

La fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteína como marcador sérico de aterosclerosis

Lipoprotein-associated phospholipase A₂ as serum marker of atherosclerosis

LETICIA FIGUEIRA^{A,*}, JULIO CÉSAR GONZÁLEZ^{A,B}, LUISALVA DI BASILICO^A

Resumen

La aterosclerosis es una enfermedad inmunoinflamatoria crónica, en la que la inflamación y el estrés oxidativo juegan un papel fundamental. La identificación de marcadores circulantes para mejorar la predicción de eventos cardiovasculares ha sido uno de los esfuerzos en el área de la cardiología; en este sentido la fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteína (Lp-PLA₂) constituye una molécula que ha emergido como un marcador específico de inflamación vascular. En el presente estudio se evaluaron los niveles séricos de la Lp-PLA₂ como marcador de aterosclerosis y su evolución en el tiempo, en conejos alimentados con dieta hipercolesterolémica. Para ello, 28 conejos machos Nueva Zelanda fueron divididos en dos grupos: GRUPO 1 (control, n=14): Alimentados con conejarina; GRUPO 2: Alimentados con conejarina suplementada con 0,5% p/p de colesterol (n=14) durante 12 semanas. Se realizaron determinaciones séricas de triglicéridos, colesterol y sus fracciones, productos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), Lp-PLA₂ y fibrinógeno plasmático al inicio, 6ta, y 12ma semana de experimentación. La mitad de los conejos fueron sacrificados a la 6ta y 12ma semana y se realizó estudio histológico de su aorta. Se encontró un aumento de la Lp-PLA₂ en el grupo 2 desde la 6ta semana de experimentación (p<0,001); por su parte el fibrinógeno y TBARS se elevó en la 12ma semana (p<0,001) en el grupo 2 con respecto al grupo control. En conclusión, la Lp-PLA₂ es un marcador temprano de aterosclerosis, sugiriendo que tanto la inflamación como la oxidación juegan un papel importante en la fisiopatología de esta enfermedad.

Palabras clave: Fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteína, inflamación, estrés oxidativo, fibrinógeno, aterosclerosis

Abstract

Atherosclerosis is a chronic immune-inflammatory disease. Inflammation and oxidative stress play an important role during atherosclerosis. The identification of circulating markers has been a greatest effort in cardiology. The lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂) is a specific vascular inflammation marker. The present study we assessed Lp-PLA₂ serum levels as a possible atherosclerosis marker in rabbits fed with a high cholesterol diet. 28 New Zealand white male rabbits were randomly divided into two groups, control group (CG, n=14): Receiving standard diet (commercial rabbit food) and group 2 (G2): Rabbits were fed a cholesterol diet (0.5% cholesterol) for 12 weeks (n=14). Blood samples of overnight-fasted rabbits were collected at the beginning, sixth and twelfth weeks, and lipid profile, and serum levels of Lp-PLA₂, TBARS and fibrinogen were determined. Half of the animals were sacrificed on sixth or twelfth week, and the aorta was dissected for histological studies. Our findings demonstrated that the Lp-PLA₂ levels were significantly higher in G2 than CG, both on 6th and 12th week (p<0.001). TBARS and fibrinogen were significantly higher in G2 than CG on 12th week (p<0.001). These results support that Lp-PLA₂ level is an early marker of atherosclerosis, and inflammation and oxidative stress are related to this disease.

Key words: Lipoprotein-associated phospholipase A₂, inflammation, oxidative stress, fibrinogen, atherosclerosis

A Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Investigación y Postgrado de la Escuela de Bioanálisis (LIPEB), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Carabobo, Venezuela.

B Laboratorio Clínico Julio César González.

* Correspondencia: figueiraleticia@gmail.com.

Introducción

La aterosclerosis es una enfermedad inmuno-inflamatoria crónica, caracterizada por un engrosamiento secuencial y focal en la íntima arterial, donde existe una interacción dinámica entre las células inflamatorias, interleucinas y quimioquinas en la pared arterial, que resulta en la formación de placas ateroscleróticas, proliferación vascular y cambios en la matriz extracelular (Ross, 1999; Honma, 2004).

La aterogénesis es un proceso complejo e involucra componentes metabólicos, inmunológicos y vasculares. Este proceso inicia con la adhesión, infiltración y oxidación de las lipoproteínas, especialmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio sub-endotelial, lo cual es seguido por la infiltración, activación de células inflamatorias y la formación de células espumosas (Ross, 1999). Por lo tanto, el estrés oxidativo juega un papel importante en la iniciación del proceso aterosclerótico a través de eventos como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células endoteliales que inducen la oxidación de las LDL, la inactivación del óxido nítrico (NO) y la expresión de genes inflamatorios sensibles a ROS como la molécula de adhesión vascular tipo 1 (VCAM-1), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), entre otros eventos importantes (Kondo y col., 2009; Rosenson y Staffotini, 2012).

Durante los últimos años, se ha reconocido que la inflamación vascular juega un papel muy importante en la iniciación y desarrollo de la aterosclerosis, pues la respuesta inflamatoria no sólo promueve el inicio de un proceso aterosclerótico, sino que además contribuye al posterior crecimiento del

ateroma y a la precipitación de sucesos trombóticos agudos (Ross, 1999; Libby, 2002; Hansson, 2005); en este sentido, la fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteína (Lp-PLA₂) ha demostrado estar involucrada en la patogénesis de la aterosclerosis (Steen y O'Donoghue, 2013; Li y col., 2017).

La Lp-PLA₂ es una lipasa calcio independiente que pertenece a la superfamilia de la fosfolipasa A₂ (PLA₂). Es producida por diversas células inflamatorias y no inflamatorias y circula en el plasma unida principalmente a la LDL, promoviendo inflamación vascular (Li y col., 2017). Esta enzima tiene propiedades pro-inflamatorias, ya que hidroliza fosfolípidos oxidados a lisofosfatidilcolina y ácidos grasos libres oxidados; por lo que es la responsable del aumento de estos compuestos en las partículas de LDL oxidada (LDL_{ox}). Ambos productos generados son biológicamente activos y poseen propiedades pro-inflamatorias en la aterosclerosis, pues son quimiotácticos para los monocitos y linfocitos T (Silva y col., 2011; Li y col., 2017), inducen disfunción endotelial e incrementan la producción de moléculas de adhesión celular y factores de crecimiento (Murohara y col., 1994). Sin embargo, algunos estudios han descrito que la Lp-PLA₂ presenta propiedades antiinflamatorias, pues interviene en la hidrólisis del factor activador de las plaquetas (FAP) y de otros fosfolípidos, actuando como antioxidante, siendo capaz de proteger a las lipoproteínas de la oxidación, produciendo menos lipoproteínas pro-aterogénicas y preservando la función de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Noto y col., 2003).

