MPM presentaron colesterol-LDL menor de 160 mg/dl, pero en todas el colesterol-LDL fue mayor de 130 mg/dl, con colesterol-total mayor a 200 mg/dl. Ninguna presentó colesterol-HDL menor de 35 mg/dl. Los

triglicéridos plasmáticos en MPM fueron inferiores a 200 mg/dl. Las Controles fueron todas normolipémicas.

La concentración plasmática total de VLDL fue superior en el grupo MPM que en Controles. En

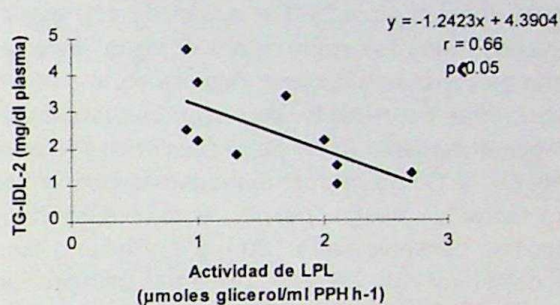
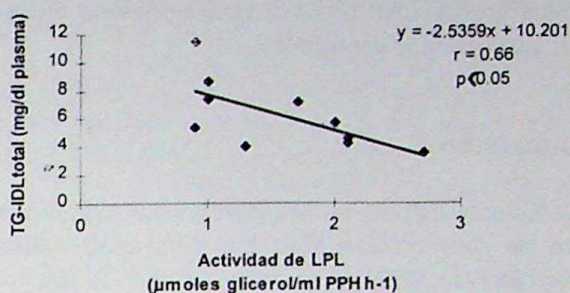
la tabla 2 se ve que esta mayor concentración plasmática fue a expensas de triglicéridos y de proteínas. La distribución porcentual de los componentes de VLDL no muestra diferencias entre grupos.

En el grupo MPM la concentración plasmática de IDL total fue mayor que en el grupo Control, a expensas de triglicéridos, colesterol y proteínas. La IDL total de las MPM presentó mayor porcentaje de colesterol y menor porcentaje de fosfolípidos que en las Controles ( $p < 0,001$  en ambos casos).

Las concentraciones plasmáticas totales de IDL-1 e IDL-2 se observan en la tabla 2. Se ve mayor concentración plasmática total de IDL-2 a expensas de triglicéridos, colesterol y proteínas. A su vez la concentración porcentual de IDL-2 mostró mayor porcentaje de colesterol y proteínas en MPM ( $p < 0,001$  y  $p < 0,02$ ) respectivamente y menor porcentaje de fosfolípidos que en Controles ( $p < 0,001$ ).

La distribución porcentual de las subfracciones de IDL total muestra que IDL-2 fue la mayor subfracción en MPM,  $60 \pm 2,6$  vs  $51 \pm 2,0\%$  ( $p < 0,02$ ).

Tanto en MPM como en Controles la relación triglicéridos/proteínas indicadora de tamaño fue significativamente mayor en IDL-1 que en IDL-2 ( $5,2 \pm 1,0$  vs  $1,8 \pm 0,2$   $p < 0,005$  en MPM y  $3,5 \pm 0,3$  vs  $2,5 \pm 0,4$   $p < 0,01$  en Controles). Estas diferencias están asociadas con un aumento de colesterol en IDL-2 vs IDL-1 como se evidencia por las relaciones colesterol/triglicéridos ( $1,5 \pm 0,12$  vs  $0,42 \pm 0,05$   $p < 0,002$  en MPM y  $1,3 \pm$



En el Panel A figura la correlación en el grupo Control entre la actividad de Lipoproteína Lipasa (LPL) en plasma post-heparínico (PPH) vs triglicéridos en IDL total expresados como concentración plasmática de triglicéridos transportados en IDL total (TG-IDL total, mg/dl de plasma).

En el Panel B figura la correlación en el grupo Control entre la actividad de Lipoproteína Lipasa (LPL) en plasma post-heparínico (PPH) vs triglicéridos en IDL-2 expresados como concentración plasmática de triglicéridos transportados en IDL-2 (TG-IDL-2, mg/dl de plasma).

