

Comparación de dos ensayos funcionales del receptor de lipoproteínas de baja densidad para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar

Y. Suárez^a y M.A. Lasunción^{a,b}

^aServicio de Bioquímica-Investigación. Hospital Ramón y Cajal. ^bUniversidad de Alcalá de Henares. Madrid.

Fundamento. La causa más común de hipercolesterolemia familiar es la deficiencia del receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL). La determinación de su actividad en el laboratorio es dificultosa, por lo que se rehúye y, en la mayoría de los casos, los criterios clínicos son suficientes para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Por otra parte, la búsqueda de mutaciones en el gen del receptor, aunque permite establecer con alta probabilidad de acierto la causa de la enfermedad, puede ser en vano cuando la causa de la hipercolesterolemia no reside en el receptor, por lo que sigue siendo necesaria la caracterización bioquímica del rLDL.

Métodos. Con esta finalidad se aislaron células mononucleares de sangre periférica de individuos con hipercolesterolemia, se incubaron en un medio libre de colesterol para estimular máximamente la expresión del rLDL y se determinó la captación de LDL marcadas con el fluorocromo 1,1'-diocadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (DiI-LDL) mediante citometría de flujo, expresándose los resultados de B_{\max} de "captación de DiI-LDL" en porcentaje respecto al control. Al mismo tiempo, se estudió la capacidad de las LDL para revertir la

inhibición de la proliferación producida por la lovastatina *in vitro*, calculándose la "tasa de recuperación por LDL".

Resultados. Cualquiera de los métodos permitió distinguir claramente los pacientes con HF homocigota de los heterocigotos. Estos últimos presentaban disminuidas la "captación de DiI-LDL" ($60,3 \pm 1,5\%$) y la "tasa de recuperación por LDL" ($56,4 \pm 4,5\%$) con respecto a los controles. En conjunto, ambos parámetros están correlacionados pero existen casos que se alejan de este comportamiento, como los heterocigotos con defecto en la internalización y las alteraciones que no afectan al rLDL.

Conclusión. Por tanto, ambos métodos son complementarios y permiten un diagnóstico fiable de la hipercolesterolemia.

Palabras clave:

Receptor de LDL. Hipercolesterolemia familiar. Citometría de flujo. DiI. Proliferación celular.

COMPARISON OF TWO FUNCTIONAL LDL-RECEPTOR ASSAYS FOR THE DIAGNOSIS OF FAMILIAR HYPERCHOLESTEROLEMIA

Background. LDL receptor (LDLr) deficiency is the most common cause of familial hypercholesterolemia (FH). The analysis of LDLr activity is time consuming and has many difficulties which, together with that hereditary trait and clinical criteria are often enough for its diagnosis and treatment, are the reasons for not being generally carried out in the laboratory.

Este trabajo ha sido realizado con una ayuda del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS99/0286).

Correspondencia: Dr. M. A. Lasunción.
Servicio de Bioquímica-Investigación.
Hospital Ramón y Cajal.
Ctra. Colmenar, km 9. 28034 Madrid.
Correo electrónico: miguel.a.lasuncion@hrc.es

Identification of mutations in the LDLr gene is valuable and allows to establish the cause of the disease, but it may be in vain if the cause of the hypercholesterolemia does not reside in the LDLr. For this reason, the analysis of LDLr activity is still required for the biochemical characterisation of the disease. With this aim, in the present study we comparatively employed two functional assays for the analysis of the LDLr activity.

Methods. Mononuclear cells from patients with hypercholesterolemia were isolated from whole blood and incubated in a cholesterol free medium to maximally stimulate the expression of the LDLr and the uptake of DiI-labelled LDL was analysed by flow cytometry. The results were expressed as "uptake of DiI-LDL" and are given as percent of Bmax of the control. In parallel we also analysed the ability of LDL to prevent the lovastatin-induced inhibition of cell proliferation, and the results were expressed as the "rate of recovery by LDL".

Results. Whichever of the methods employed allowed the clear distinction of patients homozygous from those heterozygous for familial hypercholesterolemia (FH). The latter ones showed an uptake of DiI-LDL ($60.3 \pm 1.5\%$) and a rate of recovery ($56.4 \pm 4.5\%$) approximately half of those in the controls. In the whole group of individuals studied, these parameters were well correlated one to each other but there were some exceptions, as an heterozygote with an internalization defect in the LDLr and a case in whom the alteration did not affect the LDLr protein but the intracellular processing of LDL lipids.