A pesar de ello, la evidencia indica que la Lp-PLA₂ desempeña un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis y en sus consecuencias clínicas (Jing y col.,

2011); pues se ha descrito una elevada expresión de esta enzima en macrófagos de lesiones ateroscleróticas de humanos y conejos (Häkkinen y col., 1999; Mannheim y col., 2008), la cual se ha relacionado con la vulnerabilidad de la placa (Häkkinen y col., 1999; Kolodgie y col., 2006). De igual manera, estudios epidemiológicos han demostrado que el aumento en las concentraciones séricas de la Lp-PLA₂ está asociada con un incrementado riesgo de eventos cardiovasculares (Koenig y col., 2004; Garza y col., 2007; Daniels y col., 2008; Jing y col., 2011) y con disfunción endotelial (Yang y col., 2006; Lavi y col., 2007), siendo un predictor independiente de eventos cardiovasculares adversos en pacientes con enfermedad coronaria estable (Sabatine y col., 2007); sin embargo, hasta los momentos no está clara la relación de la Lp-PLA₂ con el estrés oxidativo y la inflamación; aún más, se conoce todavía menos su evolución a lo largo del proceso aterogénico; es por ello que en el presente estudio se evaluaron los niveles séricos de la Lp-PLA₂ como marcador de aterosclerosis y su evolución en el tiempo en conejos alimentados con dieta hipercolesterolémica.

Materiales y métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon 28 conejos macho de la raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad con un peso entre 1.200 a 1.300 gramos, provenientes del Bioterio del Instituto de Higiene Rafael Rangel (Caracas, Venezuela). Los animales fueron mantenidos en jaulas a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) con ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Después de una semana de ambientación en el Bioterio Experimental de la Universidad de Carabobo (Valencia, Venezuela), los

conejos fueron divididos aleatoriamente en 2 grupos de 14 conejos cada uno: GRUPO 1 (control): Los cuales fueron alimentados diariamente con conejarina comercial (Protinal, Venezuela). GRUPO 2: Alimentados diariamente con conejarina comercial suplementada con 0,5% p/p de colesterol.

Todos los conejos consumieron agua a libre demanda. El periodo experimental tuvo una duración de doce semanas. Los conejos fueron pesados antes, durante y después de la experimentación. Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996) y el Código de ética para la vida (2011).

DIETA ESTÁNDAR. Los animales del GRUPO CONTROL fueron alimentados con Conejarina comercial (Protinal, Venezuela), cuya composición es la siguiente: Maíz, sorgo, afrechillo de trigo, harinas de maíz, ajonjolí, algodón, girasol y soya, concha de arroz, bagacillo de caña, pasto deshidratado, melaza, grasa estabilizada, carbonato y fosfato de calcio, sal, minerales "trazas" (cobalto, cobre, hierro, manganeso, yodo y zinc) suplementos de las vitaminas A, B2, B12, C, D3, E, ácido pantoténico y niacina, antioxidante, suplemento antibiótico y anticoccidial. Proteína cruda 12%, grasa cruda 1%, fibra cruda 20%, extracto libre de nitrógeno 42%.

DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA. De acuerdo con Rasmusen y col. (2007), la administración de colesterol se realizó mediante el enriquecimiento de la dieta estándar con colesterol disuelto en etil éter y etanol absoluto. Los granos de la conejarina fueron cubiertos con la solución de colesterol en una relación de 0,5 g de colesterol por cada 100 g de alimento y se eliminó el solvente por evaporación durante 24 horas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL
DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Las muestras de sangre fueron extraídas por punción intracardiaca a todos los conejos previo ayuno de 14 horas, al inicio, 6ta y 12ma semana, utilizando tubos con citrato de sodio y sin anticoagulante. Las muestras previamente mantenidas en frío, se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 minutos y el plasma y suero obtenido fueron conservados en congelación a -70°C hasta el momento del procesamiento. Se realizaron determinaciones séricas de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) por métodos enzimáticos (Wiener Lab, Argentina). Las determinaciones del colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y asociado a las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) se realizaron por precipitación y posterior determinación enzimática (Wiener Lab, Argentina). La determinación cuantitativa del fibrinógeno en plasma, se realizó por método inmunturbidimétrico (Wiener Lab, Argentina). Las concentraciones séricas de Lp-PLA₂ fueron determinadas por ensayo inmunoenzimático (NeoBiolab, Cambridge, Massachusetts, USA). Los productos de peroxidación lipídica que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron evaluados por un método colorimétrico descrito por Ohkawa y col., (1979), el cual consiste en evaluar el efecto de las ROS sobre los lípidos, que resulta en la producción de varios compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico y que pueden ser medida por espectrofotometría.

SACRIFICIO DE LOS ANIMALES
PREPARACIÓN DE TEJIDOS Y TIPIFICACIÓN
HISTOLÓGICA DE LAS LESIONES ATEROSCLERÓTICAS

A la 6ta semana y al final del estudio, la mitad de los animales de cada grupo fue sacrificado por dislocación

cervical. Tras la realización de la autopsia, se extrajo la arteria aorta para estudio histológico. Las muestras de tejido extraídas, fueron fijadas en formaldehído al 10% en PBS durante 24 horas y procesadas según la técnica de rutina y posteriormente teñidas con hematoxilina-eosina (Luna, 1968), para luego ser observados por microscopía óptica. Las lesiones fueron tipificadas de acuerdo a la clasificación de la American Heart Association, la cual considera como lesiones tipo I, aquellas iniciales constituidas por células espumosas sub-endoteliales aisladas; las lesiones tipo II constituidas principalmente por un cúmulo de lípidos intracelulares; las lesiones tipo III son intermedias o pre-ateromas, caracterizadas por cúmulos de lípidos intracelulares y dispersos lípidos extracelulares; las lesiones tipo IV son los ateromas, representan lesiones avanzadas, y están constituidas por lípidos intracelulares y por una gran cantidad de lípidos extracelulares; las lesiones tipo V contienen tejido conectivo fibroso y en ocasiones se encuentran calcificaciones y las lesiones tipo VI son las placas complicadas (fisura, trombos, hematomas) (Stary y col., 1995).

