

## Disminución de la afinidad entre proteoglicanos arteriales y LDL aislada de fumadores y no fumadores por administración de vitaminas E y C.

Luz Barón<sup>1</sup>, Eduardo Romero-Vecchione<sup>2</sup> y Flor López<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Cátedra de Bioquímica, Laboratorio de Lipoproteínas y

<sup>2</sup>Cátedra de Farmacología. Laboratorio de Estudios Cardiovasculares, Escuela de Medicina José María Vargas, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela y

<sup>3</sup>Centro de Bioquímica y Biofísica, Laboratorio de Trombogénesis, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas – IVIC, Caracas. Venezuela.

Palabras clave: LDL oxidada, vitamina E, vitamina C, proteoglicanos arteriales, aterosclerosis.

Resumen. La interacción de la LDL con proteoglicanos arteriales y la modificación oxidativa de esta lipoproteína están relacionadas con la aterogénesis. El objetivo del presente estudio fue evaluar en fumadores el efecto de la administración individual de vitamina E y de vitaminas E y C sobre la afinidad de la LDL por proteoglicanos (PGs) arteriales. Veinte sujetos sanos fumadores y diez no fumadores recibieron por vía oral placebo de ambas vitaminas por 15 días, luego recibieron 400 mg/d de vitamina E y placebo de vitamina C por 30 días y finalmente se les administró simultáneamente 400 mg/d de vitamina E y 1000 mg/d de vitamina C durante 30 días. Al final de la administración de la vitamina E, la afinidad de la LDL por PGs arteriales disminuyó 19,3% en los fumadores y 25,2% en los no fumadores. La disminución de dicha interacción con la administración simultánea de las vitaminas E y C fue de hasta un 25,6% en los fumadores y 30,1% en los no fumadores. En conclusión, la administración simultánea de las vitaminas E y C mostró un efecto sinérgico, al disminuir en mayor proporción la afinidad de la LDL por los proteoglicanos arteriales, en comparación con la administración individual de la vitamina E. Estos hallazgos indican un efecto antiaterogénico potencial de estas vitaminas antioxidantes.

## Reduction of artery proteoglycans affinity for LDL isolated from smokers after E and C vitamins administration.

*Invest Clin 2004; 45(2): 159 - 174*

Key words: Oxidized LDL, vitamin E, vitamin C, artery proteoglycans, atherosclerosis.

**Abstract.** LDL interaction with arterial proteoglycans and its oxidative modification is closely related to atherosclerosis. The objective of the present study was to examine the effect of the individual administration of vitamin E and a combination of vitamin E and C on LDL affinity for arterial proteoglycans in smokers and non-smokers subjects. Twenty smokers and ten non-smokers healthy subjects received by the oral route placebos of vitamins E and C for 15 days; then vitamin E (400 mg/d) for 30 days and finally vitamin E plus vitamin C (1000mg/d) during the following 30 days. During the vitamin E supplementation period, the affinity of LDL for arterial proteoglycans decreased 19.3% in smokers and 25.2% in non-smokers. When the subjects received vitamin E plus vitamin C, the affinity of LDL for arterial proteoglycans decreased 25.6% and 30.1% in smokers and non-smokers respectively. In conclusion, simultaneous administration of vitamins E and C showed a synergistic effect to diminish the affinity of the LDL by arterial proteoglycans, that was greater than caused by the administration of vitamin E alone. These findings suggest a potential antiatherogenic effect of both antioxidant vitamins.

*Recibido: 19-06-2003. Aceptado: 04-12-2003.*

### INTRODUCCIÓN

La interacción, *in vitro*, de la lipoproteína de baja densidad (LDL) con el proteoglicano (PG) arterial aislado de íntima-media de aorta humana induce alteraciones estructurales en dicha lipoproteína (LP) que permanecen aún después de la disociación del complejo, entre ellas, una disminución en la organización del núcleo y de la monocapa de la LP, un aparente aumento en la exposición de los aminoácidos arginina y lisina y un aumento en la susceptibilidad a la oxidación (1-3). Algunas de estas modificaciones podrían ayudar a explicar el origen de las células espumosas ya que la LDL se une con el PG arterial formando complejos insolubles que son captados por los macrófagos (4).

En 1949, Faber (5) demostró que el colesterol transportado en plasma por las lipoproteínas se localizaba en la íntima arterial unido a glicosaminoglicanos (GAG) del tipo condroitín sulfato (CS) y que este hecho podía contribuir al desarrollo de la lesión aterosclerótica.

La interacción entre la LDL y el PG ha permitido sugerir que los PGs podrían retener a la LDL en la matriz extracelular, lo que favorecería la aparición de modificaciones estructurales (2), hidrolíticas (6,7) y oxidativas (8) de la lipoproteína que haría a las LDL agentes altamente citotóxicos iniciadores de la respuesta del tejido, todo lo cual culminaría en una lesión proliferativa de la íntima y media arterial.

Las LDL interactúan con los PGs a través de la asociación entre los grupos sulfato

de los GAG, cargados negativamente, y las cargas positivas de los aminoácidos lisina y arginina de la apo B100 de la LDL (9,10); por otra parte la LDL pequeña y densa aislada de pacientes con hipertrigliceridemia moderada y baja HDL, definido como el "fenotipo lipoproteico aterogénico" presenta alta afinidad por los PGs aislados de arteria humana (11,12).

Los pacientes con enfermedad coronaria aguda y crónica que sufrieron un infarto de miocardio antes de los 50 años de edad presentaron una LDL con alta afinidad por PGs de condroitín sulfato (13, 14). Esta alta afinidad estaba asociada con subclases de LDL enriquecidas en partículas de alto punto isoeléctrico. Las LDL con mayor afinidad por el PG eran pequeñas, densas, pobres en lípidos polares en la superficie y cargadas más positivamente que aquellas que presentaban baja afinidad (15).

No está claro aún como se determinan muchas de las propiedades estructurales que modulan la afinidad de la LDL por el PG rico en condroitín sulfato, llamado versican, pero si se ha observado que la dieta y ciertas drogas pueden modificar estas propiedades. Cuando a los pacientes se les cambia de una dieta rica en aceite de oliva a una dieta rica en aceite poliinsaturado, se incrementa el tamaño de la LDL y disminuye su afinidad, *in vitro*, por el PG arterial (16). Ciertas drogas que disminuyen los niveles de LDL, por ejemplo la simvastatina y el gemfibrozil, disminuyen la afinidad de la LDL por el PG, lo que sugiere que parte de la acción antiaterogénica de estas drogas puede estar asociada con una disminución en la actividad de retención de la LDL por los PGs de la íntima arterial (17).

