

# EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA LIPOPROTEÍN LIPASA Y SU IMPACTO EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Róger Iván Calderón Espinoza, Ana Gutiérrez Román\*, Carlos Santa Cruz Carpio\*  
y Magaly Sheyla Acuy Yanac\*

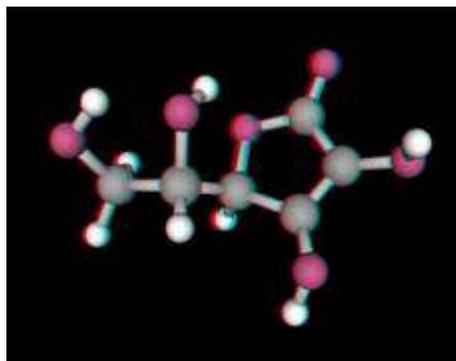
División de Biología Molecular Instituto Nacional de Salud (Perú)

\*Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas  
Universidad Nacional Federico Villarreal (Perú)

E-mail: [anagutierrez@universia.edu.pe](mailto:anagutierrez@universia.edu.pe); [rcalderon@ins.sld.pe](mailto:rcalderon@ins.sld.pe)

## **Introducción**

El ácido-L-ascórbico (AA) o vitamina C hidrosoluble, es un cofactor que participa en las reacciones de hidroxilación de muchas proteínas estructurales, por ejemplo, el colágeno (1). Otro rol importante de esta vitamina es que mantiene un efecto protector contra la oxidación o peroxidación de las lipoproteínas (2) y contra la generación de la aterosclerosis (3, 4).



La Lipoproteín Lipasa (LPL) es una enzima glicoproteica localizada en el endotelio capilar de los tejidos. Su función principal es la hidrólisis de triacilglicéridos (ingeridos en la dieta) transportados por Quilomicrones y VLDL, jugando un rol metabólico clave al encargarse del destino de los ácidos grasos que servirán tanto para almacenamiento o suministro energético en los tejidos (5).

Los defectos en la actividad de la LPL conllevan al desarrollo de desórdenes conocidos como dislipidemias (6, 7), demostrando que la expresión de esta enzima en el macrófago de ratón promueve la formación de las células espumosas y desencadenamiento de los eventos tempranos de la aterosclerosis (8), así como la hiperexpresión de la LPL pudo reducir los niveles séricos de colesterol e inhibir la aterosclerosis en conejos; además de identificar mutaciones en la LPL humana asociadas a una marcada elevación de los niveles séricos de triglicéridos y eventos aterogénicos (9).

Existe una evidencia sobre la relación metabólica entre la LPL y el ácido ascórbico; en donde la protección contra la peroxidación lipoproteica y la disminución de los niveles séricos lipídicos pueden ser eventos convergentes y productos de la influencia de la administración vitamínica dietaria y de la actividad enzimática de la LPL en el metabolismo lipídico integral, al asegurar el efecto anti-aterogénico. Por ello se describirán algunos mecanismos sobre los roles que cumplen esta enzima y esta vitamina en el metabolismo lipídico, analizando ratas alimentadas con dietas con elevadas cantidades de lípidos en presencia de la administración de vitamina C.

## **Material y Métodos**

**Material Biológico:** Dieciséis ratas machos albinas de Raza Sprague Dawley de  $362 \pm 41$  g de peso corporal y 6 meses de edad fueron obtenidas del Bioterio Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Estos animales fueron divididos en cuatro grupos de cuatro individuos cada uno (Grupos I, II, III y IV), correspondiéndole a cada grupo un tratamiento distinto.

Durante 30 días previos al inicio de los tratamientos los animales fueron mantenidos en alimentación *ad libitum* con alimento para roedores procedente del Bioterio de la UNALM a fin de lograr su aclimatación al ambiente de crianza.

**Preparación de los tratamientos:** Usando el alimento para roedores como base se acondicionaron dos dietas: Normal y Grasosa utilizando leche, harina de maíz, manteca de cerdo y aceite de oliva. La composición lipídica de la dieta normal fue 8% y la composición lipídica de la dieta grasosa fue 13% (Ver Tabla 1).