Análisis estadístico

Se calculó promedio y desviación estándar para las variables estudiadas. Se realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Jarque-Bera. Se empleó la U de Mann-Whitney para comparar los valores de las variables sujetas a estudio. Se empleó la correlación de Spearman para relacionar la Lp-PLA₂ con las variables del estudio. Se consideró significativo $p < 0,05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.

Resultados

PERFIL LIPÍDICO DE LOS CONEJOS

Las concentraciones de los lípidos séricos de los conejos se resume en la **Tabla I**. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de CT, c-HDL, c-LDL y TG entre los grupos de conejos. El CT, c-HDL, c-LDL y TG en el GRUPO 1 permaneció sin cambios significativos a lo largo del estudio. Por su parte, en la 6ta y 12ma semana de experimentación se apreció un aumento significativo en la concentración de CT, c-HDL, c-LDL y TG en el GRUPO 2 con respecto al GRUPO 1 ($p < 0,0001$). Para el GRUPO 2 las concentraciones de los lípidos séricos variaron desde el inicio hasta el final del experimento ($p < 0,0001$) (**Tabla I**).

CONCENTRACIONES SÉRICAS DE LOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y OXIDACIÓN

Como se puede apreciar en la **figura 1**, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas basales de Lp-PLA₂ entre los grupos sujetos a estudio. Asimismo, la Lp-PLA₂ en el GRUPO 1

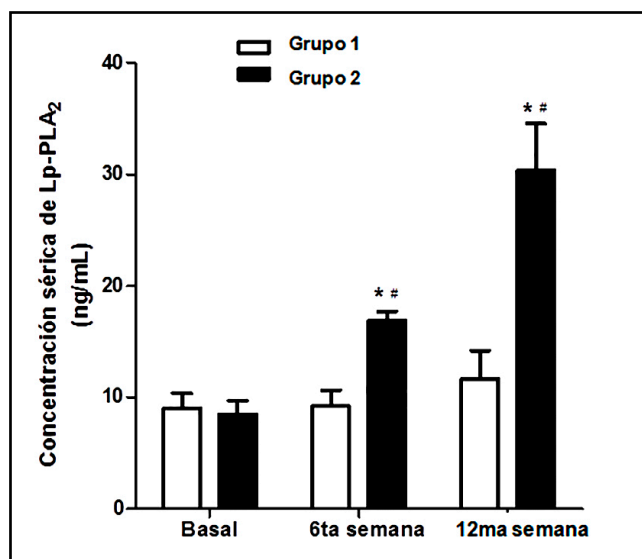


Figura 1. Concentración sérica de la Lp-PLA₂ en los conejos sujetos a experimentación en la semana 0, 6ta y 12ma. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de la media. (N=14 basal y 6ta semana; N=7 12ma semana). * $p < 0,001$ vs. control (Grupo 1). # $p < 0,0001$ vs. su valor basal.

permaneció sin cambios a lo largo del experimento. Por otra parte, en la sexta semana y al final del experimento las concentraciones séricas de Lp-PLA₂ aumentaron en el GRUPO 2 con respecto al GRUPO 1 y con respecto a sus valores basales ($p < 0,001$).

En cuanto a las concentraciones basales plasmáticas de fibrinógeno

Tabla I

Perfil lipídico de los conejos sujetos a estudio

Variables	Semana cero			Sexta semana			Duodécima semana		
	Grupo1	Grupo2	p	Grupo1	Grupo2	p	Grupo1	Grupo2	p
CT	61 \pm 5	59 \pm 5	0,2751	59 \pm 14	670 \pm 269*	0,0001	60 \pm 8	1042 \pm 171*	0,0006
c-LDL	35 \pm 4	34 \pm 3	0,1736	33 \pm 9	527 \pm 222*	0,0001	34 \pm 5	851 \pm 155*	0,0005
c-HDL	23 \pm 3	24 \pm 3	0,3762	23 \pm 5	57 \pm 9*	0,0001	24 \pm 3	64 \pm 6*	0,0005
TG	66 \pm 15	62 \pm 12	0,6132	63 \pm 25	757 \pm 298*	0,0001	64 \pm 14	1137 \pm 332*	0,0006

Los resultados fueron expresados como la media + desviación estándar de la media. p= Comparación del grupo 1 con el grupo 2. Significativo $p < 0,05$. *= Comparación del grupo 2 con respecto a los valores basales. Significativo $p < 0,05$.

Tabla II

Concentraciones plasmáticas de fibrinógeno y TBARS séricos de los conejos sujetos a estudio

Variables	Semana cero			Sexta semana			Duodécima semana		
	Grupo1	Grupo2	p	Grupo1	Grupo2	p	Grupo1	Grupo2	p
Fibrinógeno (g/L)	2,9 + 0,2	2,9 + 0,3	0,7858	3,0 + 0,4	3,5 + 0,6	0,3574	3,1 + 0,4	4,2 + 0,3*	0,0012
TBARS (nmol/mL)	1,55 ± 0,52	1,55 ± 0,66	0,9326	1,39 ± 0,46	1,58 ± 0,69	0,6728	1,51, ± 0,50	4,37 ± 1,82*	0,0007

Los resultados fueron expresados como la media + desviación estándar de la media. p= Comparación del grupo 1 con el grupo 2. Significativo p<0,05. *= Comparación del grupo 2 con respecto a los valores basales. Significativo p<0,05

y TBARS sérico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos sujetos a estudio. Dichos marcadores en el GRUPO 1 permanecieron sin cambios a lo largo del experimento. Por otra parte en la duodécima semana las concentraciones de TBARS y fibrinógeno aumentaron en el GRUPO 2 con respecto al GRUPO 1 y con respecto a sus valores basales (p<0,05) (**Tabla II**).

