Caracterización de la subfracción electronegativa de la LDL en individuos con hipercolesterolemia familiar

S. Benítez^a, J.L. Sánchez-Quesada^a, M. Camacho^b, L. Vila^b y J. Ordóñez-Llanos^a

^aServicio de Bioquímica. ^bLaboratorio de Mediadores de la Inflamación. Institut de Recerca. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Fundamento/objetivos. La lipoproteína de baja densidad (LDL) electronegativa (–) es una subfracción de la LDL presente en la circulación que está aumentada en la hipercolesterolemia familiar y presenta características aterogénicas. El objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar fisicoquímica y biológicamente la LDL(–) aislada de pacientes con hipercolesterolemia familiar.

Métodos. Las fracciones LDL(+) y LDL(-) de individuos normolipémicos y con hipercolesterolemia familiar fueron aisladas mediante cromatografía de intercambio aniónico. La caracterización fisicoquímica incluyó la composición en lípidos, apolipoproteínas (Apo), antioxidantes, ácido siálico y malondialdehído, el tamaño (electroforesis en gradiente de acrilamida) y la densidad (ultracentrifugación en gradiente de densidad). La caracterización biológica incluyó el estudio de la afinidad al receptor de LDL en cultivos de fibroblastos, y el efecto sobre la producción de moléculas proinflamatorias (interleucina 8, proteína quimiotáctica para monocitos 1, molécula de adhesión de células vasculares, inhibidor del activador del plasminógeno 1) en células endoteliales.

Resultados. La proporción de LDL(–) fue más alta en individuos con hipercolesterolemia familiar que en normolipémicos ($12,0 \pm 3,4\%$ frente al 5,4 ± 1,8%). La LDL(–) presentó, en ambos grupos, un contenido aumentado de triglicéridos, colesterol

Servei de Bioquímica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. St. Antoni Maria Claret, 167. 08025 Barcelona. Correo electrónico: jsanchezq@hsp.santpau.es libre, ácidos grasos no esterificados, ácido siálico, Apo E y Apo C-III, y un menor contenido de Apo B, respecto a la LDL(+). Además, la LDL(-) de los individuos con hipercolesterolemia familiar presentó más colesterol total y esterificado y menos fosfolípidos que la LDL(+). No se observaron, en ningún caso, diferencias en el contenido en antioxidantes o malondialdehído. La LDL(-) de los sujetos normolipémicos presentó menor tamaño y mayor densidad que su LDL(+). Por el contrario, la LDL(–) de los individuos con hipercolesterolemia familiar manifestó bandas de tamaño igual que su LDL(+) o superior a ésta y una distribución mayoritaria en las fracciones más ligeras. Los estudios de cinética de saturación y de desplazamiento de la unión en cultivos de fibroblastos demostraron que la LDL(-) de sujetos normolipémicos y con hipercolesterolemia familiar tenía menor afinidad por el receptor de LDL que la LDL(+). Finalmente, la incubación con LDL(-) durante 24 h en cultivos de células endoteliales indujo la liberación de interleucina 8 y proteína quimiotáctica para monocitos 1. Este efecto se observó en ausencia de citotoxicidad y en los dos grupos estudiados. La producción de PAI-1 y VCAM no se alteró.

Conclusiones. La LDL(-) no presentó evidencias de modificación oxidativa. De hecho, las diferencias en composición respecto a la LDL(+) pueden explicar por sí mismas el aumento de carga negativa. La principal diferencia entre la normolipemia y la hipercolesterolemia familiar es el mayor contenido en colesterol de la LDL(-) de la hipercolesterolemia familiar, que redunda en mayor tamaño y menor densidad respecto a la LDL(-) de la normolipemia. A pesar de estas diferencias, la LDL(-) de ambos grupos presentó similares características en cuanto a baja afinidad

Este trabajo ha sido financiado por la Beca Fournier 1997 a J.L.S-Q y por la CICYT SAF98-0125 a J.O-L.

Correspondencia: Dr. J.L. Sánchez Quesada.

por el receptor de LDL y capacidad de inducir la producción de quimiocinas en células endoteliales.

Palabras clave:

LDL. LDL electronegativa. LDL modificada. Hipercolesterolemia familiar. Receptores de LDL. Quimiocinas.

CHARACTERIZATION OF ELECTRONEGATIVE LDL SUBFRACTION IN FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIC SUBJECTS

Background/objectives. Electronegative LDL (LDL[-]) is a plasma subfraction of LDL with increased proportion in familial hypercholesterolemia (FH) and some atherogenic characteristics. The aim of this work was to study the physicochemical and biological characteristics of LDL(–) from FH subjects.

Methods. Non-electronegative LDL (LDL(+)) and LDL(-) from normolipemic (NL) and FH subjects was isolated by anion exchange chromatography. Physicochemical characteristics included the content in lipids, apoproteins (Apo), sialic acid, antioxidants and malondialdehyde (MDA), size (by gradient gel electrophoresis) and density (by density gradient electrophoresis). Biological characterization included the binding affinity to the LDL receptor (LDLr) in cultured fibroblasts and the effect on the production of inflammatory molecules (IL-8, MCP-1, VCAM and PAI-1) by endothelial cells.