**Tabla 1. Composición nutricional (%) y energía total teórica de las dietas usadas en los diferentes tratamientos**

<b>Dieta</b>	<b>Humedad</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Carbo-hidratos</b>	<b>Grasas</b>	<b>Fibra</b>	<b>Ceniza</b>	<b>Kcal</b>
<b>Normal</b>	<b>9.50</b>	<b>20.00</b>	<b>55.60</b>	<b>8.00</b>	<b>2.90</b>	<b>4.00</b>	<b>374.4</b>
<b>Grasosa</b>	<b>9.50</b>	<b>20.00</b>	<b>50.60</b>	<b>13.00</b>	<b>2.90</b>	<b>4.00</b>	<b>399.4</b>

**Tratamiento:** Dos grupos de animales fueron alimentados *ad libitum* con la dieta normal (Grupo I y Grupo III) y los otros dos grupos fueron alimentados con la dieta grasosa (Grupo II y Grupo IV). Solo a un grupo de cada dieta Normal y Grasosa (Grupos III y IV) se les administró un suplemento de 14 mg. de vitamina C por día en solución acuosa, en forma individual a cada animal.

**Determinación de la actividad enzimática de la LPL:** Al finalizar los tratamientos, los animales fueron sacrificados y el tejido adiposo de la zona retroperitoneal fue disectado. La enzima fue extraída por homogenización del tejido adiposo con  $\text{NH}_3$  0.25N pH 9,2 a 4°C (10, 11). La concentración proteica en el extracto fue determinada usando el método de Bradford (12).

La actividad lipolítica fue determinada como la capacidad de la solución enzimática para hidrolizar r-nitrofenilpalmitato de sodio a 37°C de temperatura por 15 minutos. El r-nitrofenolato liberado fue cuantificado a 400 nm en un espectrofotómetro. La actividad lipásica específica de la LPL fue determinada por la diferencia entre las actividades mostradas a 0,15 M NaCl y 1,2 M NaCl (13, 14); debido a la inhibición total de LPL en elevadas concentraciones salinas.

**Determinaciones séricas:** Los niveles séricos de lípidos totales, colesterol, triacilglicéridos y HDL fueron determinados usando los Kits de Wiener Lab (Rosario, Argentina). Los niveles de LDL y VLDL fueron determinados por la diferencia entre los valores de Colesterol y HDL (15).

Los niveles de ácido ascórbico en sangre y tejido adiposo fueron determinados mediante el método de Roe y Kuether (16), en donde el ascorbato es oxidado a dehidroascorbato; el cual reducirá a la 2,4 dinitrofenilhidrazina en hidrasona, que tiene una absorbancia máxima a 500 nm de longitud de onda.

**Análisis estadístico:** Los niveles séricos y enzimáticos fueron determinados por duplicado. Luego se determinaron los promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación de cada grupo. Mediante el uso del Software Estadístico SPSS v. 10 Windows 95, se determinó la varianza entre los tratamientos y las respuestas a los tratamientos fueron comparadas mediante el test de Tukey y de Dunnett. Finalmente se determinaron los coeficientes de correlación entre las variaciones de los niveles séricos de vitamina C y la actividad enzimática frente a las fracciones lipídicas y lipoproteicas (17).

## **Resultados**

La administración de la dieta grasosa generó el aumento del 75.3% ( $P < 0,001$ ) de la lipemia total, la triacilglicerolemia se incremento en 78.43% ( $P < 0,008$ ) y la colesterolemia aproximadamente en

60% (P<0,001). El suplemento de Vitamina C disminuyó la lipemia en aproximadamente 50% (P<0.005) en las dos dietas, la disminución de la colesterolemia fue en 36.6% (P<0,004) y 47% (P<0,001); mientras que en los animales alimentados con la dieta grasosa, la vitamina contribuyó con la reducción de los niveles de triacilglicérols hacia niveles normales.

Los niveles de HDL en los animales suplementados con vitamina C (Ver Tabla No. 2) fueron mayores en un 37.2% (P<0.026) y 20,5% (P<0,39) frente a las dietas no suplementadas. Por otra parte, los valores de LDL fueron 2 veces mayores (P<0,001) en los alimentados con la dieta grasosa y la administración de vitamina C pudo reducir esos niveles en 3 veces aproximadamente (P<0.001). Además, el VLDL Colesterol en los animales alimentados con la dieta grasosa fueron 77% mayores (P<0.004) y sólo en esa dieta se mostró una significativa reducción de los niveles de un 39% (P<0.016) al administrarle vitamina C.