Conclusions. Thus, both methods are complementary and allow a trustworthy diagnosis of hypercholesterolemia.

Key words:

LDL receptor. Familial hypercholesterolemia. Flow cytometry. DiI. Cell proliferation.

Introducción

El receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL) es una glucoproteína presente en la membrana celular de la mayoría de los tejidos, que permite el reconocimiento y la captación específica de las LDL –principal transportador de colesterol en plasma en humanos– facilitando su posterior degradación lisosomal^{1,2}. La actividad de este receptor determina los valores plasmáticos de colesterol ligado a LDL (cLDL)³, siendo responsable de más del 70% de la eliminación de las LDL plasmáticas, proceso que principalmente ocurre en el hígado,

donde tiene una elevada presencia. Mutaciones en el gen que codifica para el rLDL causan la hipercolesterolemia familiar (HF)² que es una enfermedad monogénica autosómica codominante que se caracteriza clínicamente por una concentración sérica de cLDL elevada, la aparición de xantomas tendinosos y enfermedad coronaria prematura^{2,4}. La prevalencia de esta enfermedad es elevada, estimándose que un 0,2% de la población presentan algún alelo afectado, siendo en forma homocigota tan sólo de 1:1.000.000⁴; la hipercolesterolemia en estos pacientes es mucho más intensa que en los heterocigotos, siendo las complicaciones arterioscleróticas muy prematuras y frecuentes, por lo que sin un tratamiento intensivo para disminuir la concentración plasmática de cLDL, como la aféresis de LDL^{5,6}, estos pacientes rara vez alcanzan la edad adulta⁴. Hasta la fecha se ha caracterizado un gran número de mutaciones en el gen del rLDL⁷, mutaciones que dan lugar a cinco clases de defectos funcionales^{1,4,8,9} y que pueden afectar a la síntesis, el transporte intracelular, la unión del ligando, la internalización y el reciclaje del receptor. De acuerdo con el defecto molecular, la internalización neta de LDL por las células se encuentra reducida en las cinco clases de defectos, mientras que la unión de las LDL lo está en todas las clases menos en la clase 4^{1,4}, lo que permite la distinción funcional de la clase 4 del resto de fenotipos.

Por otro lado, la presencia de receptores funcionales en las células es requerida para una correcta provisión de colesterol a partir de las LDL¹⁰. Este hecho se pone de manifiesto, principalmente, en las células proliferantes que presentan unas elevadas demandas de colesterol¹¹⁻¹⁴. Por tanto, si se inhibe la síntesis de colesterol, las células dependen de la utilización del colesterol de las lipoproteínas para poder mantener un crecimiento normal¹⁵. A este respecto, las LDL son muy eficaces a la hora de revertir la inhibición de la proliferación de linfocitos inducida por estatinas –inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa– pero no así cuando las células no expresan el receptor para estas lipoproteínas^{16,17}. Esta aproximación –utilización del cLDL para mantener la proliferación en células sometidas a la acción de estatinas– se ha empleado para determinar la actividad funcional del rLDL, por sus ventajas sobre los estudios de unión e internalización de las LDL^{16,18}. No obstante, pocos son los estudios que han analizado la repercusión de alteraciones en la funcionalidad del rLDL sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos¹⁷. Este aspecto es interesante porque, además de aportar colesterol a las células, las LDL ejercen acciones

sobre la transducción de señales que pueden incidir sobre la proliferación celular^{19,20}.

La relativamente elevada prevalencia de la HF y el riesgo cardiovascular que entraña, demandan un diagnóstico preciso. Éste se basa en la historia familiar, los datos clínicos y el grado de la hipercolesterolemia^{4,21}, pero la comprobación definitiva exige la determinación bioquímica de la actividad del rLDL o la caracterización del defecto molecular^{22,23}. Aunque existen diversos métodos de estudio del rLDL^{1,24-26}, son los ensayos funcionales^{1,16,17} los que más información aportan ya que, por ejemplo, la detección en la membrana celular del rLDL no informa si este receptor es funcional o no²⁷. Por ello, se han desarrollado múltiples métodos para medir la actividad del rLDL en diferentes tipos celulares, desde fibroblastos hasta células sanguíneas²⁸⁻³⁰. Históricamente, los más extendidos han sido los que utilizan LDL marcadas con ¹²⁵I para el análisis de su unión, internalización y degradación^{1,28}. Recientemente se han descrito otros métodos que utilizan LDL marcadas con compuestos fluorescentes como, por ejemplo, el DiI (1,1'-dioc-tadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina), y posterior análisis mediante citometría de flujo^{17,31-33}. Entre las ventajas de este último método cabe citar la no utilización de radiactividad, la estabilidad de las LDL marcadas con DiI a diferencia de las marcadas con ¹²⁵I³⁰ y la versatilidad e información que facilita la propia citometría de flujo. Otra alternati-