Results. LDL(–) proportion was increased in FH compared with NL ($12.0 \pm 3.4 \text{ vs. } 5.4 \pm 1.8\%$). LDL(-) showed increased content of triglyceride, free cholesterol, sialic acid, non-esterefied fatty acids (NEFA), apoE and apoC-III, in both groups. In addition, LDL(-) from FH presented more cholesterol and less phospholipid than LDL(+). No differences in MDA or antioxidants were observed. LDL(–) from NL showed smaller size and higher density than LDL(+) whereas LDL(-) from FH showed bands of greater size than LDL(+) and was preferentially distributed in buoyant LDL subfractions. Saturation kinetics and binding displacement studies in fibroblasts showed that LDL(-) from NL and FH subjects had lower affinity for LDLr than LDL(+). Finally, LDL(-) induced IL-8 and MCP-1 release after 24 hours of incubation with endothelial cells. This effect was observed in absence of cytotoxicity and in both studied groups. VCAM and PAI-1 release was not modified. Conclusions. No evidence of oxidative modification

was observed in LDL(–). In fact, the differences in composition can explain the increase in negative charge. Major difference between NL and FH subjects was the increased content of cholesterol in LDL(–) from FH, that results in greater size and lower density than LDL(–) from NL. Despite these differences, LDL(–) from both groups shared low affinity for the LDLr and was able to induce IL-8 and MCP-1 release by endothelial cells.

Key words:

LDL. Electronegative LDL. Modified LDL. Familial hypercholesterolemia. LDL receptors. Chemokynes.

Introducción

Numerosas evidencias científicas han puesto de manifiesto la implicación de la modificación cualitativa de la lipoproteína de baja densidad (LDL) en numerosos acontecimientos durante el desarrollo de la arteriosclerosis¹. La mayor parte de los estudios se ha realizado con LDL modificada in vitro, principalmente oxidada (LDLox), ya que durante años se había considerado que la LDL se modificaba cuando penetraba en la íntima arterial, y se había descartado la presencia de LDL modificada en la circulación plasmática². Sin embargo, durante la pasada década se presentaron evidencias de la presencia en el plasma de una subfracción minoritaria de LDL con una mayor carga negativa³⁻⁵, característica que es común con la LDLox. Existe controversia respecto a las características de la LDL electronegativa (-), ya que algunos autores indicaron que está parcialmente oxidada^{3,6-9}, mientras que otros no encontraron evidencias de modificación oxidativa^{4,5,10-12}. Tampoco existe coincidencia en la unión con el receptor de LDL (rLDL), ya que se ha descrito menor³, igual⁴ o mayor^{10,11} afinidad. Sin embargo, de forma independiente de la presencia de lípidos oxidados, sí que hay coincidencia en la elevada citotoxicidad de la LDL(-) en cultivos de células endoteliales^{7,11}, lo que indica un cierto potencial aterogénico. A éste, hay que añadir la capacidad de la LDL(-) de inducir la producción de interleucina (IL) 8 y proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1) por células endoteliales¹³, quimiocinas que están implicadas en el reclutamiento de linfocitos y monocitos de las primeras fases de la aterogénesis. Todos estos estudios fueron realizados en LDL(-) aislada de individuos sanos normolipémicos (NL). Sin embargo, la proporción de LDL(-) está anormalmente aumentada en afecciones con elevado riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia familiar (HF)14 o la diabetes^{15,16}. El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización fisicoquímica y biológica de la LDL(–) aislada de pacientes con HF, comparándola con la LDL(–) de NL.

Pacientes y métodos

Selección de pacientes

Los pacientes con HF fueron seleccionados según la historia familiar y la concentración de lípidos (colesterol total > 8,5 mmol/l, colesterol unido a LDL [cLDL] > 5,5 mmol/l, triglicéridos < 2 mmol/l). Los individuos NL tenían concentraciones de colesterol total < 8,5 mmol/l, cLDL < 5,5 mmol/l y triglicéridos < 2 mmol/l. Todos los individuos eran normoglucémicos, no fumadores y con una edad comprendida entre los 32 y los 59 años. Las muestras de plasma fueron obtenidas en plasma-EDTA, alicuotadas y congeladas a -80 °C. Dado el elevado número de determinaciones que se debía realizar en cada muestra y, por tanto, la gran cantidad de muestra necesaria para ello, se optó por hacer mezclas de plasma de varios individuos (10-15) para obtener un volumen de plasma de 50-100 ml. Con ello conseguíamos obtener entre 1 y 3 mg de LDL(-) (medida como apolipoproteína [Apo] B) con los que simultáneamente se podían hacer diferentes determinaciones. En total se analizaron 31 mezclas de plasma de HF y 31 de NL, de las que se realizaron diferentes determinaciones. El número de experimentos de cada una de las determinaciones se indica en el apartado "Resultados".

Aislamiento de LDL(–)

La LDL total (1.020-1.050 g/ml) se aisló mediante ultracentrifugación secuencial de flotación a 4 °C y con 1 mmol/l EDTA. La LDL total se fraccionó en LDL(+) y LDL(-) mediante cromatografía de intercambio aniónico (CIA) con un gradiente salino escalonado, utilizando una columna preparativa Q-Sepharose 35/100 en un sitema FPLC (Pharmacia), siguiendo la metodología descrita¹³. Tras concentrar las fracciones por ultracentrifugación, se congelaron alícuotas a -80 °C para determinar los antioxidantes, MDA y ácido siálico, y el resto de parámetros se determinaron antes de una semana con las fracciones conservadas a 4 °C. La LDLox se obtuvo mediante incubación con CuSO417 y la LDL acetilada (LDLac) se obtuvo mediante adición de anhídrido acético18. La movilidad electroforética relativa (Rf) en agarosa respecto a la LDL nativa (= 1) de ambas fracciones fue mayor de 2 para la LDLox y de 2,5 para la LDLac.