Los PGs son un grupo de macromoléculas complejas y diversas que están presentes en todos los tejidos y son sintetizados por todas las células (18). En los vasos sanguíneos se han identificado 3 familias principales de PGs: de condroitín sulfato

(PGCS), de dermatán sulfato (PGDS) y de heparán sulfato (PGHS). La alta densidad de carga negativa de los PGs los convierte en las macromoléculas más aniónicas de los seres vivos lo cual les facilita interactuar con proteínas ricas en aminoácidos cargados positivamente como lisina y arginina, siendo los PGCS los principales componentes de la íntima de las grandes arterias.

La íntima arterial normal y las regiones con predisposición al desarrollo de la lesión aterosclerótica son ricas en versican y el contenido de este PG aumenta a medida que avanza la lesión y predispone a la pared arterial a la acumulación de lípidos, a la calcificación y a la trombosis debido a la propiedad de estos PGs de interactuar con componentes moleculares implicados en estos procesos. Por lo general no hay aterosclerosis en venas, arterias pulmonares, arterias abdominales sino básicamente en aorta y en arterias coronarias lo que sugiere que este hallazgo debe estar relacionado con la composición de los PGs de estas zonas (18).

Por otro lado, la hipótesis de la modificación oxidativa de la LDL puede ayudar a explicar la asociación que existe entre fumar, proceso aterogénico y enfermedades cardiovasculares, ya que el fumar induce estrés oxidativo y este se reconoce como un factor de riesgo primario en la aterosclerosis y en el desarrollo de enfermedades coronarias (19). El mecanismo parece incluir modificaciones oxidativas de la LDL, haciéndolas más aterogénicas (20, 21). También se ha reportado una disminución en los niveles plasmáticos de betacarotenos y de vitamina C en los fumadores (22) y se ha demostrado que la LDL de fumadores es reconocida y captada por macrófagos en un mayor grado que la LDL de los no fumadores (20).

Evidencias experimentales y epidemiológicas sugieren que la iniciación de la aterosclerosis está relacionada con la modifi-

cación oxidativa de la LDL (23) la cual es protegida contra la oxidación por sus antioxidantes endógenos (24). La oxidación sólo puede iniciarse cuando se han agotado todos éstos antioxidantes (25), principalmente la vitamina E, cuyo contenido en la LDL es preservado por los niveles de vitamina C del plasma. La modificación oxidativa de la LDL ocurre en las lipoproteínas que tienen disminuido el nivel de vitamina E y se ha demostrado que cuando la LDL contiene siete veces más vitamina E que lo usual, ésta necesita el doble de tiempo para sufrir la oxidación (26). Las evidencias sugieren que la modificación oxidativa de la LDL y su afinidad por PGs presentes en la íntima y media arterial podrían ser eventos claves en el inicio del proceso aterogénico, principalmente en los fumadores porque el hábito tabáquico promueve el estrés oxidativo y disminuye los antioxidantes endógenos (22).

En el presente trabajo se decidió evaluar si la administración simultánea de las vitaminas E y C, a fumadores y no fumadores, podía disminuir *in vitro* la afinidad de la LDL por PGs arteriales y si esta disminución era mayor que cuando se administraba sólo vitamina E.

## SUJETOS Y MÉTODOS

### Sujetos

La muestra estuvo constituida por 30 voluntarios sanos, normotensos y normolipidémicos, 20 fumadores y 10 no fumadores, de sexo masculino y femenino, cuyas edades oscilaron entre 25 y 45 años de edad. A los voluntarios se les hizo una historia clínica para obtener datos como peso, estatura, índice de masa corporal (IMC), hábitos tabáquicos, uso de medicamentos, ingesta de vitaminas, hábitos alimenticios, actividad física, antecedentes familiares y presencia de alguna patología como hipertensión, diabetes, enfermedad cardíaca, infarto o accidentes cerebrovasculares.

Criterios de exclusión: 1) haber tomado vitaminas E y C u otros suplementos vitamínicos 6 meses antes del estudio. 2) consumo de alcohol superior a 60 mL de etanol/semana. 3) glicemia, pruebas de función renal y hepática anormales. 4) perfil lipídico anormal o estar tomando medicamentos que lo pudieran alterar (p.e. drogas hipolipidémicas, hormonas tiroideas o anticonceptivos orales), 5) hipertensión arterial, 6) IMC > 32 Kg/m<sup>2</sup>, 7) mujeres embarazadas y post menopáusicas. Criterios de inclusión: 1) Sujetos fumadores de más de 10 cigarrillos al día, con un tiempo mínimo de 10 años fumando. 2) Con un nivel de ejercicio físico mantenido inalterable durante la participación en el estudio. 3) Firma del consentimiento escrito.

### Administración de las vitaminas E y C

La vitamina E fue administrada en cápsulas blandas de 400 mg de  $\alpha$ -tocoferol en aceite de germen de trigo, el grupo control recibió cápsulas de placebo con aceite de germen de trigo. Las cápsulas fueron mantenidas en frascos de plástico protegidas de la luz hasta el momento de su uso. La vitamina C fue administrada en forma de tabletas efervescentes de 500 mg de ácido ascórbico y en tabletas placebo que contenían sólo ácido cítrico. Toda la vitamina E, la vitamina C y los placebos correspondientes fueron suministrados gentilmente por Laboratorios Roche de Venezuela.

### Diseño del estudio

La administración de las vitaminas y el placebo correspondiente se hizo al azar, a doble ciego y controlado por placebo. El protocolo de estudio incluyó tres fases continuas: En la 1ª fase 20 fumadores y 10 no fumadores recibieron los placebos de las vitaminas E y C durante 15 días (Período A). Inmediatamente se dió inicio a la 2ª fase en la cual tanto los fumadores como los no fumadores recibieron vitamina E (400 mg/d)

y placebo de vitamina C durante 30 días (Período B). Finalmente en la 3ª y última fase los dos grupos recibieron simultáneamente vitamina E (400 mg/d) y vitamina C (1000 mg/d) por 30 días más (Período C). Los participantes no conocían la dosis que estaban recibiendo, no tuvieron limitaciones en sus hábitos alimenticios ni tabáquicos a través del estudio. Los pacientes fueron evaluados en la consulta externa del Laboratorio de Estudios Cardiovasculares de la Escuela de Medicina "J.M. Vargas", Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

#### Obtención del plasma humano

Al finalizar los períodos A, B y C fueron tomadas las muestras de sangre de la vena antecubital, luego de un ayuno de 14 horas, en tubos Vacutainer. El plasma se obtuvo por centrifugación a 1000g durante 30 minutos y fue dividido en alícuotas, una parte fue guardada en oscuridad a 4°C para las evaluaciones químicas y de la vitamina E, el resto fue congelado a -80°C, protegido de la luz, para luego aislar la LDL. Las muestras congeladas fueron analizadas en un tiempo menor de 30 días.