TABLA 3.— Actividad de lipoproteína Lipasa (LPL) y Lipasa hepática (LH) en mujeres postmenopáusicas (MPM) y controles, expresadas en  $\mu$ moles glicerol/ml plasma post-heparínico.h<sup>-1</sup>, media  $\pm$  ES

	MPM n = 12	Controles n = 11	P
LPL	1,2 $\pm$ 0,15	1,4 $\pm$ 0,20	ns
LH	4,9 $\pm$ 0,90	4,0 $\pm$ 0,40	ns

0,23 vs  $0,47 \pm 0,05$   $p < 0,002$  en Controles) y Colesterol/proteínas ( $2,7 \pm 0,3$  vs  $1,8 \pm 0,22$   $p < 0,01$  en MPM y  $2,7 \pm 0,4$  vs  $1,6 \pm 0,2$   $p < 0,01$  en Controles) en ambos grupos.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de Lipoproteína Lipasa y Lipasa Hepática cuando se compararon ambos grupos (tabla 3). En el grupo de Controles, se encontró correlación inversa significativa entre triglicéridos-IDL total y actividad de Lipoproteína Lipasa y entre triglicéridos-IDL-2 vs Lipoproteína Lipasa (figura 1). En el grupo de MPM la correlación entre Lipoproteína Lipasa y los triglicéridos transpor-

tados en IDL total o sus subfracciones no alcanzó significación estadística.

## Discusión

En este estudio se discuten las características de las lipoproteínas que contienen apoB caracterizando la VLDL, precursora de IDL, la IDL total y sus subfracciones IDL-1 e IDL-2.

El grupo de MPM puede caracterizarse como fenotípicamente IIa porque en nueve de las doce MPM el colesterol-LDL fue menor de 160 mg/dl, pero en todas fue superior a 130 mg/dl. Este último es considerado como valor de corte cuando existe más de un factor de riesgo cardiovascular según el *National Cholesterol Education Program* (NCEP)<sup>25</sup>. Como la post-menopausia podría ser un factor de riesgo *per se*, entonces el valor máximo deseable sería 130 mg/dl. Por otro lado el colesterol-HDL de estas pacientes siempre fue mayor que el mínimo deseable de 35 mg/dl.

La VLDL que es la mayor transportadora de triglicéridos plasmáticos, presentó mayor concentración en MPM que en Controles. Su concentración se evaluó por sumatoria de sus componentes y este aumento fue a expensas de triglicéridos y proteínas. Otros autores señalan que los triglicéridos aumentan con la edad<sup>26</sup>. En nuestras pacientes el aumento de triglicéridos-VLDL sugiere que estas partículas han sido menos extensamente lipolizadas que en las Controles, sin embargo, la relación triglicéridos/proteínas indicadora de tamaño de partícula<sup>24</sup> no demostró diferencias significativas entre ambos grupos. Como la composición porcentual de VLDL y el tamaño de partículas no mostraron diferencias entre grupos, la mayor concentración plasmática de VLDL sólo puede explicarse por un mayor número de partículas en MPM que en Controles<sup>24</sup>. Esta mayor concentración de VLDL se debería a una mayor producción o a una más lenta depuración por los receptores hepáticos, determinados éstos por la concentración de estrógenos como se ha reportado en animales<sup>7</sup> y en células de hepatoma humano<sup>6</sup>.

Así, el aumento de los niveles de VLDL se asociaría con el alargamiento del tiempo de residencia plasmática de los remanentes de VLDL<sup>27</sup> determinando un aumento en la susceptibilidad aterogénica<sup>11, 28</sup>. La IDL total, también mostró

aumento en su concentración plasmática en MPM vs Controles. Los valores de IDL total en Controles son coincidentes con los observados por Austin y Williams<sup>11, 29</sup> para el fenotipo A, en tanto que las MPM presentan valores comparables con el fenotipo B de los mismos autores. El aumento en la concentración plasmática de IDL total en MPM, fue a expensas de triglicéridos, colesterol y proteínas. Como el tamaño de las partículas no parece diferir entre grupos, a juzgar por la relación triglicéridos/proteínas, se deduce que hubo mayor número de partículas de IDL en el grupo MPM<sup>24</sup>.