Composición y características fisicoquímicas

El contenido de las dos fracciones de LDL en colesterol total, colesterol libre, triglicéridos, Apo B, Apo A-I, Lp(a) (Roche), fosfolípido, ácidos grasos no esterificados (NEFA), Apo E y Apo C-III (Wako) fue determinado en un autoanalizador Hitachi 911 mediante métodos comerciales. El ácido siálico fue cuantificado por HPLC de fase reversa con detección fluorimétrica¹⁹, al igual que el contenido en MDA²⁰. El contenido en αtocoferol, α-caroteno, β-caroteno y licopeno se valoró por HPLC de fase reversa con detección *diode-array*²¹. La susceptibilidad a la oxidación de las fracciones de LDL se evaluó monitorizando la formación de dienos conjugados a 234 nm tras incubación con CuSO₄¹⁵. La Rf de LDL(+), LDL(–), LDLox y LDLac se determinó en geles de agarosa (Biomidi), considerando la Rf de LDL(+) como 1. La integridad de la Apo B se comprobó por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 4-20% (BioRad). El tamaño de la LDL se determinó mediante electroforesis no desnaturalizante en gradiente de acrilamida²². Finalmente, para determinar la distribución en densidad de la LDL(–) se aislaron seis fracciones de menor a mayor densidad de la LDL total mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad²³, y de cada una de ellas se cuantificó la proporción de LDL(–) mediante CIA en columna analítica MonoQ (Pharmacia), según metodología descrita²⁴.

Estudios de afinidad al rLDL en fibroblastos

Se cultivaron fibroblastos humanos de explantes de piel obtenidos del American Type Culture Collection en frascos de 75 cm² a 37 °C y con un 5% de CO₂ en medio DMEM completo (suplementado con un 10% de suero bovino fetal [SBF], 2 mmol/l de glutamina, 0,1 UI/l de penicilina y 100 mg/l de estreptomicina). Para los experimentos de unión al rLDL se separaron los fibroblastos del frasco de cultivo con tripsina/EDTA al 0,05/0,02% y se sembraron inóculos de 50.000 células/ml en placas de cultivo de 12 pozos; se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia y se cambió el medio completo por medio deficiente en lipoproteínas (DMEM completo donde se ha sustituido el SBF por suero deficiente en lipoproteínas [Lpds] al 10%). Tras 2 días en medio deficiente durante los cuales se aumenta la expresión del rLDL, se realizaron los estudios de afinidad. Para éstos, se marcó LDL total, LDL(+) o LDL(-) con el compuesto fluorescente DiI²⁵ (DiI-LDL).

Estudios de cinética de saturación. Se realizaron utilizando concentraciones crecientes de DiI-LDL(+) o DiI-LDL(-) (0, 5, 10, 15, 25, 50, 75, 100 y 200 mg de Apo B/L) por triplicado, durante 3 h a 4 °C. La unión inespecífica se determinó añadiendo en cada punto un exceso de 10 veces de LDL no marcada, por duplicado. A partir de la cinética de saturación se realizó la linearización de Scatchard²⁶, a partir de la cual se determinó la afinidad mediante el cálculo de la constante de disociación (K_D) y la unión máxima ($B_{máx}$).

Estudios de desplazamiento. Se realizaron añadiendo concentraciones crecientes de LDL(+) y LDL(-) sin marcar, por triplicado, para desplazar la unión de una concentración fija (25 mg de Apo B/L) de DiI-LDL, durante 3 h a 4 °C. En cada caso la DiI-LDL era la LDL total de NL o de HF desplazada por sus propias fracciones. A partir de estas curvas se determinó la concentración de desplazador necesaria para desplazar el 50% de la unión (IC₅₀), y con la fórmula de Cheng-Prussoff²⁷ se calculó la constante de inhibición (Ki), una estimación indirecta comparable al valor de K_D obtenido con la cinética de saturación.

Estudios en células endoteliales

Las células endoteliales se obtuvieron de la vena de cordón umbilical (HUVEC) procedentes de partos. El cultivo primario se obtuvo mediante digestión con colagenasa según métodos descritos²⁸. Las HUVEC crecieron en frascos de 75 cm² a 37 °C y un 5% de CO₂ con medio 199 de crecimiento (un 20% de SBF, 2 mmol/l de glutamina, 20 mmol/l de HEPES, 30 mg/l de suplemento de crecimiento endotelial, 10.000 usp/l de heparina, 0,1 U/l de penicilina y 100 mg/l de estreptomicina). Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron tripsinizadas (tripsina/EDTA al 0,05/0,02%) y se hicieron inóculos de 100.000 células/pozo en placas de seis pozos donde crecieron de nuevo con medio de crecimiento 199 hasta alcanzar la confluencia. Entonces el medio fue cambiado por medio de man-