va de estudio funcional consiste en el estudio de la capacidad de las LDL para recuperar la proliferación de linfocitos estimulados con fitohemoaglutina y expuestos a la acción de estatinas *in vitro*¹⁶, donde la falta de respuesta a las LDL se interpreta como consecuencia de la falta de receptor activo.

En el presente trabajo hemos comparado los resultados sobre actividad del rLDL obtenidos mediante su estudio por citometría de flujo con DiI-LDL, con la capacidad de las LDL para mantener la proliferación celular, todos ellos aplicados en linfocitos procedentes de pacientes con hipercolesterolemia, con el objetivo de evaluar la calidad diagnóstica de estos ensayos funcionales, así como determinar las relaciones entre la funcionalidad del rLDL y la proliferación celular.

Pacientes y métodos

Descripción de los pacientes

Los pacientes fueron remitidos desde distintos servicios del Hospital Ramón y Cajal o desde otros centros hospitalarios. Sus perfiles lipídicos y de lipoproteínas en el momento de iniciarse este estudio se recogen en la tabla 1, donde puede apreciarse que la mayoría presentaban hipercolesterolemia, si bien en algunos casos ésta no era tan patente debido a que estaban siendo sometidos a tratamientos hipolipemiantes. El paciente #11 no presentaba hipercolesterolemia ni recibía tratamiento alguno, pero se incluyó en el estudio por ser la madre del paciente #10. Los datos de los pacientes #1 y #3 corresponden a momentos antes de iniciarse la sesión quincenal de aféresis de LDL a la que son sometidos en nuestro hospital y sus características clínicas han sido descritas previamente^{6,17,31,34}.

Tabla 1. Concentraciones lipídicas de los pacientes estudiados. En los casos señalados*, los datos corresponden a la extracción previa a la sesión de aféresis de LDL a la que se someten quincenalmente

	Colesterol total (mg/dl)	cLDL (mg/dl)	cHDL (mg/dl)	Apo B (mg/dl)	Apo A-I (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)
# 1*	401	338	47	189	116	77
# 2	466	397	46	—	—	113
# 3*	469	407	42	229	114	97
# 4	302	223	68	163	194	49
# 5	275	216	49	168	143	48
# 6	414	374	22	295	67	86
# 7	696	638	23	450	79	170
# 8	342	281	42	224	122	90
# 9	393	337	26	295	78	146
# 10	589	499	72	74	181	87
# 11	212	130	65	—	—	84
# 12	282	232	40	122	151	49
# 13	512	413	75	251	168	116
# 14	223	137	71	96	147	71
# 15	332	240	57	196	160	169
# 16	355	277	31	231	96	230
# 17	414	343	40	248	106	153
# 18	262	206	46	131	99	49
# 19	396	330	40	217	105	128
# 20	288	212	55	119	140	107
# 21	410	297	32	120	104	408

Los controles fueron dos individuos sanos, sin alteración en su perfil de lípidos y lipoproteínas. Todos ellos fueron informados y dieron su consentimiento para la realización de este estudio.

Aislamiento de linfocitos y cultivo

Las células mononucleares de sangre periférica humana fueron aisladas por centrifugación en gradiente de densidad sobre LymphoPrep (Nycomed; densidad 1,077 g/ml)^{35,36}, a partir de 20 ml de sangre que se extrajo en tubos que contenían heparina. Cuando estas células se destinaban al estudio de la actividad del rLDL^{17,31}, se resuspendían en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF). Las células ($0,5 \times 10^6$ células/ml) se mantuvieron en ese medio durante 24 h para permitir la adhesión de los monocitos al fondo del frasco de cultivo (Nunc, Costar). Posteriormente, se recogieron las células no adheridas (sobre todo linfocitos) y se resuspendieron en el medio anterior pero suplementado con un 10% de suero deficiente de lipoproteínas (LPDS) en lugar de SBF, incubándose a 37 °C en un incubador con CO₂ al 5%, durante 4 días para conseguir la estimulación de la expresión del rLDL.