El análisis de Spearman de las correlaciones entre la concentración de Lp-PLA₂ y el perfil lipídico y marcadores de inflamación y oxidación se muestran en la **Tabla III**, evidenciando una correlación positiva significativa entre la Lp-PLA₂ con el perfil lipídico y fibrinógeno (p<0,001); por su parte, no se evidenció asociación significativa entre la Lp-PLA₂ con los TBARS.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA AORTA

Tabla III

Análisis de la correlación de Spearman entre las concentraciones de Lp-PLA₂ y el perfil lipídico y marcadores de inflamación y oxidación

	r	p
Lp-PLA ₂ & CT	0,4985	0,0001
Lp-PLA ₂ & c-LDL	0,4344	0,0001
Lp-PLA ₂ & c-HDL	0,4446	0,0001
Lp-PLA ₂ & TG	0,4526	0,0001
Lp-PLA ₂ & Fibrinógeno	0,4843	0,0001
Lp-PLA ₂ & TBARS	0,1713	0,1126

En la **Tabla IV** se presenta la distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta, evidenciando que ningún conejo del GRUPO 1 presentó lesiones ateroscleróticas a lo largo del estudio. Por su parte, los conejos del grupo 2 presentaron lesiones de grado variable a lo largo del estudio (**Figura 2**).

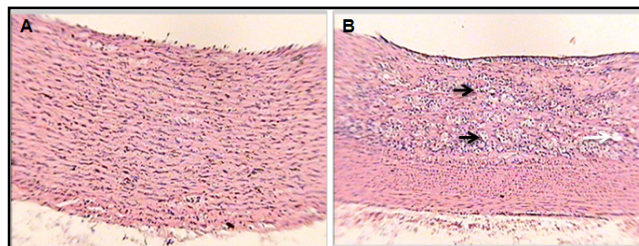


Figura 2. Corte histológico de las aortas de los conejos al final del estudio. **A.** Se observa la íntima arterial sin lesiones. **B.** Lesión Tipo IV. Se observa en la íntima arterial cúmulos de lípidos intracelulares (flechas negras) y extracelulares (flecha blanca) en mayor extensión (Panel B). Tinción hematoxilina - eosina. 50 X.

Discusión

La Lp-PLA₂ es una proteína de 45 KDa producida y secretada por monocitos, macrófagos, linfocitos T y otras células inflamatorias. Su síntesis y liberación hacia la circulación ocurre con la maduración de los monocitos a macrófagos y mediante la activación de mediadores inflamatorios (Maiolino y col., 2015). Se han descrito

Tabla IV

Distribución de los conejos según el máximo grado de ateroma encontrado en los cortes de aorta. Datos presentados como n (%)

Grupo	Sin ateroma	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V
Sexta semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	2 (29%)	5 (71%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Duodécima semana						
1	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2	0 (0%)	0 (0%)	1 (14%)	1 (14%)	5 (72%)	0 (0%)

dos tipos de Lp-PLA₂, la encontrada en la placa aterosclerótica, producida principalmente por los macrófagos, y la secretada *a posteriori* hacia el sistema circulatorio (Lavi y col., 2007); siendo esta última un reflejo del grado de inflamación dentro de la placa aterosclerótica (Cai y col., 2013). La mayor parte de la Lp-PLA₂ circula unida a las LDL (80%), y en menor proporción a las HDL (15-20%), a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y a la lipoproteína a (Jing y col., 2011).

La Lp-PLA₂ fue reconocida inicialmente como una enzima antiaterogénica debido a su capacidad de hidrolizar al FAP, el cual posee efectos dañinos para los vasos sanguíneos (Cai y col., 2013). Sin embargo, la evidencia ha demostrado que la actividad o la concentración de esta enzima se correlaciona de manera positiva con la severidad de la aterosclerosis y el riesgo cardiovascular (May y col., 2006; Cai y col., 2013). De hecho, estudios inmunohistoquímicos han demostrado la presencia de la Lp-PLA₂ en lesiones ateroscleróticas en humanos y conejos (Khakpour y Frishman, 2009), encontrando mayor expresión en lesiones ateroscleróticas en comparación a las aortas no afectadas (Häkkinen y col., 1999), demostrándose predominantemente en áreas de agregación de macrófagos y acumulación de LDLox (Häkkinen y col., 1999; Mannheim y col., 2008), lo cual

sugiere que la concentración de Lp-PLA₂ está relacionada con la estabilidad de la placa y puede ser útil para identificar su vulnerabilidad y evaluar riesgo cardiovascular (Häkkinen y col., 1999; Kolodgie y col., 2006; Cai y col., 2013). De hecho, estudios epidemiológicos han propuesto a la Lp-PLA₂ sérica como un marcador de enfermedad cardiovascular (Garza y col., 2007; White, 2010; Jing y col., 2011), pues se ha demostrado que niveles elevados de la Lp-PLA₂ están asociados con un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria isquémica de manera independiente de la concentración de c-LDL (Ballantyne y col., 2004; Tsimikas y col., 2009; Ridker y col., 2012).

En el presente estudio se apreció un aumento en las concentraciones séricas de Lp-PLA₂ en el GRUPO 2 a partir de la sexta semana de experimentación, lo cual sugiere que la Lp-PLA₂ podría constituir un marcador sérico de la aterosclerosis. De hecho, se ha descrito que los niveles elevados de Lp-PLA₂ son un predictor de eventos cardiovasculares adversos, de manera independiente de los factores de riesgo tradicionales en pacientes con enfermedad coronaria estable (Sabatine y col., 2007), y se ha descrito que la concentración de esta enzima se correlaciona positivamente con la fracción lipídica y el grado de aterosclerosis carotídea (Persson y col., 2007), demostrando su participación en

el proceso aterosclerótico; pues la Lp-PLA₂ se asocia con el riesgo de eventos cardíacos y predice la progresión de la aterosclerosis subclínica coronaria en pacientes con enfermedad arterial coronaria, evidenciándose que la actividad sérica de esta enzima se asocia con mecanismos que conducen a la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica a través de la muerte celular de macrófagos y la atracción de los monocitos (Kinney y col., 2011). Asimismo, se ha descrito que sujetos con falla cardíaca presentan elevados niveles de Lp-PLA₂ asociados con un incrementado riesgo de mortalidad (Jenny y col., 2010); y la administración oral de darapladib, un inhibidor de la Lp-PLA₂, en pacientes coronarios ocasionó una reducción del 59% de la actividad de la enzima después de 12 meses de tratamiento (Serruys y col., 2008) y disminuyó el número de macrófagos y células espumosas en comparación al grupo control (Cai y col., 2013), sugiriendo la importancia de la Lp-PLA₂ en la patogénesis de la aterosclerosis.