#### Evaluaciones químicas

Se determinaron las concentraciones de colesterol total, colesterol de la LDL, colesterol de la HDL y triglicéridos mediante el uso de los Kit de Wiener Lab (Argentina). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (27). Los ácidos urónicos presentes en los PGs arteriales se determinaron utilizando los métodos de Dische (28) y Bitter y Muir (29). La vitamina E en plasma y en LDL fue determinada según el método espectrofotométrico diseñado por Hashim y Schuttringer (30). La vitamina C en plasma fue determinada espectrofotométricamente después de la derivatización con 2,4 dinitrofenilhidrazina (31).

#### Aislamiento de la LDL del plasma humano

Las LDL fueron aisladas por ultracentrifugación secuencial en KBr, según el método de Schumaker y Puppione (32). Brevemente consistió en el aislamiento de las lipoproteínas en soluciones de bromuro de potasio (KBr) de densidades 1,006 g/mL y 1,063 g/mL en un tampón de Tris-HCl 25 mM pH 8. La muestra de plasma se colocó en tubos de centrifuga con capacidad de 10 mL, se ajustó hasta ese volumen con una solución de densidad 1,006 g/mL en KBr y se centrifugó a 40.000 r.p.m. durante 18 horas a 4°C. Después de la centrifugación, una banda de VLDL en la parte superior del tubo fue descartada y se completó el volumen del tubo con solución de KBr de densidad 1,063 gr/mL, se centrifugó nuevamente a 40.000 r.p.m. durante 18 horas a 4°C. Luego de la centrifugación se obtuvo en la parte superior del tubo una banda de LDL (2-3 mL) que fue transferida a un nuevo tubo y guardada a -80°C, en presencia de KBr y en la oscuridad para protegerla de la oxidación. En el momento de ser utilizadas, éstas LDL se dializaron con tampón Hepes de baja fuerza iónica que contenía 5 mM Hepes, 20 mM NaCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2. A estas LDL dializadas se les determinó el contenido de colesterol, triglicéridos, proteínas, vitamina E y susceptibilidad a la oxidación. Princen y col. (33) no encontraron diferencias en estos parámetros cuando se realizó el procedimiento con plasma congelado a -80°C o con plasma fresco.

#### Obtención de los proteoglicanos arteriales

Las aortas humanas fueron obtenidas en la Medicatura Forense del Instituto de Medicina Legal, durante la autopsia de individuos fallecidos por causas accidentales. La íntima-media de la aorta se mantuvo a -20°C en una solución tampón de NaCl 0,15 M, Tris-HCl 5 mM pH 7,4, con Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 mM, FFMS 0,2 mM, ácido

-amino caproico 10 mM y thimerosal 0,1% (p/v). Los PGs se aislaron de la aorta siguiendo el método de Camejo y col. (34), se cortaron 20 g de íntima-media en trozos pequeños, se dejaron por 24 horas con 15 volúmenes de solución de extracción que contenía úrea 6 M, NaCl 1 M en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, EDTA 10 mM, ácido -amino caproico 10 mM, PMSF 0,2 mM y Benzamidina-HCl 5 mM. Se centrifugó a 100.000 r.p.m. durante 1 hora a 4°C. El sedimento se descartó y el sobrenadante se dializó por 48 horas, a 4°C, con 4 volúmenes de urea 6 M. El producto dializado fue purificado por cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE Sephacell equilibrada con un tampón que contenía úrea 6 M, NaCl 0,25 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, acetato 0,05 M, pH 6,2. A la columna se le pasaron 100 mL de un gradiente lineal de NaCl 0,25-1 M a una velocidad de 20 mL/h. Se colectaron fracciones de 1 mL, se determinó la absorbancia a 280 nm y se obtuvieron 2 picos que fueron dializados; la mayor afinidad por la LDL se encontró en el segundo pico, el cual fue sometido a electroforesis en acetato de celulosa en CaCl<sub>2</sub> 0,2 M obteniéndose una sola banda en una posición similar a la del condroitín-6-sulfato. Este PG se caracterizó y contenía 60-65% de condroitín-6-sulfato, 10-20% de condroitín-4-sulfato y 10-20% de dermatán sulfato y se llamó PG rico en condroitín sulfato (PGCS), hoy en día conocido como versican. Se determinó su contenido de ácidos urónicos y se guardó a -20°C hasta su uso.

#### Interacción entre la LDL y el proteoglicano arterial

La LDL aislada del paciente y el PG aislado de la aorta fueron equilibrados con tampón de baja fuerza iónica compuesto por Hepes 5 mM, NaCl 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7,2. La afinidad de la LDL por el PG se determinó según el método diseñado por Camejo y col. (34) para

ello se midió la interacción entre 1 mL de PG (10 µg de hexuronato) con 100 µL de LDL (200 µg de colesterol). Estos volúmenes se colocaron en tubos cónicos de polialómero con tapa, se agitaron fuertemente y se incubaron 1 hora a 4°C, luego se centrifugaron a 10.000 r.p.m. por 10 minutos. El sobrenadante con LDL no precipitada fue descartado y el sedimento se lavó con 1 mL de tampón y se centrifugó por 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento con el complejo LDL-PG se resuspendió en 100 µL de tampón de alta fuerza iónica y se determinó el contenido de colesterol, el cual corresponde a la LDL que ha sido precipitada por el PG. Cada muestra fue analizada por duplicado y un tubo con tampón solamente fue usado como blanco de la reacción. Los resultados se expresaron en µg de colesterol insolubilizado y como porcentaje del total.

#### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética de los valores individuales ± la desviación estándar. Algunas diferencias entre los grupos fueron expresadas como porcentaje. Los valores basales iniciales y los cambios en estos valores durante el período de administración de las vitaminas antioxidantes fueron comparados mediante la prueba "t" de Student y la corrección de Bonferroni. El criterio de significación estadística fue del 5% ( $p < 0,05$ ). Para el análisis de las correlaciones se utilizó el mismo criterio de significación con un coeficiente de regresión mayor o igual a  $\pm 0,5$  ( $r > \pm 0,5$ ). Las diferencias en los resultados de afinidad entre los grupos de fumadores y no fumadores fueron evaluadas utilizando un análisis de varianza.

## RESULTADOS

La edad promedio de los fumadores fue de  $38,8 \pm 5,9$  años (media ± DS) y la de los no fumadores de  $31,6 \pm 7,5$  años. No

hubo diferencias significativas entre los grupos en relación a edad, peso, IMC y presión arterial. En cuanto a los hábitos tabáquicos, los fumadores tenían un promedio de  $18,3 \pm 6,5$  años fumando y el consumo diario de cigarrillos fue de  $17,9 \pm 8,9$  cigarrillos, es decir, que fumaron al menos 10 cigarrillos al día por espacio de 10 años (Tabla I). Todos los participantes eran normocolesterolémicos, con un promedio de colesterol en los fumadores de  $177,7 \pm 27,7$  mg/dL y en los no fumadores de  $169,8 \pm 31,5$  mg/dL.

En el perfil lipídico de fumadores y no fumadores, al finalizar los períodos A (placebo), B (vitamina E) y C (vitaminas E y C) se observó un ligero incremento, no significativo ( $p > 0,05$ ) del colesterol plasmático y del colesterol-LDL. Los triglicéridos plasmáticos también aumentaron pero fue significativo solo en los fumadores durante el período C con relación al período B (Tabla II).

La concentración plasmática de  $\alpha$ -tocoferol luego del placebo fue de  $21,2 \pm 4,2$   $\mu$ M en los fumadores y de  $22,9 \pm 2,9$   $\mu$ M en los no fumadores. Al final del período B los niveles se elevaron significativamente siendo este aumento 36% mayor en los sujetos no fumadores. Al final del período C el nivel

de  $\alpha$ -tocoferol fue de  $61,9 \pm 6,5$   $\mu$ M en los fumadores y de  $80,5 \pm 5,4$   $\mu$ M en los no fumadores, es decir, un incremento de 2,9 veces en los fumadores y de 3,5 veces en los no fumadores con relación al período placebo (Tabla III).

La concentración de  $\alpha$ -tocoferol en la partícula de LDL, luego del placebo fue de  $5,3 \pm 0,9$  nmol/mg de proteína en los fumadores y de  $5,6 \pm 0,6$  nmol/mg de proteína en los no fumadores. Al final del período B los niveles se elevaron significativamente siendo este aumento 23% mayor en los no fumadores. Al final del período C fue de  $18,5 \pm 0,8$  nmol/mg de proteína en los fumadores y de  $21,1 \pm 0,5$  nmol/mg de proteína en los no fumadores (Tabla III). El incremento de  $\alpha$ -tocoferol en la LDL se correlacionó positivamente con el aumento en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma ( $r = 0,97$   $p < 0,05$ ). Respecto al ascorbato plasmático, el nivel basal fue de  $37,4 \pm 3,4$   $\mu$ M en los fumadores y de  $45,1 \pm 6,8$   $\mu$ M en los no fumadores, es decir, los fumadores tenían una concentración basal de ascorbato 17% menor que la de los no fumadores. Al final del período B los niveles fueron parecidos a los basales y al final del período C aumentaron significativamente a  $71,4 \pm 6,6$   $\mu$ M en los

TABLA I  
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE FUMADORES Y NO FUMADORES

	Fumadores (N = 20)	No Fumadores (N = 10)
Edad (Años)	$38,8 \pm 5,9$	$31,6 \pm 7,5$
Peso (Kg)	$66,1 \pm 14,0$	$66,8 \pm 14,9$
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	$24,8 \pm 4,3$	$25,0 \pm 3,9$
PAD (mm Hg)	$77,2 \pm 10,6$	$77,3 \pm 11,8$
PAS (mm Hg)	$116,2 \pm 11,4$	$113,6 \pm 13,0$
FC (pulsaciones/min)	$75,3 \pm 10,2$	$68,3 \pm 8,4$
Cigarrillos/día	$17,9 \pm 8,9$	0,0
Años fumando	$18,3 \pm 6,5$	0,0

Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar. IMC: índice de masa corporal. PAD: presión arterial diastólica. PAS: presión arterial sistólica. FC: frecuencia cardíaca.

TABLA II  
COMPORTAMIENTO DEL PERFIL LIPIDICO DE FUMADORES Y NO FUMADORES CON  
TRATAMIENTO DE VITAMINA E Y VITAMINAS E Y C

	Período A	Período B		Período C	
	Placebo de E + C	Vitamina E + Placebo de C		Vitamina E + Vitamina C	
			p B vs A		p C vs B
Col Total (mg/dL)					
Fumadores	180,5 ± 16,0	182,4 ± 12,5	ns	185,2 ± 17,8	ns
No Fumadores	181,1 ± 19,3	184,2 ± 17,2	ns	186,2 ± 14,7	ns
LDL Col (mg/dL)					
Fumadores	106,0 ± 18,3	120,2 ± 10,5	ns	124,2 ± 8,5	ns
No Fumadores	112,0 ± 18,6	116,8 ± 5,4	ns	119,2 ± 6,9	ns
HDL Col (mg/dL)					
Fumadores	43,0 ± 9,9	42,3 ± 9,8	ns	46,2 ± 6,5	ns
No Fumadores	47,2 ± 12,5	43,0 ± 8,1	ns	48,2 ± 5,8	ns
TG (mg/dL)					
Fumadores	101,2 ± 25,9	107,8 ± 23,1	ns	142,6 ± 31,2	0,01*
No Fumadores	98,2 ± 18,7	118,4 ± 21,2	ns	149,0 ± 22,5	ns

Los valores representan la media ± la desviación estándar. Los valores de p son calculados usando la prueba t de Student. \* representa valores estadísticamente significativos con una p < 0,05.