Debe notarse que la internalización en la íntima arterial de IDL es de igual magnitud que la de LDL<sup>30</sup>. Por otro lado se cuestiona la capacidad de las IDL para abandonar la íntima arterial una vez que han entrado en ella<sup>31</sup>, lo cual confirma la aterogenicidad de esta lipoproteína.

En lo que respecta a las subespecies de IDL, se reconoce que éstas son estructural y metabólicamente heterogéneas, coexistiendo partículas con distintas propiedades fisicoquímicas<sup>2, 12</sup>. Dentro de estas subespecies las IDL más pequeñas y densas presentarían un mayor tiempo de residencia plasmática por lo cual están expuestas a una mayor modificación biológica<sup>12</sup>.

Es interesante señalar que el aumento en la concentración plasmática de IDL total en el grupo de MPM se debe al incremento en IDL-2 dado que la concentración plasmática de IDL-1 fue semejante en ambos grupos. Sin embargo encontramos diferencias entre ambos grupos en la distribución porcentual de los componentes de IDL-1, porque en las MPM hubo un aumento en el contenido de triglicéridos y una disminución en el de fosfolípidos. A su vez IDL-2 no sólo mostró mayor concentración plasmática a expensas de colesterol, triglicéridos y proteínas totales en MPM, sino también un incremento en el porcentaje de colesterol y proteínas y una disminución en fosfolípidos, este último debe ser estudiado más profundamente.

Utilizando la relación triglicéridos/proteínas como evaluador de tamaño, sugerimos que el tamaño de IDL-1 es mayor en ambos grupos que el de IDL-2. En cambio no hubo diferencias entre grupos comparando cada subespecie con su contraparte. En consecuencia, la mayor concentración plasmática de IDL-2 en MPM se explicaría por un mayor número de partículas, capaz de

generar un mayor número de moléculas de LDL, lo cual configura el tipo B de Austin<sup>11</sup>. A medida que el número de receptores a LDL disminuye por déficit de estrógenos se incrementaría la proporción de IDL que se convierte a LDL<sup>32, 33, 34</sup>.

En el grupo de Controles se obtuvo una correlación inversa significativa entre la actividad de Lipoproteína Lipasa y triglicéridos-IDL total y triglicéridos-IDL-2. El hallazgo en Controles confirma que los triglicéridos de IDL serían hidrolizados por la Lipoproteína Lipasa, tal como lo demostramos experimentalmente en otro trabajo<sup>13</sup>. En cambio en MPM, la concentración de triglicéridos en ambas fracciones de IDL está determinada por una mayor oferta de triglicéridos-VLDL borrando la relación entre componentes de IDL y actividad de Lipoproteína Lipasa. Si bien se podría esperar un aumento en la actividad de la Lipasa Hepática por disminución de los estrógenos, no hubo diferencias significativas en la actividad de la enzima entre ambos grupos, en coincidencia con los resultados observados previamente por Applebaum<sup>35</sup> y por nosotros<sup>3</sup>. Otros autores tampoco encontraron diferencias en la actividad de Lipasa Hepática en la post-menopausia sugiriendo que su regulación no depende de los bajos niveles de esteroides sexuales que se encuentran en las pacientes<sup>14</sup>.

En resumen el análisis cuali y cuantitativo de las lipoproteínas, muestra un perfil más aterogénico con aumento en la concentración y en el número de partículas de VLDL, de IDL total y específicamente IDL-2 las cuales podrían ser precursoras de partículas de LDL más densas y características del fenotipo B.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido subvencionado en parte con el subsidio FA 035 de la Universidad de Buenos Aires, Programación 1995-1997.