Aislamiento y marcaje de las lipoproteínas

Las LDL fueron aisladas a partir de sueros de donantes normolipémicos por ultracentrifugación en gradiente en un rotor vertical (Vti 50, Beckman)³⁷. La banda intermedia conteniendo las LDL fue extraída y dializada exhaustivamente frente a NaCl 0,15 M (Merck) con EDTA.Na₂ 1 mM (Merck), pH 7,4, durante 24 h y esterilizadas por filtración (0,45 µm; Millex, Millipore). Finalmente, se guardaron a 4 °C y se utilizaron en un período de tiempo no superior a una semana. La concentración de colesterol fue determinada enzimáticamente (Menarini). Por otro lado, las LDL fueron marcadas con el fluorocromo lipofílico DiI (Molecular Probes, Europe BV)^{17,31,38,39}. Para ello, se disolvieron 3 mg de DiI en 1 ml de DMSO, y de esta solución se añadió lo necesario a una solución de LDL en LPDS para conseguir una proporción final de 300 µg de DiI por cada miligramo de proteína de LDL. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 12 h en la oscuridad. Las LDL ya marcadas se repurificaron por ultracentrifugación en equilibrio de densidad (1,125 g/ml) y se dializaron frente a NaCl 0,15 M, siendo finalmente esterilizadas por filtración.

Ensayos de internalización y de unión de DiI-LDL y análisis por citometría de flujo

Tras su incubación en presencia de LPDS para regular al alza la actividad del rLDL, se recogieron las células en suspensión y se incubaron ($1,5 \times 10^6$ células/ml) con concentraciones crecientes de DiI-LDL durante 2 h a 37 °C para la cinética de internalización, o durante 2 h a 4 °C para la de unión. En ambos casos también se realizó el ensayo no específico en presencia de un exceso de 50 veces de LDL no marcada para cada concentración de DiI-LDL utilizada. Tras las correspondientes incubaciones, las células fueron lavadas con PBS y finalmente resuspendidas en 1 ml para su análisis por citometría de flujo^{17,31}.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton-Dickinson) equipado con un láser de argón con una longitud de onda de emisión de 488 nm. De cada muestra se analizaron 10.000 células con amplificación logarítmica de su intensidad de fluorescencia. Se analizó la población de linfocitos, la cual se seleccionó por los criterios de

tamaño y complejidad, que resultó ser una población homogénea. Los resultados se expresaron en términos de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF), después de sustraer el valor correspondiente a la autofluorescencia que se obtiene con las células incubadas en ausencia de DiI-LDL. Este resultado, que es representativo de una población de 10.000 células, constituye un dato para la elaboración de la curva de saturación.

Los cálculos matemáticos para la estimación de los datos cinéticos de la unión e internalización se realizaron con ayuda del programa Prism 2.01 (GraphPad Software). Para comparar la actividad del rLDL en los distintos pacientes, se calcularon los datos de B_{máx} de las cinéticas de internalización y se expresaron en porcentaje con respecto al control sano que se analizó en paralelo.

Ensayos de proliferación celular

Las incubaciones se llevaron a cabo tal como describen Cuthbert et al^{10,16}, con pequeñas modificaciones¹⁷. Las PBMC se aislaron como se indicó anteriormente, resuspendiéndose en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% LPDS y 2,5 g/ml de fitohemaglutinina (Wellcome Reagents Ltd.) e incubándose en placas estériles de 96 pocillos (Multiscreen-HV, Millipore) en un volumen final de 225 µl a una densidad de $0,25 \times 10^5$ células/ml. Los cultivos se suplementaron o no con 0,5 µM de lovastatina disuelta en DMSO (concentración final por pocillo, 0,05%) para inhibir la síntesis endógena de colesterol, y en presencia de distintas concentraciones de LDL. Tras 72 h de incubación a 37 °C en incubador con atmósfera al 5% de CO₂, se determinó la proliferación celular mediante la incorporación de [³H-metil]-timidina (5 Ci/mmol; Amersham) al ADN. Una hora antes de añadir el isótopo radiactivo, las células se incubaron con 5-fluorodesoxiuridina 10 mM para bloquear la síntesis endógena de timidina. A continuación se les añadió 0,5 µCi de [³H-metil]-timidina y se incubaron durante 18 h en su presencia. Se lavaron las células con NaCl 0,15 M y se recolectaron sobre filtros usando el sistema Millipore. La radiactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo (modelo LS 3800, Beckman Instruments)¹⁷.