TABLA III  
NIVEL DE ANTIOXIDANTES EN PLASMA Y EN LDL DE FUMADORES Y NO FUMADORES  
CON TRATAMIENTO DE VITAMINA E Y DE VITAMINAS E y C

	Período A	Período B		Período C	
	Placebo de E + C	Vitamina E + Placebo de C		Vitamina E + Vitamina C	
			p B vs A		p C vs B
-tocoferol en plasma (µmol/L)					
Fumadores	21,2 ± 4,2	41,3 ± 2,5	< 0,05	61,9 ± 6,5	< 0,05
No Fumadores	22,9 ± 2,9	56,2 ± 2,4	< 0,05	80,5 ± 5,4	< 0,05
-tocoferol en LDL (nmol/mg de prot)					
Fumadores	5,3 ± 0,9	11,4 ± 0,6	< 0,05	18,5 ± 0,8	< 0,05
No fumadores	5,6 ± 0,6	14,1 ± 0,2	< 0,05	21,1 ± 0,5	< 0,05
Ascorbato en plasma (µmol/L)					
Fumadores	37,4 ± 3,4	38,5 ± 7,1	ns	71,4 ± 6,6	< 0,05
No Fumadores	45,1 ± 6,8	49,2 ± 13,3	ns	91,3 ± 8,2	< 0,05

Los valores representan la media ± la desviación estándar. Los valores de p son calculados usando la prueba t de Student. Fumadores n = 20, No fumadores n = 10.



fumadores y a  $91,3 \pm 8,2 \mu\text{M}$  en los no fumadores, es decir, un incremento de casi el doble con relación al período placebo (Tabla III) y 27,8 % mayor en los sujetos no fumadores comparado con los fumadores.

#### Afinidad de la LDL por PGs arteriales al administrar vitamina E y vitaminas E y C

En los fumadores, luego del período placebo, se determinó la afinidad de la LDL por el PG arterial y se obtuvo que el PG precipitó  $38,3 \pm 2,9 \mu\text{g}$  de colesterol de la LDL, lo cual constituyó el valor basal de afinidad para los fumadores (Tabla IV). Las LDL de los fumadores que recibieron vitamina E disminuyeron su afinidad y el PG precipitó  $30,9 \pm 0,5 \mu\text{g}$  de colesterol de la LDL. Luego de la administración de las vitaminas E y C, el PG precipitó  $28,6 \pm 0,7 \mu\text{g}$  de colesterol de la LDL. Los resultados indicaron que la afinidad de la LDL de los fumadores por el PG arterial disminuyó 19,3%, luego de recibir vitamina E y 25,2% luego de la administración simultánea de las vitaminas E y C con relación al período placebo.

En los no fumadores, luego del período placebo, también se determinó la afinidad de la LDL por el PG arterial y se obtuvo que el PG precipitó  $28,9 \pm 0,8 \mu\text{g}$  de colesterol de la LDL (Tabla IV), lo cual constituyó el valor basal de afinidad para los no fumadores. Las LDL de los no fumadores que recibieron vitamina E disminuyeron su afinidad y el PG precipitó  $21,5 \pm 1,3 \mu\text{g}$  de colesterol de la LDL y luego de la administración de las vitaminas E y C el PG precipitó  $20,2 \pm 0,7 \mu\text{g}$  de colesterol de la LDL. Los resultados indicaron que la afinidad de la LDL de los no fumadores por el PG arterial disminuyó 25,6%, luego de recibir vitamina E y 30,1% luego de la administración simultánea de las vitaminas E y C, con relación al período placebo.

Antes de comenzar la administración de las vitaminas E y C se hizo la determinación de la afinidad de la LDL por el PG arterial para tener la afinidad basal. Como la afinidad se expresa por la cantidad de colesterol de la LDL precipitada por el PG tenemos que al inicio de la investigación el PG precipitó  $38,3 \pm 2,9 \mu\text{g}$  de colesterol de la

TABLA IV  
AFINIDAD DE LA LDL POR UN PROTEOGLICANO ARTERIAL EN FUMADORES Y NO FUMADORES CON TRATAMIENTO DE VITAMINA E Y DE VITAMINAS E y C

	Período A Placebo de E + C	Período B Vitamina E + Placebo de C	Período C Vitamina E + Vitamina C
Colesterol de la LDL precipitado ( $\mu\text{g}$ )*			
Fumadores	$38,3 \pm 2,9$	$30,9 \pm 0,5$	$28,6 \pm 0,7$
No fumadores	$28,9 \pm 0,8$	$21,5 \pm 1,3$	$20,2 \pm 0,7$
Disminucion de la afinidad de la LDL por el pg respecto al Placebo			
Fumadores		19,3 %	25,2 %
No fumadores		25,6 %	30,1 %

\* Representa la cantidad absoluta de colesterol de la LDL precipitada por el PG y los valores están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar. Los valores de p fueron calculados usando la prueba t de student y se obtuvieron valores de  $p < 0,05$  al comparar placebo vs vitamina E y placebo vs vitamina E y C, tanto en los fumadores como en los no fumadores. Fumadores  $n = 20$ , No fumadores  $n = 10$ .

LDL de los fumadores y  $28,9 \pm 0,8 \mu\text{g}$  de colesterol de la LDL de los no fumadores, esto significa que la LDL de los fumadores ya presentaba 24,5% más afinidad por el PG a nivel basal que la LDL de los no fumadores. La disminución de la afinidad, luego de la administración de las vitaminas, fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), en ambos grupos, cuando se comparó placebo vs vitamina E y placebo vs vitaminas E y C. La disminución de la afinidad de la LDL por el PG se correlacionó de manera inversa con el aumento en la concentración de alfatocoferol en el plasma ( $r = -0,99$ ,  $p = 0,04$ ).

#### Efecto sinérgico de la administración de las vitaminas E y C

La administración simultánea de las vitaminas E y C disminuyó la afinidad de la LDL por los PGs arteriales en mayor proporción (25,2% en los fumadores y 30,1% en los no fumadores) que cuando se administró solo vitamina E (19,3% en los fumadores y 25,6% en los no fumadores).

### DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar la efectividad de la administración de dos antioxidantes naturales, la vitamina E y la vitamina C, sobre la afinidad de la LDL por PGs arteriales, en fumadores y no fumadores. Los grupos seleccionados al inicio del estudio fueron muy semejantes, ya que no se detectaron variaciones, estadísticamente significativas, en edad, peso, IMC y presión arterial.