## Summary

*Very low density lipoproteins and subclasses of intermediate density lipoproteins in postmenopausal women*

Post menopausal women present an increase of cardiovascular risk associated with the atherogenic plasma lipoproteins IDL and LDL. Our purpose was to study the composition of VLDL, IDL and the subfractions IDL-1 and IDL-2, and the Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase activi-

ties in a group of twelve healthy post menopausal women as compared with eleven fertile controls. The mean values of total cholesterol and LDL cholesterol were significantly increased in the post menopausal group compared to the controls ( $p < 0.005$  and  $p < 0.001$  respectively). The contribution of the HDL-cholesterol plasma concentration to total cholesterol was lower in the postmenopausal women ( $p < 0.02$ ) although no one had HDL-cholesterol lower than 35 mg/dl and the mean value was 50 mg/dl. Postmenopausal women had increased concentrations of VLDL, total IDL and IDL-2 compared to controls ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$  and  $p < 0.001$  respectively).

Plasma concentrations of total IDL was increased in postmenopausal women ( $33.6 \pm 3.4$  vs  $22.6 \pm 0.8$  mg/dl,  $p < 0.005$ ). The increase in total IDL was due to IDL-2 ( $19.9 \pm 1.7$  vs  $11.5 \pm 0.8$  mg/dl,  $p < 0.001$ , in postmenopausal women vs controls). The IDL-2 subfraction was  $60 \pm 2.6\%$  of total IDL in postmenopausal women and  $51 \pm 2.0\%$  in controls ( $p < 0.02$ ).

In postmenopausal women and in controls the ratio triglyceride/protein (which indicates particles size) was significantly higher in IDL-1 than in IDL-2 ( $p < 0.005$  and  $p < 0.01$  respectively), but this ratio did not show differences when VLDL, total IDL and IDL-2 were compared between postmenopausal and control women. Then, the increased plasma concentration of these lipoproteins would show an increased number of particles in the postmenopausal women vs controls.

There were no differences in the Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase activities between both groups. Lipoprotein Lipase vs total IDL-triglycerides and IDL-2-triglycerides showed a significant inverse correlation in controls ( $p < 0.05$ ) but not in postmenopausal women.

We conclude that the qualitative and quantitative study of the lipoproteins shows a more atherogenic profile in the postmenopausal group, with an increase in the concentration and number of particles of VLDL, total IDL and IDL-2.

## Bibliografía

1. Lerner D, Kannel W. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1986; 111: 383-90.
2. Krauss R. Relationship of intermediate and low density lipoprotein subspecies to risk of coronary artery disease. *Am Heart J* 1987; 113: 578-82.
3. Halperín H, Berg G, Wikinski R, et al. Lipoproteínas de densidad intermedia y lipasa hepática en mujeres post-menopáusicas. *Medicina (Buenos Aires)*