**Tabla 2. Niveles lipídicos séricos y lipoproteicos en ratas por tratamiento. Cada valor representa la media de cada tratamiento (gr/L) y su desviación estándar.**

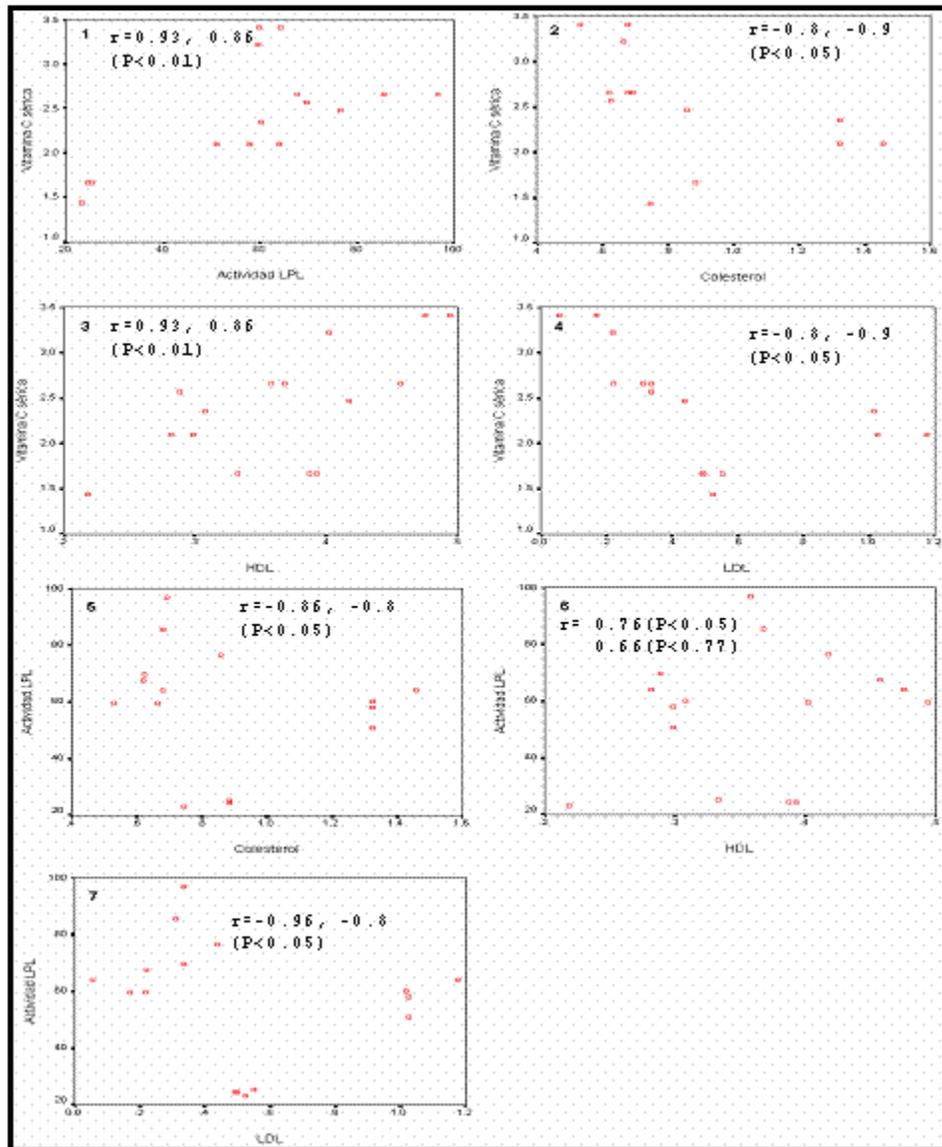
<i>Dieta</i>	<i>Triacil-glicéridos</i>	<i>Colesterol total</i>	<i>HDL Colesterol</i>	<i>LDL Colesterol</i>	<i>VLDL</i>
<i>Normal</i>	0.714 ± 0.18	0.849 ± 0.07	0.333 ± 0.08	0.516 ± 0.03	0.144 ± 0.03
<i>Grasosa</i>	1.274 ± 0.26	1.357 ± 0.07	0.297 ± 0.01	1.060 ± 0.08	0.255 ± 0.05
<i>Normal + vitamina C</i>	0.819 ± 0.13	0.623 ± 0.08	0.457 ± 0.04	0.166 ± 0.04	0.164 ± 0.03
<i>Grasosa + vitamina C</i>	0.776 ± 0.18	0.714 ± 0.10	0.358 ± 0.05	0.356 ± 0.06	0.155 ± 0.04