Los resultados demostraron que antes de la administración de las vitaminas E y C, la LDL de los fumadores tenía mayor afinidad por el PG que la LDL de los no fumadores, este resultado fue semejante al reportado por Linden y col. (14) para las LDL aisladas de pacientes que habían sufrido un infarto, lo que podría sugerir que una LDL con alta afinidad por los PGs aumentaría la

probabilidad de formación de complejos LDL-PG en la íntima arterial contribuyendo al inicio de la lesión aterosclerótica y al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Los trabajos pioneros de Avila y col. (35) demostraron que un PG rico en condroitin sulfato, aislado de la íntima-media de aorta humana, era capaz de formar, *in vitro*, diferentes cantidades de complejo insoluble con LDL proveniente del plasma de distintos sujetos y que estas LDL con mayor afinidad tenían una elevada relación colesterol/proteína y un alto punto isoeléctrico. Posteriormente Hurt-Camejo y col. (1) reportaron que las diferencias en la afinidad de la LDL por el PG se debían a una subclase especial de partículas de LDL que tenía una menor cantidad de lípidos totales y un alto porcentaje de ésteres de colesterol e indicaron que el área ocupada por los lípidos polares, fosfolípidos y colesterol, estaba inversamente relacionada con la afinidad y sugirieron que la LDL con mayor afinidad por el PG tenía 20 a 30% más área accesible para el otro componente de superficie que era la apo B100.

En nuestro estudio la LDL de los fumadores presentó mayor afinidad por el PG que la LDL de los no fumadores, esto probablemente se debió a que la LDL de los fumadores era más pequeña con una apo B donde el sitio de interacción con el PG quedaba más expuesto para unirse con mayor afinidad al PG, mientras que la LDL de los no fumadores probablemente era más grande y con un sitio de interacción en la apo-proteína B menos expuesto y menos accesible, mostrando menor afinidad por el PG.

McNamara y col. (36) analizaron subfracciones de LDL obtenidas por ultracentrifugación diferencial y concluyeron que la LDL con menor tamaño y mayor densidad tenía menos núcleo no polar cubierto por la monocapa de fosfolípidos y colesterol y propusieron que en esta LDL pequeña y densa, con mayor afinidad por el PG, la apo B100

era un mejor ligando para los GAG porque dos o más segmentos positivos ricos en arginina y lisina se juntarían en la superficie de la proteína y tendrían mayor afinidad por el PG.

Se ha sugerido que en una LDL grande, en la cual la apo B100 estuviera más extendida, estos sitios cargados positivamente estarían más separados, mientras que, en la LDL pequeña y densa, la apo B100 tendría la región que contiene los segmentos de unión, más juntos y expuestos (7). La secuencia de la apo B100 que se une a los GAGs se ubica entre los aminoácidos 3359-3367, los cuales están contenidos en el segmento ubicado entre 3359-3369 que Boren y col. (37) identificaron como la región de unión al receptor de la LDL y propusieron que cambios en la composición lipídica de la LDL podía exponer más los segmentos de unión 3359-3369, por lo tanto, cambios en el empaquetamiento de la superficie de la partícula podría alterar la exposición de las regiones de unión de los GAG y del receptor.

Las evidencias sugirieron que la LDL era una población heterogénea de partículas y que el PG arterial tenía máxima afinidad por partículas de LDL densas, básicas, con el más alto contenido relativo de apo B-100 y el más bajo contenido de fosfolípidos y colesterol libre en su superficie. Debido a que el área superficial de la partícula es más pequeña, cubierta por regiones de apo B100 más positivas, entonces estas LDL serían más accesibles para la asociación con el PG, el cual seleccionaría a estas LDL entre toda la población heterogénea de partículas y ellas serían más susceptibles a las alteraciones estructurales inducidas por los PGs.

Con base en los resultados de nuestro estudio, también es posible que la LDL de los fumadores estuviera enriquecida en una subclase de partículas cargadas más positivamente y por lo tanto más afin por el PG, cargado muy negativamente, a diferencia de la LDL de los no fumadores que aunque pre-

sentó afinidad por el PG, esta siempre fue menor que la presentada por los fumadores.

La administración de la vitamina E disminuyó la afinidad de la LDL por el PG, tanto en los fumadores como en los no fumadores, y fue estadísticamente significativo al comparar con el período placebo. Esta disminución en la afinidad de la LDL posiblemente se debió a cambios en la composición lipídica y en el empaquetamiento de la LDL, que de alguna forma, por ahora desconocida por nosotros, contribuyó a que esta LDL, luego del tratamiento con vitamina E, se hiciera más grande o presentara regiones de unión al PG más separadas sobre la LP que permitiera que la LDL disminuyera su afinidad por el PG, en ambos grupos.

También es posible que, luego de la administración de la vitamina E, la LDL aislada de fumadores y no fumadores fuera el producto de una VLDL grande, enriquecida en triglicéridos, que al ser procesada por la lipasa lipoproteica en el endotelio capilar, diera origen a una LDL grande con sus sitios de unión al PG más separados y con menor afinidad por el PG.

Con relación a los antioxidantes se ha establecido que los fumadores tienen disminuidos los niveles plasmáticos de vitamina C (22). Igualmente ha sido demostrado por Mezzetti y col. (38) que las concentraciones de alfatocoferol y también de ascorbato estaban disminuidas en el tejido arterial de los fumadores cuando se comparaba con el de los no fumadores. Los resultados obtenidos en investigaciones previas realizadas por nuestro laboratorio (39) demostraron que la LDL de los fumadores, antes de iniciar el tratamiento con la vitamina E, ya tenía una susceptibilidad mayor a la oxidación que la LDL de los no fumadores y que esta predisposición a la oxidación disminuía con el consumo de vitamina E (39).

En este sentido, Yamaguchi y col. (40) demostraron que conejos Watanabe tratados con extracto de humo de cigarrillo au-

mentaron sus niveles plasmáticos de peróxidos lipídicos, disminuyeron los de vitamina E y aumentaron la susceptibilidad a la oxidación de la LDL pero también encontraron que estos resultados podían ser prevenidos administrando vitamina E a los conejos, por lo que concluyeron que sería importante el uso de la vitamina E, principalmente en los fumadores, para protegerlos de los efectos del humo del cigarrillo.

Chao y col. (41) también evaluaron el efecto de la administración simultánea de 3 antioxidantes: beta-carotenos, vitamina C y vitamina E sobre los niveles de estas vitaminas en plasma y sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y concluyeron que la administración combinada de estos antioxidantes aumenta sus niveles en plasma al igual que la actividad de las enzimas antioxidantes y disminuye el nivel de peróxidos lipídicos en fumadores hiperlipidémicos, lo cual refuerza la necesidad del consumo de estas vitaminas en los fumadores.