	Individuos NL		Individuos HF	
	LDL(+)	LDL(-)	LDL(+)	LDL(-)
Colesterol total ^e Colesterol esterificado ^e Colesterol libre ^e Triglicérido ^e Fosfolípido ^e NEFA ^d Apo B ^e Apo C ^e Apo C-III ^e	$\begin{array}{c} 40,5 \pm 1,5 \\ 28,9 \pm 1,7 \\ 11,6 \pm 0,7 \\ 6,8 \pm 1,3 \\ 25,6 \pm 0,9 \\ 12,3 \pm 7,7 \\ 27,0 \pm 1,4 \\ 12 \pm 22 \\ 38 \pm 80 \end{array}$	$\begin{array}{c} 40,8 \pm 1,5 \\ 28,6 \pm 1,8 \\ 12,2 \pm 0,8^{a} \\ 8,0 \pm 1,5^{a} \\ 25,8 \pm 1,7 \\ 24,7 \pm 12,0^{a} \\ 25,3 \pm 1,8^{a} \\ 390 \pm 340^{a} \\ 320 \pm 310^{a} \end{array}$	$\begin{array}{c} 41,9\pm1,4^{\rm b}\\ 30,1\pm1,4^{\rm b}\\ 11,8\pm0,5\\ 5,5\pm1,0^{\rm b}\\ 25,9\pm0,8\\ 12,8\pm4,3\\ 26,7\pm1,7\\ 13\pm20\\ 48+75\end{array}$	$\begin{array}{c} 42,8 \pm 1,1^{a,b} \\ 30,6 \pm 1,6^{a,b} \\ 12,2 \pm 0,7^{a} \\ 7,5 \pm 1,4^{a} \\ 24,9 \pm 1,1^{a,b} \\ 22,5 \pm 9,3^{a} \\ 24,8 \pm 1,3^{a} \\ 158 \pm 171^{a,b} \\ 132 \pm 129^{a,b} \end{array}$
Ácido siálico ^d	$17,7 \pm 6,2$	$20,6 \pm 5,6^{a}$	$18,1 \pm 6,3$	$23,4 \pm 8,9^{a}$

Tabla 1. Composición de las fracciones de LDL aisladas de individuos normolipémicos (NL) e hipercolesterolémicos familiares (HF)

^ap < 0,05 frente a LDL(+); ^bp < 0,05 frente a individuos NL. Resultados expresados como media ± desviación estándar (DE). ^cPorcentaje de la masa total; ^dmol/mol Apo B; ^emmol/mol Apo B.

Tabla 2. Malondialdehído (MDA), antioxidantes	y parámetros de su	sceptibilidad a la o	oxidación de la LDL
en las fracciones aisladas de individuos normoli	ipémicos (NL) e hip	ercolesterolémicos	s (HF)

	Individuos NL		Individuos HF	
	LDL(+)	LDL(-)	LDL(+)	LDL(-)
MDA ^c	$2,36 \pm 0,77$	2,36 ± 1,15	$2,60 \pm 1,20$	2,50 ± 1,11
α-tocoferol ^b	8,34 ± 2,97	7,61 ± 3,37	$9,35 \pm 4,58$	8,56 ± 3,93
α-caroteno ^b	$0,049 \pm 0,027$	$0,048 \pm 0,027$	$0,042 \pm 0,027$	$0,046 \pm 0,033$
β-caroteno ^b	$0,168 \pm 0,091$	$0,169 \pm 0,116$	$0,186 \pm 0,133$	$0,196 \pm 0,153$
Licopeno ^b	$0,264 \pm 0,177$	$0,294 \pm 0,218$	$0,440 \pm 0,359$	$0,429 \pm 0,324$
Fase de latencia ^c	40.8 ± 9.5	44.8 ± 9.5^{a}	$40,9 \pm 12,9$	$52,9 \pm 13,0^{\rm a}$
Absorbancia inicial ^e	$0,40 \pm 0,07$	$0,47 \pm 0,10$	$0,47 \pm 0,16$	$0,57 \pm 0,20$
Velocidad máxima ^d	17 ± 3	15 ± 3*	17 ± 3	16 ± 4
Incremento de absorbancia ^e	$0,94 \pm 0,30$	$0,89 \pm 0,25$	$1,06 \pm 0,21$	$1,12 \pm 0,21^{a}$

^ap < 0,05 frente a LDL(+). Resultados expresados como media ± desviación estándar (DE). ^bmol/mol Apo B; ^cminutos; ^dabsorbancia/minuto; ^eunidades de absorbancia.

tenimiento (199 con un 1% de SBF) y se incubaron las HUVEC con las diferentes lipoproteínas durante 24 h. La interleucina 1 β (IL-1 β) fue utilizada como control positivo de inducción de quimiocinas y molécula de adhesión de células vasculares (VCAM). En estos experimentos se comprobó la ausencia de contaminación con lipopolisacárido (E-toxate, Sigma).

Determinación de IL-8, MCP-1 e inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). La liberación al medio de IL-8, MCP-1 y PAI-1 se determinó a partir del sobrenandante del medio de cultivo mediante ELISA comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (Endogen, Pharmingen y Biopool, respectivamente).