La LPL de tejido adiposo fue activada 2.4 veces en los animales alimentados con una dieta grasosa (P<0.001) y la administración de vitamina C generó una activación de 2.6 veces más (P<0.001). La activación mediada por vitamina C en los animales alimentados con una dieta grasosa fue de 1.4 veces (P<0.001). (Ver Tabla No. 3)

**Tabla No. 3: Niveles séricos y adiposos de vitamina C y actividad enzimática de la lipoproteín lipasa adiposa en ratas por tratamiento. Cada valor representa la media de cada tratamiento (en mg%, mg/g de tejido y ng p-nitrofenol/min/mg proteína total, respectivamente) ± desviación estándar.**

<i>Dieta</i>	<i>Vitamina C sérica</i>	<i>Vitamina C adiposa</i>	<i>Actividad LPL adiposa</i>
<i>NORMAL</i>	1.614 ± 0.12	1.731 ± 0.12	24.3 ± 0.85
<i>GRASOSA</i>	2.16 ± 0.13	1.555 ± 0.24	58.3 ± 5.48
<i>NORMAL + VITAMINA C</i>	3.176 ± 0.36	2.084 ± 0.56	62.7 ± 3.87
<i>GRASOSA + VITAMINA C</i>	2.589 ± 0.09	3.963 ± 0.45	82.2 ± 12.0

En la Figura No. 1 se muestran los índices de correlación encontrados entre los tratamientos. Los niveles de vitamina C sérica y la actividad de la LPL de tejido adiposo muestran un índice de correlación directa y significativa (r = 0.930 y r = 0.861 respectivamente, P<0.01).



**Figura No.1. Correlación de Pearson (r) entre los niveles de vitamina C sérica y actividad LPL frente a los niveles séricos en ratas por tratamiento. Scatterplot de la correlación entre la concentración de vitamina C sérica y 1: Actividad enzimática de LPL adiposa, 2: concentración sérica de colesterol total, 3: concentración sérica de HDL, 4: concentración sérica de LDL. Correlación entre la actividad enzimática de LPL adiposa y 5: concentración sérica de colesterol total, 6: concentración sérica de HDL, 7: concentración sérica de LDL**

En tanto el colesterol sérico muestran una severa correlación negativa estadísticamente significativa frente a los niveles Vitamina C sérica ( $r = -0.8$  y  $-0.9$ ;  $P < 0.05$ ). Frente al perfil lipoproteico, la distribución sérica de vitamina C frente a los valores de LDL muestra una gran correlación negativa ( $r = -0.9$ ;  $P < 0.001$ ) frente a la administración de ácido ascórbico, mientras que con el HDL Colesterol mantienen una mediana relación directa  $r = 0.786$ ,  $0.595$ ; aunque estadísticamente no significativa.

La actividad de la LPL de tejido adiposo frente a los niveles de colesterol sérico muestran una correlación indirecta y significativa ( $r > -0.8$ ;  $P < 0.05$ ) y también frente a los niveles de LDL ( $r = -0.9$ ,  $r = 0.8$ ;  $P < 0.05$ ), mientras que muestra una correlación directa frente a los niveles de HDL ( $r = 0.7$ ).

## **Discusión y Conclusiones**

Los niveles séricos normales encontrados en el desarrollo de nuestro trabajo presentan una gran similitud con aquellos reportados en ratas Sprague Dawley de 10 a 12 semanas de edad y 380 g de peso corporal mantenidos en condiciones normales (18).

La disminución de los lípidos totales séricos se ha correlacionado con el suministro de Vitamina C (19, 20, 21) y ha sido observado una fuerte disminución de triacilglicéridos y colesterol sérico hasta niveles normales, lo que concuerda con lo que refiere Kotze y colaboradores (22), quienes evaluaron el efecto de la vitamina C sobre los babuinos (*Papio ursinus*). La evidencia de los efectos reductores del colesterol, está manifestado en que en los animales en estrés por cautiverio existe una fuerte correlación entre la disminución de los niveles de vitamina C sérica y el aumento de la colesterolemia (23)

El suplemento de vitamina C afectó enérgicamente los niveles de colesterol así como a las fracciones lipoproteicas (24). Esta protección a futuro evitaría la generación de enfermedades coronarias, cardiovasculares y aterosclerosis.