Para comparar los distintos pacientes se utilizó el dato de tasa de recuperación por LDL, que corresponde a la pendiente de la recta de regresión que delimitan los datos de incorporación de [³H-metil]-timidina al ADN para las concentraciones de cLDL comprendidas entre 0 y 2 g/ml, donde la respuesta es lineal. Este valor de la pendiente se expresó como porcentaje del observado en las células control, que se ensayan en paralelo.

Resultados

En primer lugar, se estudió la actividad de rLDL por citometría de flujo en linfocitos procedentes de pacientes con hipercolesterolemia, cuyo perfil de lipoproteínas en plasma se refleja en la tabla 1. En la figura 1 se representan los resultados de internalización y unión específica obtenidos con linfocitos de un control sano y los linfocitos de tres pacientes con HF, dos de ellos en condición homocigota (pacientes #1 y #3) y el tercero (paciente #2) en condición heterocigota. El paciente #1 es homocigoto para la mutación N804K (FH_{Colmenar}), en el exón 17, y afecta a la región citoplasmática impidiendo a la proteína alojarse correctamente en las fosas de cla-

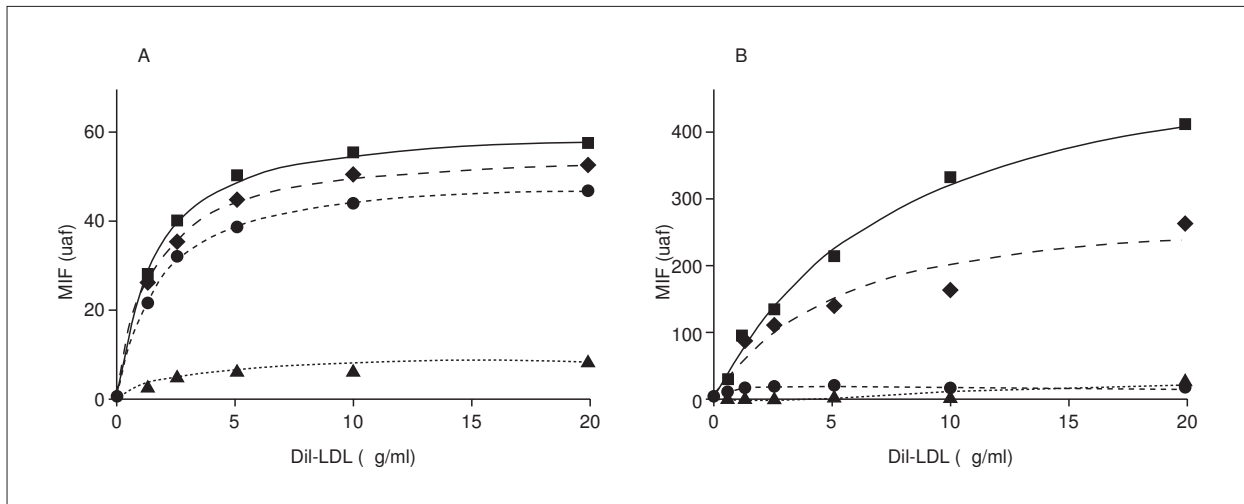


Figura 1. Cinéticas de unión (A) y de internalización (B) específicas de LDL en linfocitos de pacientes con hipercolesterolemia familiar. Se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica y se incubaron en presencia de DiI-LDL durante 2 h a 4 °C (A) o a 37 °C (B) tras 4 días de incubación en un medio libre de colesterol. Se procesaron para su análisis mediante citometría de flujo, obteniéndose los valores de mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) para cada condición y se calcularon los datos de unión e internalización específica ("total" menos "no específica"). Las células se obtuvieron de un control sano (■), de un paciente clínicamente heterocigoto (paciente #2) (♦) –padre del paciente portador de la mutación N804K–, así como de dos pacientes con hipercolesterolemia familiar en condición homocigota portadores de las mutaciones N804K (paciente #1) (●) y D280G/G528V (paciente #3) (▲). uaf: unidades arbitrarias de fluorescencia.