Determinación de VCAM. Se determinó mediante Westernblot de extractos de membranas solubilizadas con Tritón X-100 al 0,1%²⁸. Los extractos celulares fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE en geles con un 7,5% de acrilamida²⁹ durante una hora a 150 V, tras lo cual las proteínas fueron transferidas electroforéticamente (45 min a 25 V, Semi Dry Transfer Cell, BioRad) a una membrana de Immobilon P (Millipore). Las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche con TBS que contenía un 10% de leche en polvo desnatada, incubadas durante 1,5 h con el primer anticuerpo (dilución 1/2.000 anti-VCAM s.c.-1.504, Santa Cruz Biotechnology), lavadas cuatro veces con TBS con Tween-20 al 0,1% e incubadas durante 1,5 h con el segundo anticuerpo marcado con peroxidasa/dilución 1/2.000, s.c.-2.020, Santa Cruz Biotechnology). Tras lavar con TBS-Tween, las membranas fueron reveladas con sustrato quimioluminiscente ECL (Amersham-Pharmacia).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Las diferencias entre grupos de datos apareados se determinaron con el test de la t de Wilcoxon, y entre grupos de datos no apareados con el test de la U de Mann-Whitney. Se consideró significativa una p < 0,05.

Resultados

Caracterización fisicoquímica

La proporción de LDL(–) fue más elevada en los individuos HF que en los NL (el 12,0 \pm 3,4% frente al 5,4 \pm 1,8%; p < 0,05; n = 31). La composición en lípidos, apoproteínas (n = 31) y ácido siálico (n = 14) de LDL(+) y LDL(–) en los dos grupos estudiados se expone en la tabla 1. La LDL(–) presentó menor contenido relativo en Apo B y mayor en triglicéridos, colesterol libre, ácido siálico, Apo E, Apo C-III



Figura 1. a) Electroforesis en agarosa de las fracciones LDL(+) y LDL(-) de los individuos NL y HF. b) Electroforesis no desnaturalizante en gradiente de acrilamida de las fracciones LDL(+) y LDL(-) de los individuos NL y HF. St es el estándar de diámetro que contiene cuatro bandas de LDL con un diámetro conocido.

y NEFA respecto a la LDL(+) en los dos grupos. Además, la LDL(-) de HF puso de manifiesto más colesterol y menos fosfolípido que su respectiva LDL(+). Por lo que respecta a las diferencias entre HF y NL, las LDL de HF presentaron más colesterol total y esterificado y menos triglicéridos y NEFA y, además, la LDL(-) de HF tenía un contenido menor de fosfolípidos, Apo E y Apo C-III que la LDL(-) de NL.

No se observaron diferencias en el contenido de MDA o antioxidantes (n = 14) entre LDL(+) y LDL(-) ni entre grupos, lo que indica que la LDL(-) no presenta evidencias de oxidación (tabla 2). Por otra parte, observamos que la LDL(-) era más resistente a la oxidación que la LDL(+) (n = 6), como indica el mayor tiempo de la fase de latencia, diferencia que fue más importante en el caso del grupo HF (tabla 2).

Respecto a la caracterización electroforética, el SDS-PAGE demostró que la Apo B de ambas fracciones se encontraba íntegra, sin evidencias de hidrólisis (datos no expuestos). En electroforesis en agarosa se observó que la LDL(–) presentó una movilidad relativa ligeramente superior (Rf = $1,1 \pm 0,1$; n = 19; p < 0,05) a la de la LDL(+) (Rf = 1,0), aunque lejos de la evidenciada por la LDLox (Rf < 2) o la LDLac (Rf < 3) (fig. 1a). Respecto al tamaño de las fracciones, el gel en gradiente acrilamida (fig. 1b) demostró que el diámetro de la LDL(-) de NL era ligeramente inferior que el de la LDL(+) (25,3 ± 0,3 nm frente a 26,1 ± 0,4 nm; p < 0,05; n = 4). Por contra, la LDL(-) de HF presentó varias bandas, la mayoritaria del mismo diámetro que la de la LDL(+) (26,2 ± 0,3; n = 4) y otras de diámetro superior a 30 nm, lo que indicaría la presencia de agregados.

Los datos de diámetro concuerdan con la distribución en densidad de la LDL(–), ya que, como se observa en la figura 2, la mayor parte de LDL(–) de NL se encuentra en las fracciones de LDL más densas mientras que sólo una pequeña proporción de la LDL(–) de HF está asociada a estas fracciones densas (NL: 67,7 \pm 3,1%; FH: 13,8 \pm 1,6; p < 0,05; n = 6), y se distribuyó principalmente en las subfracciones más ligeras.

Interacción con el rLDL

En los experimentos de cinética de saturación (n = 4) se observó que la LDL(-) de los dos grupos



Tabla 3. Parámetros de afinidad de las fracciones LDL(+) y LDL(-) por el rLDL, derivados de las cinéticas de saturación $(B_{máx} y K_D)$ y los estudios de desplazamiento $(IC_{50} y Ki)$ en cultivos de fibroblastos

	B _{máx} (pmol/l)	K _D (nmol/l)	IC ₅₀ (mg/l)	Ki (nmol/l)
NL-LDL(+)	50,1 ± 19,1	10,9 ± 5,7	17,3 ± 2,1	$5,2 \pm 0,6$
NL-LDL(-)	76,3 ± 52,1	$33,0 \pm 21,4^{a}$	$32,1 \pm 11,0^{a}$	$18,2 \pm 6,2^{a}$
HF-LDL(+)	55,5 ± 35,1	$16,7 \pm 7,2^{b}$	19,7 ± 5,4	$7,9 \pm 2,1$
HF-LDL(-)	$76,9 \pm 56,1$	$24,4 \pm 7,1^{a}$	$32,2 \pm 12,9^{a}$	$15,9 \pm 6,4^{a}$

^ap < 0,05 frente a LDL(+); ^bp < 0,05 frente a normolipémicos.

estudiados tenían menor afinidad por el rLDL que sus respectivas LDL(+), tal como indican los valores más elevados de K_D (tabla 3). Además, la LDL(+) de HF también presentó menor afinidad (mayor K_D) que la LDL(+) de individuos NL. Estos resultados se confirmaron en los estudios de desplazamiento (n = 6), donde la LDL(-) de ambos grupos presentó menor capacidad de desplazamiento que la LDL(+) (fig. 3), como indican los datos de la tabla 3, con mayor IC₅₀ y Ki en ambas LDL(-). La LDLox y la LDLac presentaron una capacidad muy baja para desplazar la unión de la DII-LDL con el rLDL.