La variación de concentración de HDL es inversa a la variación de la concentración de quilomicrones y VLDL y directa frente a la actividad de la LPL (25), además que tiene una relación inversa con la frecuencia de aterosclerosis coronaria (26), debido a que reflejan la depuración del colesterol de los tejidos.

Nuestros resultados anotan que el colesterol total ha disminuido en favor a la administración de ascorbato. Esta vitamina en altas dosis, activa el catabolismo del colesterol, dada la activación de la enzima 7 $\alpha$ -hidroxilasa (27) con una reducción de los niveles de la apolipoproteína B, aunque la cantidad de reducción de ambos niveles no son similares. La dieta grasosa aumentó el nivel de colesterol aproximadamente en 60% ( $P < 0,001$ ) y la administración de Vitamina C pudo reducir la colesterolemia en 47% ( $P < 0,001$ ).

Un desorden en el transporte sérico de excesivas cantidades de colesterol conlleva a su acumulación junto con sus lipoproteínas en el hígado y prolonga el tiempo de vida del colesterol en suero (28). La aterosclerosis, inducida por la alimentación (29), así como la colesterolemia puede ser controlada por la ingesta de algunos alimentos ricos en vitamina C o lípidos poli-insaturados; debiendo considerarlos en la prevención de estos trastornos (30).

Cuando los niveles de vitamina C sérica se mantienen normales o son deficientes, la lipemia tiende a incrementarse sin necesidad de tomar colesterol u otros lípidos en los alimentos (31). Las deficiencias en esta vitamina también muestran un incremento en los niveles de triacilglicéridos en una variedad de especies incluyendo a los primates (32). Ginter (33) también anota que deben dosarse los niveles biliares u otros esteroides excretados originados por el metabolismo del colesterol con el fin de monitorizar agudamente el destino de los intermediarios catabólicos del colesterol.

La deficiencia de esta vitamina también puede originar que los niveles de colesterol total y LDL se incrementen drásticamente, mientras que no se ven afectados los quilomicrones y la VLDL (34), Suh Paik y Yearick (35) indican que la tasa de remoción de los ácidos grasos de los triacilglicéridos dietarios está inversamente relacionado con la actividad de la LPL adiposa, sugiriendo que los otros tejidos extrahepáticos son los principales encargados de su utilización para el suministro energético y que este mecanismo prima ante el almacenamiento adiposo.

Los niveles de VLDL disminuyeron drásticamente luego de administrar vitamina C a pesar de seguir una dieta hiper-lipídica. La remoción de su contenido lipídico, bajo acción de la LPL producen una menor formación de LDL responsabilizándose por los bajos niveles séricos de la

lipoproteína (<50% en este estudio; ver Tabla No. 2) pudiendo servir como indicadores de la disminución del riesgo asociado al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, lo cual coincide con Jacques y colaboradores (36) al encontrar una negativa asociación entre los niveles de ácido ascórbico sérico y LDL. Si un incremento en los niveles de LDL Colesterol es acompañado por una disminución o niveles muy bajos de HDL e incrementa el riesgo de producir enfermedades coronarias y sus concentraciones séricas han mostrado también efectos inversos ante la administración de ascorbato. La dieta grasosa aumentó los niveles de LDL y a la vez fue responsable de la reducción de HDL; pero al administrar ácido ascórbico se produjo lo inverso. Cuando los niveles de colesterol asociado a HDL son mayores que los niveles de LDL colesterol, el riesgo de desarrollar ateromas es cada vez menor. El HDL depura el colesterol de los tejidos periféricos de vuelta hacia el hígado para ser excretado (37,38) y se han asociado bajos niveles de HDL con deficiencias en la actividad de la LPL (39); así como se ha demostrado la estrecha relación existente entre los niveles de HDL Colesterol y el riesgo del desarrollo de la enfermedad coronaria, ya que el predominio de esta enfermedad es mayor cuando los niveles de HDL son muy bajos (40). En este trabajo se consiguió modificar los niveles de HDL Colesterol mediante la administración de Vitamina C; aumentando 12,4 mg/dL y 6,1 mg/dL; resultando útil en la reducción del riesgo de enfermedad coronaria. Si por cada aumento de 1 mg/dL de HDL Colesterol, el riesgo disminuye entre 2 y 3% se reduce el índice de mortalidad cardiovascular en un 4 a 5 % (41). Otros estudios sobre riesgos cardiovasculares indican que la vitamina C al disminuir moderadamente los niveles de colesterol total, incrementa los niveles de HDL ejerciendo un efecto hipotensivo, que previene la aterogénesis (42). Si extrapolamos nuestros resultados a los humanos podemos decir que la tasa de riesgo de desarrollar una enfermedad coronaria se pudo reducir en 12 – 37% gracias a la administración de Vitamina C en la dieta.