Adicionalmente, la evidencia indica que la Lp-PLA₂ podría predecir la ocurrencia de eventos cardiovasculares en pacientes con elevado riesgo. En efecto, pacientes con diabetes mellitus o enfermedad cardiovascular con concentraciones elevadas de Lp-PLA₂ presentan cerca del doble del riesgo de mortalidad cardiovascular que aquellos con niveles de Lp-PLA₂ más bajos (Robins y col., 2008; Hatoum y col., 2010; White y col., 2013), sugiriendo que esta enzima podría constituir un índice de inflamación sistémica. En vista de ello, las directrices de las cuatro principales Sociedades Internacionales, entre las que se incluyen la Sociedad Europea de Cardiología, el Colegio Americano de Cardiología, la Asociación Americana del Corazón y la Sociedad Americana de Endocrinología,

han incluido la medición de la actividad Lp-PLA₂ entre los biomarcadores útiles para la estratificación de riesgo de pacientes adultos asintomáticos, siendo ventajoso en pacientes con riesgo cardiovascular moderado y alto (Maiolino y col., 2015).

En el presente estudio, el incremento en las concentraciones de Lp-PLA₂ observado, sugiere la existencia de un estado inflamatorio inducido por la dieta hipercolesterolémica, la cual ocasionó lesiones ateroscleróticas de grado intermedio y avanzado. El aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular y citoquinas promovidos por la hiperlipidemia, con la consecuente acumulación de monocitos en la íntima podría estar implicado en la aparición de las lesiones ateroscleróticas observadas (Li y col., 2014).

Es relevante señalar que la elevación de las concentraciones séricas de este marcador se observó desde la sexta semana de experimentación, lo cual sugiere que la Lp-PLA₂ es un marcador temprano de aterosclerosis que interviene en la iniciación y progresión de esta enfermedad, ya que esta enzima posee propiedades proinflamatorias y prooxidantes bien descritas (Maiolino y col., 2015), como hidrolizar la fosfatidilcolina oxidada en las LDL y producir lisofosfatidilcolina y ácidos grasos libres oxidados, ambas moléculas pro-inflamatorias que intervienen en la patogénesis de la aterosclerosis, pues incrementan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión celular, son quimiotácticas para los monocitos y linfocitos T y promueven su entrada al espacio subendotelial, incrementan la expresión de metaloproteinasas de matriz extracelular, promueven la producción y liberación de ácido araquidónico y la disfunción endotelial (Murohara y col., 1994; Colley y

col., 2011; Jing y col., 2011), además de contribuir en la calcificación de las células vasculares en la placa aterosclerótica, a través de la regulación de genes y proteínas osteogénicas (Vickers y col., 2010), e inducir la producción de ROS, tales como anión superóxido, mediante la activación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NAD(P)H oxidasa) endotelial y mediante el desacoplamiento de la sintasa de óxido nítrico (NOS) endotelial (Kugiyama y col., 1999; Fleming y col., 2005), eventos importantes y relevantes en las primeras fases de la aterosclerosis. Asimismo, nuestros hallazgos indican la existencia de asociación positiva entre la Lp-PLA₂ con el perfil lipídico y fibrinógeno, tal y como ha sido reportado en otros estudios (Persson y col., 2007; Fratta y col., 2013; Kimak y col., 2015), sugiriendo que el incremento de la concentración de lípidos séricos puede contribuir a la instauración del proceso inflamatorio, lo cual se ve acompañado del aumento de la Lp-PLA₂, favoreciendo el proceso aterosclerótico.

La inflamación juega un papel importante en la fisiopatología de la aterosclerosis, ya que mediadores inflamatorios como las citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, entre otros, participan en el inicio, progresión y evolución de la placa (Li y col., 1993) y sus concentraciones se han demostrado elevadas desde las primeras fases de la aterosclerosis (González y col., 2007; Figueira y González, 2008a; González y col., 2008; Figueira y col., 2014). En este sentido, el fibrinógeno es una proteína de fase aguda sintetizada principalmente por el hígado que tiene funciones biológicas fundamentales como la hemostasia y la reacción inflamatoria. Es reconocido como componente fundamental en el estadio final de la cascada de la coagulación en respuesta a una injuria vascular o

tisular, sirviendo como sustrato cuando por la acción de la trombina produce los fragmentos solubles de fibrina, principales componentes del trombo hemostático (Song y col., 2015; Wolberg, 2016). Se ha descrito que niveles elevados de esta proteína están asociados con un incrementado riesgo de enfermedad cardiovascular (Wilhelmsen y col., 1984; Danesh y col., 2005) y además sus niveles se correlacionan con la severidad de la aterosclerosis carotídea y coronaria (Perl y col., 2016), lo cual indica que esta proteína podría ser un posible factor causal, un blanco terapéutico y/o un predictor de riesgo en personas saludables y con enfermedad cardiovascular (Song y col., 2015). En tal sentido, nuestros hallazgos de un aumento en las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno desde la duodécima semana de experimentación en el GRUPO 2 con respecto al GRUPO CONTROL, tal y como se ha encontrado en otros estudios (González y col., 2008); sugiere que el mismo es un marcador sistémico de la inflamación de fase aguda que se eleva de manera tardía, aumentando su síntesis hepática más de cuatro veces en presencia de inflamación (Song y col., 2015). De hecho, Campos y col. en el año 2008, realizaron un estudio que tuvo por objetivo determinar la relación entre las concentraciones de fibrinógeno y los factores de riesgo cardiovascular isquémico en hombres aparentemente sanos, donde establecen que las altas concentraciones de fibrinógeno constituyen un factor independiente de riesgo cardiovascular. Asimismo, se ha descrito que el incremento de 1g/L en la concentración plasmática de fibrinógeno está asociado con un incremento de dos veces el riesgo de enfermedad cardiovascular, y dichos niveles podrían predecir el desarrollo y curso de la enfermedad coronaria (Smith y col., 2005), por lo tanto, el aumento de las concentraciones de esta proteína es el

resultado de la inflamación presente en la placa aterosclerótica; y puede cumplir un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, al participar en la trombosis y en la génesis y progresión de la enfermedad vascular, en la quimiotaxis y adhesión celular, en la vasoconstricción en los sitios de injuria de la pared vascular y al estimular la agregación plaquetaria (Song y col., 2015).