Producción de moléculas proinflamatorias en HUVEC

La LDL(-) de los dos grupos indujo la liberación de IL-8 y MCP-1 por las HUVEC, dos y 2,5 veces

Figura 2. Curvas de desplazamiento de la unión al rLDL en cultivos de fibroblastos. Se incubaron 25 mg/l de DiI-LDL total con las concentraciones indicadas en el gráfico de LDL(+), LDL(-), LDL oxidada o LDL acetilada durante 3 h a 4 °C. A partir de estas curvas se calculó la IC50 y la Ki de la tabla 3.

respecto a la LDL(+), respectivamente (fig. 4). No se observaron diferencias ente individuos NL y HF. La LDLox también indujo la liberación de IL-8 (dos veces respecto a la LDL[-]) y de MCP-1 (del mismo orden que la LDL[-]). La liberación de PAI-1 no se vio afectada por ninguna de las LDL.

Discusión

En los últimos años el estudio de diferentes tipos de LDL modificadas ha cobrado interés dada su establecida implicación en la aterogénesis. Se sabe que la LDL es modificada en la pared arterial por diversos procesos, que incluyen la lipoperoxidación^{1,2}, la agregación, la fusión³⁰ y la formación de complejos con proteoglucanos³¹. Estas LDL modificadas inducen la acumulación de ésteres de colesterol intracelular en los macrófagos, dando lugar a la formación de células espumosas características de las lesiones arterioscleróticas; pero además la LDL oxidada induce la respuesta inflamatoria crónica característica de la arteriosclerosis³². Por otra parte, diversos estudios han descrito la presencia de LDL modificada en la circulación plasmática, y la han relacionado con el desarrollo y la progresión de la lesión arteriosclerótica^{33,34}. Dentro de estos estudios, algunos autores separaron una fracción de LDL(-) y la definieron como una LDL parcialmente oxidada^{3,6-9}, mientras que otros investigadores no encontraron evidencias de modificación oxidativa en la LDL(-)4,5,10-12. Tampoco existe consenso en lo referente a la interacción con el rLDL^{3,4,11}. A pesar de estas controver-





Clin Invest Arterioscl 2002;14(2):57-66 63



Figura 4. Western blot de los extractos de membranas de HUVEC para determinar la expresión de VCAM tras incubar durante 24 h con las diferentes LDL o con IL-1. a) Fracciones LDL(+) y LDL(-) de NL y LDL oxidada a las concentraciones indicadas. b) Fracciones LDL(+) y LDL(-) de HF a las concentraciones indicadas. La IL-1 se utilizó como control positivo. C: HUVEC sin LDL o IL-1.

sias, otras características sugieren que la LDL(-) puede estar implicada en la aterogénesis. En primer lugar, parece que los diferentes autores están de acuerdo en que la LDL(-) es citotóxica en cultivos de células endoteliales^{7,11}. Además, parece distribuirse en las fracciones de LDL de más densidad, lo que por sí mismo ya es un factor de riesgo cardiovascular³³. En otros estudios se ha observado que la proporción de LDL(-) está aumentada en afecciones con una alta incidencia de arteriosclerosis, como la HF14, la diabetes15,16,34 o en situaciones que suponen un importante estrés metabólico como el ejercicio aeróbico intenso³⁵ o la hemodiálisis³⁶. Finalmente, recientemente se ha descrito que la LDL(-) de individuos NL tiene capacidad inflamatoria, ya que induce la producción de IL-8 y MCP-113, dos quimiocinas implicadas en el reclutamiento de linfocitos y monocitos durante las fases iniciales de la lesión arteriosclerótica.

El primer resultado que se deduce de este trabajo es el hecho de que la LDL(-) de NL y HF, además de las cuantitativas, presenta diferencias cualitativas entre sí. Así, mientras que la LDL(-) de NL presenta menor tamaño y mayor densidad que la LDL(+), coincidiendo con trabajos previos^{4,8,11}. Por el contrario, la LDL(-) de HF presenta mayor tamaño y menor densidad de la LDL(-). Estas diferencias podrían sugerir un diferente origen en la LDL(-) entre los dos grupos de pacientes, aunque pueden ser simplemente una consecuencia del mavor contenido en cLDL total de los pacientes HF. En este sentido, es interesante el hecho de que en el resto de características relacionadas con el efecto biológico no se observaron diferencias entre los dos grupos.