Kotze y Spies (43) evaluaron la aparición de la LPL en la circulación de babuinos deficientes en vitamina C, luego de la administración de Heparina y ascorbato. La heparina administrada por vía intravenosa libera LPL rápidamente hacia la circulación; en los animales deficientes en vitamina C la LPL liberada fue menor al compararla con la de animales con un amplio suministro ascorbato; así se sugiere que el ácido ascórbico influye sobre la síntesis de la LPL adiposa. Estudios de expresión del gen de la LPL frente al suministro de ácido ascórbico podrían ser concluyentes de este fenómeno.

Coincidiendo con Suh Paik y Yearick (44) una dieta lipídica es suficiente para activar a la LPL mostrando una gran capacidad de acumulación de grasas a partir de la dieta. El suplemento de vitamina C generó una mayor activación. Weissenburg y Harris (45) observaron que la actividad de la LPL cardíaca y muscular en animales recién alimentados es alta, mientras que la actividad de la LPL de tejido adiposo es muy baja, y Kotze y colaboradores (46) encontraron que la actividad de la LPL de músculo cardíaco es fuertemente reprimida por Vitamina C. El efecto fisiológico diferencial entre la LPL adiposa y la cardíaca, evidenciado en muchos trabajos (47,48,49) señala que existiendo un ligero aumento de vitamina C sérica puede ser suficiente para activar a la LPL adiposa de rata. Finalmente la actividad de LPL de tejido adiposo de ratas fue influenciada por el tipo de dieta y por el suplemento de ascorbato, encontrándose un incremento de 1.6 y 0.4 veces en ratas alimentadas con una dieta normal y grasosa respectivamente.

## **Resumen**

El objetivo del trabajo fue evaluar la influencia del ácido ascórbico (AA) sobre el metabolismo lipídico y su efecto protector frente al riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. Durante 7 semanas se alimentaron a ratas albinas Sprague Dawley con dietas normal (grasa total 8%) y grasosa (grasa total 13%) bajo la administración de 14 mg/día de AA. Se analizó la lipemia, lipoproteinemia y actividad de Lipoproteín lipasa (LPL). Se evaluó la variación entre los tratamientos mediante los test de Tukey y Dunnett y además se realizó un análisis de correlación entre los niveles de vitamina C sérica y la actividad de la LPL frente a la distribución de colesterol y lipoproteínas séricas. Finalmente se estimó el riesgo de enfermedad coronaria. Un significativo aumento de la actividad de la LPL de tejido adiposo fue observada en ratas

suplementadas con AA asociada a una significativa reducción de la lipemia, triacilglicerolemia y colesterolemia, LDL y VLDL, mientras que los niveles de HDL aumentaron. Además se encontró que la concentración de vitamina C sérica y la actividad de LPL muestran una correlación directa con la concentración de HDL y una relación inversa con LDL y Colesterol. CONCEI rol del ácido ascórbico sobre el metabolismo lipídico se manifiesta en la activación de la LPL, lo que conduce a una favorable redistribución de los niveles lipídicos y lipoproteicos. La administración de ácido ascórbico disminuye en un 12-37% la tasa de riesgo de enfermedades coronarias y otras dislipidemias directamente mediada por una severa activación de la LPL adiposa.