Por otra parte, estudios recientes ponen de manifiesto como la peroxidación lipídica y sobre todo, las modificaciones oxidativas de las LDL son un factor importante en el desarrollo de la aterosclerosis (Bayes, 2011), ya que es responsable de la oxidación de las LDL y de su conversión en formas aterogénicas y pro-inflamatorias bien establecidas, así como de la producción de una serie de derivados con efectos citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. Las ROS median muchos efectos en la pared de los vasos sanguíneos, entre los que se incluyen la disfunción endotelial así como la migración, crecimiento y apoptosis de las células de músculo liso. Se ha observado que el anión superóxido y otras ROS están incrementados en arterias en varias condiciones cardiovasculares, lo cual sugiere que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la fisiopatología de la aterosclerosis, hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares (Heistad y col., 2009). Existen diversas razones para sospechar sobre la participación de la NAD(P)H oxidasa en la aterosclerosis, pues esta enzima se encuentra presente en las células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos y células fagocíticas mononucleares y son la principal fuente de anión superóxido en los vasos sanguíneos humanos y provee un mecanismo para la liberación localizada de ROS, que pueden influir en la señalización redox-sensible

(Griendling y col., 2000; Sorescu y col., 2002; Pendyala y Natarajan, 2010). Asimismo, estudios *in vitro*, demuestran que estímulos inflamatorios activan proteínas que generan ROS en células vasculares (Griendling y col., 2000; Sorescu y col., 2002). Por otra parte, diversos estudios han encontrado un incremento en la expresión de diversas subunidades de la NAD(P)H oxidasa y un incremento en la expresión de enzimas antioxidantes durante la aterosclerosis (Wassmann y col., 2004). De hecho, Azumi y col. (1999) encontraron mayor expresión de la subunidad p22phox de la NAD(P)H oxidasa en la pared de arterias coronarias afectadas con aterosclerosis con respecto a las no afectadas. De igual modo, Sorescu y col. (2002) encontraron que la producción de anión superóxido y la expresión de ARNm de gp91phox y p22phox son mayores en la placa aterosclerótica en comparación a las arterias no afectadas, evidenciando además que la expresión de estas subunidades de la NAD(P)H oxidasa se correlaciona con el grado de aterosclerosis. En el presente estudio encontramos un aumento en la producción de los TBARS séricos en el GRUPO 2 a partir de la duodécima semana con respecto al GRUPO 1 y con respecto a sus valores basales, lo cual sugiere un aumento en la producción de ROS durante la aterosclerosis, el cual es capaz de conducir a un daño tisular, causando alteraciones en la estructura celular, pérdida de la función celular y peroxidación lipídica. En este sentido Céspedes y Castillo (2008) encontraron mayor concentración de TBARS séricos en pacientes hipertensos con respecto a sus controles normotensos, evidenciando que los niveles de TBARS fueron mayores en pacientes con diagnóstico de cardiopatía isquémica, lo que evidencia que el daño por peroxidación a las membranas se incrementa en la medida en que se

asocian complicaciones cardiovasculares en el hipertenso; por lo que un aumento de TBARS indica un incremento en la peroxidación lipídica y en consecuencia mayor daño celular en la función vascular de estos pacientes (Céspedes y Castillo, 2008). Asimismo, Figueira y col. (2010), demostraron que la administración de una dieta hiperlipidémica durante 12 semanas en conejos macho Nueva Zelanda ocasionó un aumento en la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) plasmática con respecto al grupo control desde la 6ta semana de experimentación, lo cual se acompañó de lesiones ateroscleróticas en la aorta de los conejos; asimismo, evidenciaron que la administración de una dieta hiperlipidémica suplementada con antioxidantes inhibió la formación de las lesiones, sugiriendo que en condiciones de hiperlipidemia con o sin suplementación de antioxidantes existe un incremento en la actividad de GPx debido a un estado de estrés oxidativo. Este resultado sugiere que la elevación en la actividad de la enzima antioxidante representa un mecanismo compensatorio al incremento del estrés oxidativo inducido por la dieta hiperlipidémica (Figueira y González, 2008b).

En conclusión, la Lp-PLA₂ sérica constituye un marcador temprano de inflamación y aterosclerosis ya que se encuentra elevado desde la sexta semana de estudio; mientras que el fibrinógeno constituye un marcador tardío. Estos dos marcadores no invasivos y de bajo riesgo podrían proporcionar información diagnóstica de la aterosclerosis. Por otra parte, se observó un aumento en la peroxidación lipídica durante la aterosclerosis, lo cual sugiere que tanto la inflamación como la oxidación juegan un papel importante en la fisiopatología de esta enfermedad.

Referencias bibliográficas

- Azumi H, Inoue N, Takeshita S. 1999. Expression of NADH/NADPH oxidase p22(phox) in human coronary arteries. *Circulation* 100: 1494–1498.
- Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G, Sharrett AR. 2004. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 109: 837–842.
- Bayes B. 2011. Peroxidación lipídica, factores de riesgo cardiovascular y estatinas. *Med Clin (Barc)* 136(5): 204–212.
- Cai A, Zheng D, Qiu R, Mai W, Zhou Y. 2013. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂): A novel and promising biomarker for cardiovascular risks assessment. *Disease Markers* 34: 323–331.
- Campos G, Diez M, Ryder E, Torres E, Fernández V, Rivero F, Arocha C. 2008. Relación del Fibrinógeno con factores de riesgo cardiovascular en hombres aparentemente sanos de Maracaibo, Venezuela. *Invest Clin* 3(49): 341–351.
- Céspedes E, Castillo J. 2008. La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso. ¿Realidad o mito? *Rev Cubana Invest Bioméd* 2 (27): 1–13.
- Código de ética para la vida. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias: Venezuela. 2011.
- Colley KJ, Wolfert RL, Cobble ME. 2011. Lipoprotein associated phospholipase A(2): Role in atherosclerosis and utility as a biomarker for cardiovascular risk. *EPMA J* 2(1): 27–38.
- Danesh J, Lewington S, Thompson SG. 2005. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA* 294: 1799–1809.
- Daniels LB, Laughlin GA, Sarno MJ, Bettencourt R, Wolfert RL, Barrett-Connor E. 2008. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ is an independent predictor of incident coronary heart disease in an apparently