La falta de diferencias en el contenido en antioxidantes o MDA indica que la LDL(-) de NL y HF no presenta evidencias de modificación oxidativa, e incluso se observó una mayor resistencia a la oxidación en la LDL(-). Al analizar las diferencias composicionales entre LDL(+) y LDL(-) se observa que varias de ellas pueden influir individualmente en la carga negativa, concretamente un mayor contenido en triglicéridos, NEFA, ácido siálico, Apo E o Apo C-III se ha asociado a mayor carga negativa de la LDL^{11,35,37-39}. Por tanto, está claro que la coincidencia de todas estas diferencias aumentarán la carga eléctrica negativa de la LDL, siendo innecesaria la existencia de oxidación para generar LDL(-). Respecto a la mayor resistencia a la oxidación de la LDL(-), podría estar relacionada con el mayor contenido en colesterol libre o con la mayor susceptibilidad a agregarse de la $LDL(-)^{40}$, ya que ambos factores inhiben la oxidación de la LDL^{41,42}.

Como resultado de todas estas diferencias en composición, tamaño y densidad, y probablemente de otras diferencias no determinadas, la LDL(-) de los dos grupos presenta una menor afinidad por el rLDL, como indican los valores aumentados de K_D, Ki e IC₅₀. Esta pérdida de afinidad puede resultar en un mayor tiempo de permanencia en el plasma de la LDL(-), ya que esta partícula no es reconocida por el receptor scavenger^{3,4,40}, lo que a su vez podría dar lugar a que sufriese más modificaciones durante su estancia en la circulación. Esto puede estar relacionado con la elevada proporción de LDL(-) en individuos con HF14, donde no sólo existen menos receptores funcionales, sino que además la LDL(-) tendría menos afinidad por éstos, en un mecanismo que se retroalimentaría.

Por otra parte, a pesar de no tener evidencias de oxidación, la LDL(-) de HF y NL indujo la liberación de IL-8 y MCP-1 al medio de cultivo de células endoteliales, tal como se había descrito previamente en NL¹³. Este efecto proinflamatorio se produjo en ausencia de signos visuales de citotoxicidad. Estos datos implican a la LDL(-) en la disfunción endotelial que se da en las fases iniciales del desarrollo de la lesión arteriosclerótica mediante el reclutamiento de linfocitos y monocitos hacia la zona dañada. De esta manera, la LDL no sólo actuaría sobre el endotelio una vez ha quedado atrapada en la íntima arterial y ha sido oxidada, sino que concentraciones elevadas de LDL(-) en el plasma podrían contribuir a aumentar el riesgo de enfermedad cardiovascular favoreciendo la entrada de leucocitos en la pared arterial. Este mecanismo puede tener una gran relevancia en la hipercolesterolemia, ya que aunque la LDL(-) de HF no es intrínsecamente más proinflamatoria que la de NL, su proporción en el plasma es mucho más alta, lo que unido a la mayor concentración de LDL total

hace que la cantidad absoluta de LDL(–) en HF sea entre cinco y 10 veces superior a la de los individuos NL¹⁴.

En conclusión, la LDL(–) de individuos NL y HF presenta dos características que son potencialmente aterogénicas. En primer lugar, tiene menor afinidad por el rLDL que la LDL(+), lo que provocará un aumento del tiempo de permanencia en el plasma. En segundo lugar, tiene capacidad de liberar las quimiocinas proinflamatorias IL-8 y MCP-1 en cultivos de células endoteliales. Por ello, los tratamientos terapéuticos capaces de disminuir la proporción de LDL(-), como la terapia con estatinas¹⁴, pueden tener efectos beneficiosos en la prevención de episodios cardiovasculares. Sin embargo, son necesarios más estudios que profundicen en los procesos que llevan al aumento de la propoción de LDL(-), así como en los mecanismos implicados en la producción de quimiocinas.

Agradecimientos

Queremos agradecer a Rosa Arcelus, Oscar Jorba, Sonia Alcolea y Esther Gerbolés su excelente colaboración técnica.

Bibliografía

- 1. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;16:831-42.
- Steinberg D. LDL oxidation and its pathological significance. J Biol Chem 1997;272:20963-6.
- Avogaro P, Bittolo-Bon BG, Cazzolatto G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. Arteriosclerosis 1988;8:79-87.
- Shimano H, Yamada N, Ishibashi S, Mokuno H, Mori N, Gotoda T, et al. Oxidation-labile subfraction of human plasma low density lipoprotein isolated by ion-exchange chromatography. J Lipid Res 1991;32:763-73.
- Vedie B, Myara I, Pech MA, Maziere JC, Maziere C, Caprani A, et al. Fractionation of charge-modified low density lipoproteins by fast protein liquid chromatography. J Lipid Res 1991;32:1359-69.
- Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo-Bon G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. Free Rad Biol Med 1991;11:247-53.
- Hodis HN, Kramsch DM, Avogaro P, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hwang J, et al. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (electronegative LDL). J Lipid Res 1994;35:669-77.
- Sevanian A, Hwang J, Hodis HN, Cazzolatto G, Avogaro P, Bittolo-Bon G. Contribution of an in vivo oxidized LDL to LDL oxidation and its association with dense LDL subpopulations. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;16:784-93.
- Sevanian A, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hodis H, Hwang J, Zamburlini A, et al. Electronegative LDL is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. J Lipid Res 1997;38:419-28.
- Chappey B, Myara I, Benoit MO, Maziere C, Maziere JC, Moatti N. Characteristics of ten charge-differing subfractions isolated from human native low density lipoprotein (LDL). No evidence of peroxidative modifications. Biochim Biophys Acta 1995;1259:261-70.
- Demuth K, Myara I, Chappey B, Vedie B, Pech-Ansellem MA, Haberland ME, et al. A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;16:773-83.