*Palabras clave: Acido ascórbico, lipoproteín lipasa, colesterol sérico, colesterol, enfermedades cardiovasculares y dislipidemias.*

### **Abstract**

The objective was to evaluate the ascorbic acid influence (AA) on lipid metabolism and the protect effect against the risk of cardiovascular diseases development. During 7 weeks we fed Sprague Dawley male albino rats with normal (total fat 8%) and fatty (total fat 13%) diets under 14 mg. of ascorbic acid administration. We analyzed the lipemic and lipoproteinemic levels and lipoprotein lipase (LPL) activity. We evaluated the variation between treatments by means of Tukey and Dunnett's test. In addition we realized the correlation analysis between the seric vitamin C levels and the LPL activity against the seric cholesterol and lipoprotein distribution. Finally we are estimated the coronary disease risk. A significant weak of adiposse tissue LPL activity were observed in ascorbic acid supplement rats, associated with a significant reduction of lipemic, triacilglicerolemic and colesterolemic level, LDL and VLDL; where as HLD increased. In addition the seric ascorbate and LPL activity shown a direct correlation with HDL and a inverse correlation with LDL and Colesterol. The ascorbic acid role in the lipidic metabolism is declared in the LPL activation. The ascorbic acid administration diminishes in 12-37% the risk of coronary diseases and others dislipidemias directly oriented by adiposse LPL activation.

*Key words: Ascorbic acid, lipoprotein lipase, serum cholesterol cholesterol, cardiovascular disease*

### **Referencias**

1. Mathews C. K and K.E. Van Holde 1992. Biochemistry. In: Metabolism of Nitrogenous Compounds. The Benjamin/Cummings Publishing Co, Inc. Redwood City California.
2. Retsky K.L, M.W Freeman and B. Frei 1993. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti rather than peroxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. J. Biol. Chem. 268 (2):1304-1309.
3. Ginter E. 1977. Vitamin C and Cholesterol. In: Reevaluation of Vitamin C. Edited Hanck A.& Ritzel G. Verlag Hans Huber Bern. Switzerland 1<sup>a</sup> Ed. International Journal for Vitamin and Nutrition Research N°16. pg 53-69.
4. Stait S.E and D.S. Leake 1996. The effects of ascorbate and deshydroascorbate on the oxidation of low-density lipoprotein. Biochem. J. 320(Pt2): 3373-381
5. Eckel R.H. 1989. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. The New England J.of Medicine 320(16):1060-1068.
6. Reymer P.W; E. Gagne, B.E. Groenemeyer; H. Zhang; I. Forsyth; H. Jansen; J.C. Seidel; D. Kromhout; K.E. Lie and J. Katelein 1995. A Lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is asociated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis. Nat Genet 10(1): 28-34

7. Osborne Jc and B. Brewer 1977. The plasma lipoproteins. *Adv. Prot. Chem.* Vol.31:253-337
8. Babaev V.R., S. Fazio, L.A. Gleaves, K.J. Carter, C.F. Semenkovich and M.F.Linton 1999. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo. *J Clin Invest.*103:1697-705
9. Saika Y, N. Sakai, M. Takahashi, T. Maruyama, S. Kihara, N. Ouchi, M. Ishigami, H. Hiraoka, T. Nakamura, S. Yamashita, Y. Matsuzawa 2003. Novel LPL mutation (L303F) found in a patient associated with coronary artery disease and severe systemic atherosclerosis. *Eur J Clin Invest.* Mar;33(3):216-22
10. Corominas A. 1973. *Los Lípidos. Laboratorio y Clínica.* 1ª Ed. Ediciones Toray S.A. Barcelona.
11. Cunningham V.J. and D.S. Robinson 1969. Clearing-factor lipase in adipose tissue. Distinction of different states of the enzyme and the possible role of the fat cell in the maintenance of tissue activity. *Biochem. J.* 112, 203-209.
12. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*72:248-254.
13. Suh Paik H. and E. Yearick 1978.). The influence of dietary fat and meal frequency of lipoprotein lipase and hormone sensitive lipase in rat adipose tissue. *J. Nutr* 108: 1978-1805.
14. Greten H. and B. Walter B. 1973. Purification of rat adipose tissue lipoprotein lipase. *FEBS Letters* 35(1):36-40.
15. *Vademecum Wiener Laboratorios S.A.I.C. Rosario Argentina.* (<http://www.wiener-lab.com.ar/sp/index.html>).
16. Roe J.H. and C.A. Kuether 1943. The determination of ascorbic acid in the whole blood and urine through th 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J.Biol.Chem.* 147:399-407.
17. Armitage P. and G. Berry 1997. El alcance a la estadística. Cap I. En: *Estadística para la investigación biomédica.* pag. 1-36. 3º Edición Harcourt Brace Editorial Madrid.
18. Taconic animal models 1998. Technical Library-Sprague Dawley Outbred Rats. New York <http://www.taconic.com/anmodels/spragued.htm>; <http://www.taconic.com/healthr/hematology/sdheme.htm>
19. Buzzard I.M, M.R. Mcroberts, D.L. Driscoll and J. Bowering 1982. Effect of dietary eggs and ascorbic acid on plasma lipid and lipoprotein cholesterol levels in the healthy young men. *Am. J. Clin. Nutr* 36(1):94-105.
20. Jacques P.F, S.I. Sulsky, G.A. Perrone and E.J. Schaefer 1994 Ascorbic acid and plasma lipids. *Epidemiology* 5:19-26
21. Lynch S.M, J.M. Gaziano and B. Frei 1996. Ascorbic acid and atherosclerotic cardiovascular disease. *Subcell Biochem* 25:331-367.
22. Kotze J.P., M.J.A. Matthews and W.A. De Klerk 1974. Effect of ascorbic acid on Lipoprotein lipase activity. *S. Afr. Med. J.* 48, 511-514.