- healthy older population: the Rancho Bernardo Study. *J Am Coll Cardiol* 51(9): 913–919.
- Figueira L, González J. 2008a. Efecto del extracto de *Pinus maritime*, Vitamina C y E, sobre la concentración sérica de LDLox, PCR, Selectina-E, IL-6 y formación de ateromas en conejos con dieta hiperlipidémica. *Informe Médico* 10(10): 593–607.
- Figueira L, González J. 2008b. Efecto de la Vitamina C, sobre la actividad de la GPx y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec* 11(1): 30–36.
- Figueira L, González J, Arias M, Reigosa A. 2010. Efectos del Pycnogenol y Vitamina E, sobre la actividad de la Glutación Peroxidasa y la formación de ateromas, en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *Salus* 14(3): 33–42.
- Figueira L, González J, Mercado M, Hernández J, Reigosa A. 2014. La Dimetilarginina Asimétrica (ADMA) sérica como marcador de aterosclerosis en conejos expuestos a dieta hiperlipidémica. *INFORMED* 16(2): 39–44.
- Fleming I, Mohamed A, Galle J, Turchanowa L, Brandes RP, Fisslthaler B, Busse R. 2005. Oxidized low-density lipoprotein increases superoxide production by endothelial nitric oxide synthase by inhibiting PKC alpha. *Cardiovasc Res* 65: 897–906.
- Fratra A, Stranieri C, Pasini A, Vallerio P, Mozzini C, Solani E, Cominacini M, Cominacini L, Garbin U. 2013. Lysophosphatidylcholine and carotid intima-media thickness in young smokers: a role for oxidized LDL-induced expression of PBMC lipoprotein-associated phospholipase A₂? *PLoS One* 8(12): e83092.
- Garza C, Montori V, McConnell J, Somers V, Kullo I, Lopez-Jimenez F. 2007. Association between lipoprotein-associated phospholipase A₂ and cardiovascular disease: a systematic review. *Mayo Clin Proc* 82: 159–165.
- González J, Figueira L, González D, Álvarez Á, Aguilera C, Reigosa A. 2007. Niveles plasmáticos de Mieloperoxidasa y Proteína C Reactiva en conejos machos Nueva Zelanda expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec* 10(2): 86–90.
- González J, Figueira L, Reigosa A. 2008. Selectina-E, VCAM-1, FNT- α , IL-6, PCR y Fibrinógeno plasmático como marcadores de inflamación en la aterosclerosis en conejos machos Nueva Zelanda, expuestos a una dieta hiperlipidémica. *Salus* 12(2): 50–57.
- Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494–501.
- Häkkinen T, Luoma J, Hiltunen M, Macphee C, Milliner K, Patel L, Rice S, Tew D, Karkola K, YlaHerttuala S. 1999. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2909–2917.
- Hansson G. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med* 352(16): 1685–1695.
- Hatoum IJ, Hu FB, Nelson JJ, Rimm EB. 2010. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity and incident coronary heart disease among men and women with type 2 diabetes. *Diabetes* 59: 1239–1243.
- Heistad D, Wakisaka Y, Miller J, Chu Y, Pena-Silva R. 2009. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73(2): 201–207.
- Honma Y. 2004. Predictors of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 11(5): 265–270.
- Jenny NS, Solomon C, Cushman M, Tracy RP, Nelson JJ, Psaty BM, Furberg CD. 2010. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) (Lp-PLA(2)) and risk of cardiovascular disease in older adults: results from the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis* 209(2): 528–532.
- Jing L, Yuling H, Yue Q, Fan Z, Dong Z. 2011. Systematic Review of the Association between Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ and Atherosclerosis. *N Am J Med Sci (Boston)* 4(4): 201–211.

- Khakpour H, Frishman WH. 2009. Lipoprotein-associated phospholipase A₂: an independent predictor of cardiovascular risk and a novel target for immunomodulation therapy. *Cardiol Rev* 17(5): 222–229.
- Kimak A, Strycharz-Dudziak M, Bachanek T, Kimak E. 2015. Lipids and lipoproteins and inflammatory markers in patients with chronic apical periodontitis. *Lipids Health Dis* 14: 162.
- Kinney G, Snell-Bergeon J, Maahs D, Eckel R, Ehrlich J, Rewers M, Kinney G, Snell-Bergeon J, Maahs D, Eckel R, Ehrlich J, Rewers M. 2011. Phospholipase A₂ Activity Predicts Progression of Subclinical Coronary Atherosclerosis. *Diabetes Technol Ther* 3(13): 387–391.
- Koenig W, Khuseyinova N, Lowel H, Trischler G, Meisinger C. 2004. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *Circulation* 110(14): 1903–1908.
- Kolodgie F, Burke A, Skorija K, Ladich E, Kutys R, Makuria A, Virmani R. 2006. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2523–2529.
- Kondo T, Hirose M, Kageyama K. 2009. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 16: 2355–2362.
- Kugiyama K, Sugiyama S, Ogata N, Oka H, Doi H, Ota Y, Yasue H. 1999. Burst production of superoxide anion in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 143: 201–204.
- Lavi S, McConnell JP, Rihal CS, Prasad A, Mathew V, Lerman LO, Lerman A. 2007. Local production of lipoprotein-associated phospholipase A₂ and lysophosphatidylcholine in the coronary circulation: association with early coronary atherosclerosis and endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 115(21): 2715–2721.
- Li H, Cybulsky M, Libby P. 1993. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Rev Arterioscler Thromb* 13: 197–204.
- Li Y, Hong Liang C, Shu Feng W, Ting L. 2017. AMP-activated protein kinase mediates the effects of lipoprotein associated phospholipase A₂ on endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Exp Ther Med* 13: 1622–1629.
- Li W, Jeong J, Park H, Lee Y, Li M, Lee S. 2014. Endurance exercise training inhibits neointimal formation via enhancement of FOXOs expression in balloon-induced atherosclerosis rat model. *J Exerc Nutrition Biochem* 18(1): 110–115.
- Libby P, Ridker P, Maseri A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135–1143.
- Luna L. *The Histological Staining Manual. Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* McGraw-Hill: New York, USA 1968. pp. 11–37 (Cap. 1–4).
- Maiolino G, Bisogni V, Rossitto G, Rossi G. 2015. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ prognostic role in atherosclerotic complications. *World J Cardiol* 7(10): 609–620.
- Mannheim D, Herrmann J, Versari D. 2008. Enhanced expression of Lp-PLA₂ and lysophosphatidylcholine in symptomatic carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* 39(5): 1448–1455.
- May HT, Horne BD, Anderson JL. 2006. Lipoprotein associated phospholipase A₂ independently predicts the angiographic diagnosis of coronary artery disease and coronary death. *Am Heart J* 152(5): 997–1003.
- Murohara T, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Ohta Y, Yasue H. 1994. LPC in oxidized LDL elicits vasoconstriction and inhibits endothelium dependent relaxation. *Am J Physiol* 267: H2441–H2449.
- NIH Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. National Academy Press: Washington DC, USA. 1996.