Por su parte, Cherubini y col. (42) evaluaron personas de más de 75 años que tenían ausencia de síntomas clínicos de aterosclerosis y encontraron que estos pacientes tenían en común un alto nivel plasmático de vitamina E y un bajo nivel de oxidación de la LDL lo que les permitió concluir que estas eran dos características necesarias para alcanzar edades avanzadas sin desarrollar aterosclerosis.

Van Tits y col. (43) también administraron vitamina E (400 mg/d) a fumadores crónicos por espacio de 2 años y a pesar de que disminuyó la susceptibilidad de la LDL a la oxidación no se normalizaron los niveles elevados de moléculas solubles de adhesión intercelular y de anticuerpos contra LDL oxidada.

La vitamina E es un antioxidante de naturaleza lipídica, que bloquea la oxidación en las membranas (44) y protege contra la peroxidación lipídica de los ácidos grasos de la LDL (45, 46) La oxidación de

estos ácidos grasos solo ocurre si se agota la vitamina E de la LDL, lo cual se ha demostrado en experimentos de oxidación mediada por células y por cobre (25, 45).

Nuestra investigación también evaluó el efecto de la administración simultánea de las vitaminas E y C, y los resultados demostraron que estos 2 antioxidantes disminuyeron en mayor proporción la afinidad de la LDL por el PG que la administración sólo de la vitamina E, tanto en los fumadores como en los no fumadores. Esta disminución en la afinidad posiblemente esta relacionada con el enriquecimiento de la LDL con vitamina E, ya que la vitamina C no se transporta unida a la LDL como la vitamina E y probablemente su función es la de preservar los niveles de vitamina E en la LDL. Es posible que el uso prolongado de la vitamina E, por espacio de dos meses continuos, permitiera que se dieran cambios en la partícula de LDL, relacionados con tamaño, carga y composición, que no se analizaron en este trabajo, los cuales favorecieron la disminución de la afinidad de la LDL por el PG arterial, en ambos grupos.

Entonces es posible que este aumento de la vitamina E en plasma se deba a un efecto combinado de dos factores, el primero sería el consumo continuo de vitamina E y el segundo sería el efecto de la vitamina C en plasma, que actuaría ahorrando el uso de la vitamina E. La vitamina C regenera eficientemente a la vitamina E, la cual se transforma en radical cuando interviene en los procesos de peroxidación, según la ecuación: radical de vitamina E (alfatocoferilo) + ascorbato = vitamina E + radical ascorbilo. Los radicales libres oxidan al alfatocoferol y lo convierten en el radical alfatocoferilo en la fase lipídica, luego la vitamina C reacciona con el radical alfatocoferilo para regenerar al alfatocoferol y exportar el radical ascorbilo al medio acuoso (47).

Los resultados también demostraron que la disminución de la afinidad de la LDL

por el PG arterial fue siempre mayor cuando los dos antioxidantes se suministraron simultáneamente, indicando que las dos vitaminas, probablemente, se complementan en sus funciones y contribuyen a que la partícula de LDL adquiera ciertas características, que la hacen presentar menor afinidad por el PG arterial, en ambos grupos.

Aunque la disminución de la afinidad siempre fue mayor en los no fumadores, no obstante, es de gran importancia que también se haya observado en los fumadores, ya que, estos siempre tienen disminuida su capacidad antioxidante y el consumo de estas dos vitaminas les podría ayudar a compensar la disminución de estos antioxidantes en plasma y a mejorar un factor de riesgo como podría ser, tener alta afinidad por un PG que se encuentra en las arterias, que es capaz de atrapar a la LDL y, eventualmente, facilitar su modificación oxidativa, haciéndola más aterogénica.

En conclusión, la administración simultánea de las vitaminas E y C disminuyó en mayor proporción la afinidad de la LDL por el PG arterial que la administración sólo de la vitamina E, tanto en los fumadores como en los no fumadores, no obstante, el efecto fue mucho mayor en los no fumadores. La disminución en la afinidad de la LDL por el PG arterial se correlacionó inversamente con el aumento en la concentración de alfatocoferol en el plasma, en los dos grupos. Los resultados nos permiten sugerir que la administración simultánea de estos 2 antioxidantes podría tener un efecto sinérgico al disminuir en mayor proporción la afinidad de la LDL por el PG, lo cual podría conferir cierto grado de protección contra la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares en los fumadores, pero también en los no fumadores, que por lo general son fumadores pasivos y están expuestos a los mismos daños que ocasiona el cigarrillo en los fumadores.

#### AGRADECIMIENTOS

El proyecto fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, de la Universidad Central de Venezuela mediante el N° 09-10-4162-98.

Agradecemos a Laboratorios Roche por habernos suministrado todas las vitaminas E, las vitaminas C y los placebos correspondientes indispensables para la realización del proyecto.

Al Dr. Rafael Apitz del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Biofísica y Bioquímica por facilitarnos las instalaciones de su laboratorio de Trombosis Experimental.

#### REFERENCIAS

1. Hurt E, Bondjers G, Camejo G. Interaction of LDL with human arterial proteoglycans stimulates its uptake by human monocyte-derived macrophages. *J Lip Res* 1990; 31:443-454.
2. Camejo G, Lopez F. Modifications of low density lipoprotein induced by arterial proteoglycans and chondroitin-6-sulfate. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1096: 253-261.
3. Mateu L, Avila E, Camejo G. The structural stability of low density lipoprotein: A kinetic x-ray scattering study of its interactions with arterial proteoglycans. *Biochim Biophys Acta* 1984; 795: 525-534.
4. Camejo G. Effect of arterial proteoglycans on the interaction of LDL with human monocyte derived macrophages. *Atherosclerosis* 1987; 67:115-126.
5. Faber M. The human aorta: sulfate containing polyuronides and the deposition of cholesterol. *Arch Pathol* 1949; 48: 342-350.
6. Aviram M, Maor I. Phospholipase A2 modified LDL is taken up at enhanced rate by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185:465-472.
7. Hurt-Camejo E, Andersen S, Sandal R, Rosengren B, Sartipy P, Stadberg E, Johansen B. Localization of non pancre-