Clin Invest Arterioscl 2002;14(2):57-66 65

- Nyyssönen K, Kaikkonen J, Salonen JT. Characterization and determinants of an electronegatively charged low density lipoprotein in human plasma. Scand J Clin Lab Invest 1996;56:681-9.
- De Castellarnau C, Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Caveda L, Rosa R, Vila L, et al. Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:2281-7.
- Sánchez-Quesada JL, Otal-Entraigas C, Franco M, Jorba O, González-Sastre F, Blanco-Vaca F, et al. Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with familial hypercholesterolemia. Am J Cardiol 1999;84:655-9.
- Sánchez-Quesada JL, Pérez A, Caixàs A, Ordóñez-Llanos J, Carreras G, González-Sastre F, et al. Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control. Diabetologia 1996;39:1469-76.
- Sánchez-Quesada JL, Pérez A, Caixàs A, Rigla M, Payés A, Benítez S, et al. Effect of glycemic optimization on electronegative lowdensity lipoprotein in diabetes: nonenzymatic glycosylation and oxidative modifications. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:3243-9.
- Steinbrecher UP. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid decomposition products. J Biol Chem 1987;262:3603-8.
- Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:333-7.
- Li K. Determination of sialic acids in human serum by reversedphase liquid chromatography with fluorimetric detection. J Chromatography 1992;579:209-13.
- Bailey AL, Wortley G, Southon S. Measurement of aldehydes in low-density lipoprotein by high performance liquid chromatography. Free Rad Biol Med 1997;23:1078-85.
- Sánchez-Quesada JL, Ortega H, Payés-Romero A, Serrat-Serrat J, González-Sastre F, Lasunción MA, et al. LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects. Atherosclerosis 1997;132:207-13.
- Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Franco M, Otal C, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J. Density distribution of electronegative LDL (LDL[-]) in normolipemic and hyperlipemic subjects. J Lipid Res 2002 (en prensa).
- Caixàs À, Ordóñez-Llanos J, De Leiva A, Payés A, Homs R, Pérez A. Optimization of glycemic control by insulin therapy decreases the proportion of small dense LDL particles in diabetic patients. Diabetes 1997;46:1207-13.
- Sánchez-Quesada JL, Homs-Serradesanferm R, Serrat-Serrat J, Serra-Grima JR, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos J. Increase of LDL susceptibility to oxidation occuring after intense, long duration exercise. Atherosclerosis 1995;118:297-305.
- Stephan ZF, Yurachek EC. Rapid fluorimetric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. J Lipid Res 1993;34:325-30.
- Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann N Y Acad Sci 1949;51:660-72.

- Cheng YC, Prussoff WH. Relationship between the inhibition coinstant (Ki) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC50) of an enzymatic reaction. Biochem Pharmacol 1973;22:3099-108.
- Camacho M, Godessart N, Antón R, García M, Vila L. Interleukin-1 enhances the ability of cultured human umbilical vein endothelial cells to oxidize linoleic acid. J Biol Chem 1995;270:17279-86.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
 Oorni K, Pentikainen O, Ala-Korpela, Kovanen PT. Aggregation,
- Oorni K, Pentikainen O, Ala-Korpela, Kovanen PT. Aggregation, fusion and vesicle formation of modified low density particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. J Lipid Res 2000;41:1703-14.
- Yla-Herttuala S, Jaakkola O, Solakavi T, Kuivaniemi H, Nikkari T. The effect of proteoglycan, collagen and lysyl oxidase on the metabolism of low density lipoprotein by macrophages. Atherosclerosis 1986;62:73-80.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. N Engl J Med 1999;340:115-26.
- Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willet WC, Krauss RM. Low density lipoproteins subclass patterns and the risk of myocardial infarction. JAMA 1988;260:1917-21.
- Moro E, Alessandrini P, Zambon C, Pianetti S, Pais M, Cazolatto G, et al. Is glycation of low density lipoproteins in patients with type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition? Diabet Med 1999;16:663-9.
- Benítez S, Sánchez-Quesada JL, Lucero L, Arcelus R, Ribas V, Jorba O, et al. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. Atherosclerosis 2002; 160:223-32.
- Ziouzenkova O, Asatryan L, Akmal M, Tetta C, Wratten ML, Loseto-Wich G, et al. Oxidative cross-linking of Apo B-100 and hemoglobin results in low density lipoprotein modification in blood. J Biol Chem 1999;27:18916-24.
- Camejo G, López A, López F, Quiñones J. Interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans: the role of charge and sialic acid content. Atherosclerosis 1985;55:93-105.
- McKeone B, Patsch J, Pownall H. Plasma triglycerides determine low density lipoprotein composition, physical properties and cellspecific binding in cultured cells. J Clin Invest 1993;91:1926-33.
- La Belle M, Blanche PJ, Krauss RM. Charge properties of low density lipoprotein subclasses. J Lipid Res 1997;38:690-700.
- Benítez S. LDL electronegativa: caracterización físico-química y biológica en individuos normolipémicos e hipercolesterolémicos (tesis doctoral). Barcelona: Universitat Autónoma de Barcelona, 2002.
- Tribble DL. Lipoprotein oxidation in dyslipemia: insights into general mechanisms affecting lipoprotein oxidative behavior. Curr Opin Lipidol 1995;6:196-208.
- Hermann M, Gneimer B. Altered susceptibility to in vitro oxidation of LDL in LDL complexes and LDL aggregates. Arterioscler Thromb 1992;12:1503-6.