- 1992; 52: 213-9.
4. Schreier L, Berg G, Rosental S et al. Colesterol de IDL y/o colesterol de  $\beta$ -VLDL: Un nuevo parámetro en diferentes fenotipos lipoproteicos. *Acta Bioq Clin Latinoam*. 1993; 27: 65-74.
  5. Tatami R, Mabuchi H, Ueda K et al. Intermediate density lipoprotein and cholesterol-rich very low density lipoprotein in angiographically determined coronary artery disease. *Circulation* 1981; 64: 1174-84.
  6. Arca M, Lena Vega G, Grundy S. Hypercholesterolemia in post-menopausal women. *JAMA*, 1994; 271: 453-9.
  7. Ma PT, Yamamoto T, Goldstein J, Brown M. Increased mRNA for low density lipoproteins receptor in liver for rabbit treated with 17- $\alpha$ -ethinyl estradiol. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 792-6.
  8. Williams J, Adams M, Klopfenstein H. Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 1990; 81: 1680-7.
  9. Keane JF, Shwaery GT, Xu Aiming et al. 17  $\beta$ -Estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation* 1994; 89: 2251-9.
  10. Kannel WB. Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: Perspectives from the Framingham Study. *Am Heart J*, 1987; 113: 413-9.
  11. Austin M, King MC, Vranizan K, Krauss R. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*, 1990; 82: 495-506.
  12. Musliner T, Krauss R. Lipoprotein subspecies and risk of coronary disease. *Clin Chem* 1988; 34: 78-83.
  13. Schreier L, Wikinski R. Production of low density lipoprotein like particles by ray limb perfused with low and intermediate density lipoproteins. *Diab Nutr Metab*, 1993; 6: 3-12.
  14. Wakatsuki A, Sagara Y. Lipoprotein metabolism in postmenopausal and oophorectomized women. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 523-8.
  15. Tikkanen MJ, Nikkila EA, Kuusi T, Sipinen S. High density lipoprotein-2 and hepatic lipase: Reciprocal changes produced by estrogen and Norgestrel\*. *J Clin End Metab* 1982; 54: 1113-7.
  16. Assman G, Schriewer H, Schmitz G, et al. Quantification of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid-MgCl<sub>2</sub>. *Clin Chem* 1983; 29: 2026-9.
  17. Wieland H, Seidel D. A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1983; 24: 904-9.
  18. Francone O, Basilico MZ, Lombardo Y. Evaluación de las condiciones de ensayo de la actividad lipolítica pos-heparínica triglicérido lipasa hepática. *Acta Bioq Clin Latinoam*, 1984; 18: 259-67.
  19. Baginsky ML, Brown WV. A new method for the measurement of lipoprotein lipase in post-heparin plasma using sodium dodecyl sulfate for the inactivation of hepatic triglyceride lipase. *J Lipid Res*, 1979; 20: 548-56.
  20. Carlson LA, Holmquist L, Nilsson-Ehle P. Deficiency of hepatic lipase activity in post-heparin plasma in familial hipertriglyceridemia. *Acta Med Scand* 1986; 219: 435-47.
  21. Schumaker VN, Puppione DL. Sequential flotation ultracentrifugation in: Segrest JP Albers JJ (eds), *Methods in Enzymology* vol 128. London: Academic Press, 1986; pp 155-70.
  22. Noble R. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarosa gel. *J Lipid Res* 1968; 9: 693-7.
  23. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
  24. Georgopoulos A, Rosengard AM. Abnormalities in the metabolism of postprandial and fasting triglyceride-rich lipoprotein subfractions in normal and insulin-dependent diabetic subjects: effects of sex. *Metabolism*, 1989; 38: 781-9.
  25. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of high blood cholesterol in adults (S.M. Grundy, Chairman). The second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *Circulation* 1994; 89: 1329-445.
  26. Castelli WP. The triglyceride issue, A view from Framingham. *Am Heart J* 1986; 112: 432-7.
  27. Krauss R. The Tangled Web of coronary risk factors. *Am J Med* 1991; 92: 36-41.
  28. Austin M, Breslow J, Hennekens C, et al. Low density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260: 1917-21.
  29. Williams P, Vranizan K, Krauss R. Correlations of plasma lipoproteins with LDL subfractions by particle size in men and women. *J Lipid Res* 1992; 33: 765-74.
  30. Shaikh M, Wootton R, Nordestgaard BG, et al. Quantitative studies of transfer in vivo of low-density, Sf 12-60, and Sf 60-400 lipoproteins between plasma and arterial intima in humans. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 569-77.
  31. Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. IDL, VLDL, Chylomicrons and atherosclerosis. *Eur J Epidemiol* 1992; 2: 92-8.
  32. Vega L, Denke MA, Grundy S. Metabolic basis of primary hypercholesterolemia. *Circulation* 1991; 84: 118-28.
  33. Gotto A. Hypertriglyceridemia: Risk and perspectives. *Am J Cardiol* 1992; 70: 19-25.
  34. Grundy S. Role of low density lipoprotein in atherogenesis and development of coronary heart disease. *Clin Chem* 1995; 41: 139-46.
  35. Applebaum-Bowden D, Haffener S, Wahl D. Post-heparin plasma triglycerides lipases. Relationship with very low density lipoprotein triglycerides and high density lipoprotein-2 cholesterol. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 273-82.