- atic secretory phospholipase A2 in normal and atherosclerotic arteries: activity of the isolated enzyme on low density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:300-309.
8. Navab M, Berliner J, Watson A, Hama S, Territo M, Lusis A, Shih D, Van Lenten B, Frank J, Demer L, Edwards P, Fogelman A. The Ying and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:831-842.
  9. Bihari-Varga M, Vegh M. Quantitative studies on the complexes formed between aortic mucopolysaccharides and serum lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1967; 1444: 202-210.
  10. Iverius P. The interaction between human plasma lipoprotein and connective tissue glycosaminoglycan. *J Biol Chem* 1972; 247:2607-2613.
  11. Anber V, Packard C, Sheperd J. Preferential binding of small dense LDL to Human arterial proteoglycan. *Atherosclerosis* 1994; 109:217.
  12. Anber V, Griffin B, McConnell M, Packard C, Sheperd J. Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis* 1996; 124:261-271.
  13. Camejo G, Acquatella H, Lalaguna F. The interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans: an additional risk factor?. *Atherosclerosis* 1980; 36:55-65.
  14. Linden T, Bondjers G, Camejo G, Bergstrand R, Wilhelmssen L, Wiklund O. Affinity of LDL to a human arterial proteoglycans among male survivors of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 1989; 19:38-44.
  15. Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Wiklund O, Bondjers G. Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages. *J Lipid Res* 1990; 31: 1387-1398.
  16. Carmena R, Ascaso J, Camejo G, Varela G, Hurt-Camejo E, Ordovas J, Martinez-Valls J, Bergstrom M, Wallin B. Effect of olive and sunflower oils on low density lipoprotein level composition, size, oxidation and interaction with arterial proteoglycans. *Atherosclerosis* 1996; 125:243-256.
  17. Wiklund O, Bondjer G, Wright Y, Camejo G. Insoluble complex formation between LDL and arterial proteoglycans in relation to serum lipid levels and effect of lipid lowering drugs. *Atherosclerosis* 1996; 119:57-68.
  18. Wight T. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 1-20.
  19. Ball K, Turner R. Smoking and the heart: The basis for action. *Lancet* 1974; 2: 822-826.
  20. Harats D, Ben Naim M, Dabach Y, Hollander G, Stein O, Stein Y. Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages. *Atherosclerosis* 1989; 79:245-252.
  21. Frei B, Forte T, Ames B, Cross C. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. *Biochem J* 1991; 277:133-138.
  22. Chow C, Thacker R, Changcit C, Bridges R, Rehm S, Humble J, Turbek J. Lower levels of vitamin C and carotenes in plasma of cigarette smokers. *J Am Coll Nutr* 1986; 5:305-312.
  23. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew T, Khoo J, Witztum J. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-924.
  24. Esterbauer H, Rotheneder M, Striegl G, Waeg G, Ashy A, Sattler W, Jurgens G. Vitamin E and other lipophilic antioxidants protect LDL against oxidation. *Fat Sci Technol* 1989; 91:316-324.
  25. Dieber-Rotheneder M, Puhl H, Waeg G, Striegl G, Esterbauer H. Effect of oral supplementation with D- $\alpha$ -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *J Lipid Res* 1991; 32:1325.
  26. Beherens W, Thompson J. Distribution of  $\alpha$ -tocopherol in human plasma

- lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 1982; 35: 691-696.
27. 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; 72:248-255.
  28. Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J Biol Chem* 1947; 167: 189-198.
  29. Bitter T, Muir H. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 1962; 4:330-334.
  30. Hashim S, Schuttringer G. Rapid determination of tocopherol in macro- and microquantities of plasma. Results obtained in various nutrition and metabolic studies. *Am J Clin Nutr* 1966; 19: 137-145.
  31. Omaye S, Turnbull J, Sauberlich H. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells tissues and fluids. *Methods Enzymol* 1979; 62:3-11.
  32. Schumaker V, Puppione D. Sequential flotation centrifugation. *Methods Enzymol* 1986; 120:155-170.
  33. Princen H, Poppel G, Vogelesang C, Buytenhek R, Kok F. Supplementation with vitamin E but not  $\beta$ -carotene in vivo protects low density lipoprotein from lipid peroxidation in vitro. Effect of cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992; 12:554-562.
  34. Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Bondjers G. Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992; 5:569-583.
  35. Avila E, López F, Camejo G. Properties of low density lipoprotein related to its interaction with arterial wall components. *Artery* 1978; 4:36-60.
  36. McNamara J, Small D, Li Z, Schaefer E. Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1996; 37:1924-1935.
  37. Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity T. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective-apoB100. *J Clin Invest* 1998; 101:1084-1093.
  38. Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico S, Calafiore A, Constantini F, Riario-Sforza G, Imbustaro T, Neri M, Cucurullo F. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis* 1995; 112: 91-99.
  39. Baron L, Romero E, Lopez F, Apitz R. Efecto de la vitamina E sobre la susceptibilidad a la oxidación de la LDL y su afinidad por un proteoglicano arterial en fumadores. *Acta Cient Venez.* 1999; 50(Sup 2):278.
  40. Yamaguchi Y, Matsuno S, Kagota S, Haginaka J, Kunitomo M. Oxidants in cigarette smoke extract modify low-density lipoprotein in the plasma and facilitate atherogenesis in the aorta of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 156(1):109-117.
  41. Chao J, Huang C, Wu S, Yang S, Chang N, Shieh M, Lo P. Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidants status hyperlipidemic smokers. *J Nutr Biochem* 2002; 13(7):427-434.
  42. Cherubini A, Zuliani G, Costantini F, Pierdomenico S, Volpato S, Mezzetti A, Mecocci P, Pezzuto S, Bregnocchi M, Fellin R, Senin U, Vasa Study Group. High vitamin E plasma levels and low low-density lipoprotein oxidation are associated with the absence of atherosclerosis in octogenarians. *J Am Geriatr Soc* 2001; 49(5):651-654.
  43. Van Tits L, de Waart F, Hak-Lemmers H, Van Heijst P, de Graaf J, Demacker P, Stalenhoef A. Effects of alpha-tocopherol on superoxide production and plasma intercellular adhesion molecule-1 and antibodies to oxidized LDL in chronic smokers. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(10): 1122-1129.
  44. Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 1987; 44:227-253.
  45. Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autooxidation of human low

- density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res* 1987; 28: 1466-1477.
46. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and anti-oxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:341-390.
47. Bowry V, Mohr D, Cleary J, Stocker R. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1995; 270:5756-5763.