23. Kotze J, I. Menne, J. Spies and W. De Klerk W. 1975. Effect of ascorbic acid on serum lipid levels and depot cholesterol of the baboon (*Papio ursinus*). *S. Afr Med. J.*49(22):906-909
24. Ginter E., *Op.cit.*
25. Mayes P. A. 1992. Síntesis, transporte y excreción del Colesterol Cap. 28. y Transporte y almacenamiento de Lípidos. Cap. 27. En: *Bioquímica de Harper*. 12° Edición.pg. 235-250. R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell. Ed. El Manual Moderno S.A. C.P. México DF
26. Lavie CJ., J.H. O'Keefe, L. Blonde and G.T. Gau 1993. Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad. *Tribuna Médica* 87(4):180-188.
27. Santillo M, F. Santangelo, A. Belfiore, M. Mastursi and P Mondola 1993. Effect of Ascorbic acid administration on B and E apoproteins in rats mutant fed a cholesterol enriched diet. *Horm. Metab. Res.*25(3):156-159
28. Ginter E., *Op.cit.*
29. Mayes P. A. *Op.cit*
30. Hanck A. and H. Weiser 1977. Vitamin C and Lipid metabolism. In: *Reevaluation of Vitamin C*. Edited Hanck A.& Ritzel G. Verlag Hans Huber Bern. Switzerland 1ª Ed. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* N°16. pg 53-69.
31. Ginter E., *Op.cit.*
32. Jacques P.F., *et al., Op.cit*
33. Ginter E., *Op.cit.*
34. Horio F, N. Takahashi, S. Makino, Y. Hayashi and A. Yoshida 1991. Ascorbic acid deficiency elevates serum levels of LDL-cholesterol in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. *J. Nutr. Sci Vitaminol* 37(1):63-71
35. Suh Paik H. and E. Yearick, *Op.cit*
36. Jacques P.F., *et al., Op.cit*
37. Mayes P. A. *Op.cit*
38. Lavie CJ *et al., Op.cit*
39. Jacques P.F., *et al., Op.cit*
40. Lavie CJ *et al., Op.cit*
41. *Idem.*
42. Lynch S.M. *et al., Op.cit*
43. Kotze J.P. and J.H. Spies 1976. The effect of ascorbic acid on the activity of lipoprotein lipase in the baboon (*Papio ursinus*). *S. Afr. Med. J.* 50 (43):1760-1764

44. Suh Paik H. and E. Yearick, *Op.cit*
45. Weissenburg C.L. and K.L. Harris 1975. Effects of diet on lipoprotein lipase activity in the rat. *J.Nutr* 105: 447-451.
46. Kotze J.P. M.J.A. Matthews and W.A. De Klerk, *Op.cit*
47. *Idem.*
48. Kotze J.P. and J.H. Spies, *Op.cit*
49. Sabugal R, M.Q. Robert, J. Julve, J. Auxwerx, M. Llobera and J. Peinado-Onsurbe 1996. Hepatic regeneration induces changes in lipoprotein lipase activity in several tissues and its re-expression in the liver. *Biochem. J.* 318: 597-602