trina, por lo que el receptor se expresa en la membrana, une las LDL, pero no es capaz de internalizarlas¹⁷. El paciente #2 es el padre del paciente #1 y es portador de la mutación FH_{Colmenar} en condición heterocigota. Por último, el paciente #3 es un heterocigoto compuesto para dos mutaciones distintas, la D280G (exón 6) y la G528V (exón 11), que afectan, respectivamente, a la región de unión y a la región de homología con el precursor de EGF, produciendo un fenotipo de clase 2⁴⁰. Al comparar las curvas de saturación, queda patente la práctica ausencia de unión específica de DiI-LDL en el paciente #3, con una $B_{m\acute{a}x}$ de un 15% respecto a la observada en el control (fig. 1A). Por el contrario, los linfocitos procedentes de los pacientes #1 y #2 presentaron una capacidad de unión muy similar a la del individuo control, esto es, unieron las LDL de forma eficiente, siendo la $B_{m\acute{a}x}$ para cada uno de ellos, de un 83 y de un 92% respecto al control, además de presentar unos valores de K_d muy similares al del control (1,74, 1,52 y 1,5 g/ml, respectivamente). Estos resultados son acordes con el defecto molecular presentado por estos pacientes. Por otro lado, los dos pacientes con HF homocigota presentaron una muy baja internalización de LDL (fig. 1B), siendo el valor de $B_{m\acute{a}x}$ del paciente #1 inferior al 10% respecto al control, a pesar de presentar una elevada capacidad de unión. En cambio, el paciente #2 presentó una K_d de interna-

lización de 10,2 g/ml de DiI-LDL, muy similar a la presentada por el control, pero un valor de $B_{m\acute{a}x}$ de internalización de aproximadamente la mitad de la del control, de acuerdo con su condición de heterocigoto (tabla 2).

Como ya se ha mencionado, otro de los objetivos de este apartado era estudiar la capacidad de las LDL para revertir la inhibición de la proliferación producida por la lovastatina (inhibidor competitivo de la HMG-CoA reductasa), para así determinar el papel del rLDL en este fenómeno. Para ello, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes anteriormente comentados (pacientes #1, #2 y #3) además de controles sanos, se incubaron en presencia o ausencia de lovastatina 0,5 M, en un medio suplementado con concentraciones crecientes de cLDL, y se estudió la incorporación de [³H-metil]-timidina al ADN como medida de la proliferación celular. Los datos representados en la figura 2 corresponden a las tasas de proliferación expresadas como porcentajes con respecto a las células incubadas en ausencia de lovastatina. Así, se puede observar que en ausencia de LDL en el medio, la lovastatina inhibió intensamente la proliferación, pero la adición de LDL previno eficientemente este efecto en las células del control sano. En cambio, en las células procedentes de los pacientes con HF homocigota (pacientes #1 y #3), las LDL no permitieron restablecer la prolifera-

Tabla 2. Captación de DiI-LDL y tasa de recuperación por LDL

	Porcentaje respecto al control (sano)	
	Captación de DiI-LDL	Tasa de recuperación por LDL
#1	6	4,4
#2	55	94,4
#3	19	4,2
#4	61	41
#5	53	30,7
#6	11,4	7,6
#7	3	4,9
#8	54	56
#9	96	35
#10	90	99,5
#11	86	84,4
#12	67	74
#13	64,5	37,5
#14	62	59
#15	63	53
#16	65,6	74
#17	60	55,8
#18	57	79
#19	68	40,4
#20	53,5	37,5
#21	98	77