- Noto H, Hara M, Karasawa K, Iso-O N, Satoh H, Togo M, Hashimoto Y, Yamada Y, Kosaka T, Kawamura M, Kimura S, Tsukamoto K. 2003. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase binds to all the murine lipoproteins, conferring protection against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(5): 829–835.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95: 351–358.
- Pendyala S, Natarajan V. 2010. Redox regulation of Nox proteins. *Respir Physiol Neurobiol* 174 (3): 265–271.
- Perl M, Finkelstein A, Revivo M, Berliner S, Herz I, Rabinovich I, Ziv-Baran T, Gotler D, Keren G, Bana S, Arbel Y. 2016. Variance in Biomarker Usefulness as Indicators for Carotid and Coronary Atherosclerosis. *IMAJ* 18: 80–84.
- Persson M, Nilsson J, Nelson J, Hedblad B, Berglund G. 2007. The epidemiology of Lp-PLA₂: Distribution and correlation with cardiovascular risk factors in a population-based cohort. *Atherosclerosis* 190: 388–396.
- Rasmusen C, Moinard C, Martin C, Tricottet V, Cynober L and Couderc R. 2007. L arginine plus atorvastatin for prevention of atheroma formation in genetically hypercholesterolaemic rabbits. *Br J Nutr* 97: 1083–1089.
- Ridker PM, MacFadyen JG, Wolfert RL, Koenig W. 2012. Relationship of lipoprotein-associated phospholipase A mass and activity with incident vascular events among primary prevention patients allocated to placebo or to statin therapy: an analysis from the JUPITER trial. *Clin Chem* 58: 877–886.
- Robins SJ, Collins D, Nelson JJ, Bloomfield HE, Asztalos BF. 2008. Cardiovascular events with increased lipoprotein-associated phospholipase A(2) and low high-density lipoprotein-cholesterol: the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1172–1178.
- Rosenson R, Stafforini D. 2012. Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A₂. *J. Lipid Res* 53: 1767–1782.
- Ross R. 1999. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115–126.
- Sabatine MS, Morrow DA, O'Donoghue M, Jablonksi KA, Rice MM, Solomon S, Rosenberg Y, Domanski MJ, Hsia J. 2007. Prognostic Utility of Lipoprotein Associated Phospholipase A₂ for Cardiovascular Outcomes in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc* 27: 2463–2469.
- Serruys PW, García-García HM, Buszman P, Erne P, Verheye S, Aschermann M, Duckers H, Bleie O, Dudek D, Bøtker HE, von Birgelen C, D'Amico D, Hutchinson T, Zambanini A, Mastik F, van Es GA, van der Steen AF, Vince DG, Ganz P, Hamm CW, Wijns W, Zalewski A. 2008. Integrated Biomarker and Imaging Study-2 Investigators: Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A(2) inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation* 118(11): 1172–1182.
- Silva I, Mello A, Damasceno N. 2011. Antioxidant and inflammatory aspects of lipoprotein-associated phospholipase A₂ (Lp-PLA₂): A review. *Lipids Health Dis* 10: 170.
- Smith GD, Harbord R, Milton J, Ebrahim S and Sterne JA. 2005. Does elevated plasma fibrinogen increase the risk of coronary heart disease? Evidence from a meta-analysis of genetic association studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2228–2233.
- Song B, Shu Y, Xu YN, Fu P. 2015. Plasma fibrinogen level and risk of coronary heart disease among Chinese population: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8(8): 13195–13202.
- Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus R, Szöcs K, Sorescu G, Valppu L, Quinn M, Lambeth D, Vega D, Taylor R, Griendling K. 2002. Superoxide Production and Expression of Nox Family Proteins in Human Atherosclerosis. *Circulation* 105: 1429–1435.
- Stary H, Chandler A, Dinsmore R, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfield M, Schwartz C, Wagner W, Wesler R. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic

- lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. American Heart Association. *Circulation* 15: 1512–1531.
- Steen JC, O'Donoghue M. 2013. Lp-PLA₂ Inhibitors for the reduction of cardiovascular events. *Cardiol Ther* 2(2): 125–134.
- Tsimikas S, Willeit J, Knoflach M, Mayr M, Egger G, Notdurfter M, Witztum JL, Wiedermann CJ, Xu Q, Kiechl S. 2009. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study. *Eur Heart J* 30: 107–115.
- Vickers KC, Castro-Chavez F, Morrisett JD. 2010. Lyso-phosphatidylcholine induces osteogenic gene expression and phenotype in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 211(1): 122–129.
- Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. 2004. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44(4): 381–386.
- White H. 2010. Why inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A 2 has the potential to improve patient outcomes. *Curr Opin Cardiol* 25: 299–301.
- White HD, Simes J, Stewart RA, Blankenberg S, Barnes EH, Marschner IC, Thompson P, West M, Zeller T, Colquhoun DM, Nestel P, Keech AC, Sullivan DR, Hunt D, Tonkin A. 2013. Changes in lipoprotein-Associated phospholipase A₂ activity predict coronary events and partly account for the treatment effect of pravastatin: results from the Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease study. *J Am Heart Assoc* 2(5): e000360.
- Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengsten K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. 1984. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* 311: 501–505.
- Wolberg AS. 2016. Primed to Understand Fibrinogen in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36(1): 4–6.
- Yang EH, McConnell JP, Lennon RJ, Barsness GW, Pumper G, Hartman SJ, Rihal CS, Lerman LO, Lerman A. 2006. Lipoprotein associated phospholipase A₂ is an independent marker for coronary endothelial dysfunction in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 106–111.

Recibido: 01-06-2017
Aceptado: 05-07-2017