El dato de captación de DiI-LDL es el valor de $B_{m\max}$ obtenido en las cinéticas de internalización para cada paciente y referido en porcentaje con respecto al control sano analizado en paralelo. La tasa de recuperación por LDL es el valor de la pendiente, referido en porcentaje respecto al control, de los datos de incorporación de [3 H-metil]-timidina al ADN para las concentraciones de cLDL comprendidas entre 0 y 2 g/ml, entre las cuales la respuesta de las células controles es lineal

ción, lo cual está en concordancia con el defecto en el receptor que presentan estos pacientes y que impide la captación celular de dichas lipoproteí-

nas. De hecho, como hemos visto, las células de ambos pacientes son incapaces de internalizar LDL. Por tanto, en estos casos, una baja captación de DiI-LDL (6 y 19%) se corresponde con bajas tasas de recuperación por LDL (4,4 y 4,2%, respectivamente) (tabla 2). Curiosamente, en el caso del paciente #2 –heterozigoto para la mutación FH_{Colmenar}(N804K)–, las LDL también fueron capaces de prevenir la inhibición de la proliferación celular inducida por la lovastatina (fig. 2). Así pues, en este caso, a pesar de presentar una capacidad intermedia para internalizar LDL (55%), ésta era suficiente para restaurar por completo la inhibición de la proliferación celular (tasa de recuperación por LDL, 94,4%) (tabla 2).

Otros casos que resultan interesantes comentar son los de los pacientes #8 y #9 (tablas 1 y 2). El primero estaba diagnosticado clínicamente de una HF en condición heterozigota, aunque su defecto molecular en el gen de rLDL está por determinar, y el #9 era una paciente con enfermedad del almacenamiento de ésteres de colesterol (CESD) que se caracteriza por una deficiencia en la actividad de la lipasa ácida lisosomal (LAL). Cuando se procedió a estudiar la internalización de las DiI-LDL, se pudo comprobar que la paciente #9 presentaba una actividad de rLDL similar a la del control ($B_{m\max}$, 96% con respecto al control sano) y superior a la del paciente #8, con un valor de $B_{m\max}$ del 54% (fig. 3). Habitualmente, en los linfocitos procedentes del control sano las LDL recuperaron la inhibición de la proliferación producida por la lovastatina, mientras que en los del heterozigoto (paciente #8) pre-

Figura 2. Recuperación por LDL de la inhibición de la proliferación producida por lovastatina 0,5 mM en linfocitos de sangre periférica procedentes de pacientes con hipercolesterolemia familiar. Las células mononucleadas de sangre periférica se aislaron de un control sano (■), de un paciente clínicamente heterozigoto (paciente #2) (◆) –padre del paciente portador de la mutación N804K–, así como de dos pacientes con hipercolesterolemia familiar en condición homozigota portadores de las mutaciones N804K (●) y D280G/G528V (▲), pacientes #1 y #3, respectivamente. Las células se incubaron en un medio libre de colesterol en presencia de lovastatina 0,5 mM y concentraciones crecientes de cLDL, se estimularon con fitohemaglutinina durante 72 h y se determinó la proliferación mediante la incorporación de [3 H-metil]-timidina al ADN. Los resultados se expresan en porcentaje respecto a la condición control, en ausencia de lovastatina. Los datos corresponden a la media de cuadruplicados de un experimento representativo, donde el error estándar no superó el 9,4% en ningún caso.

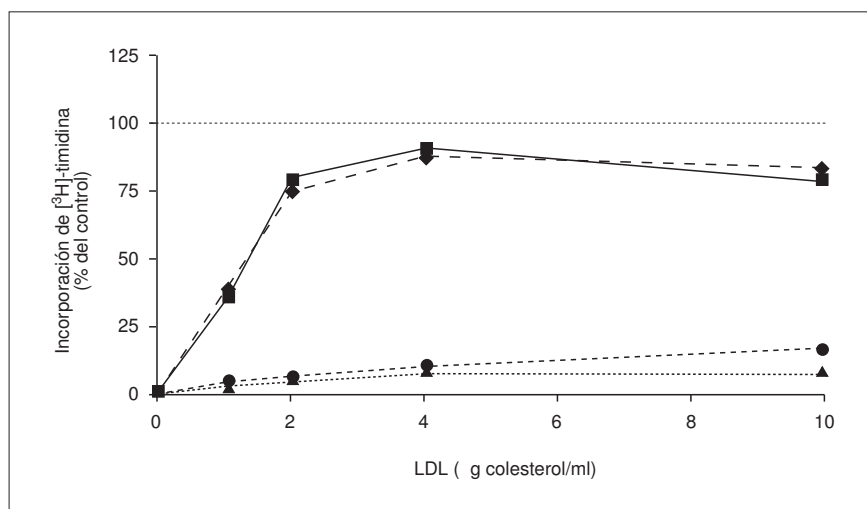
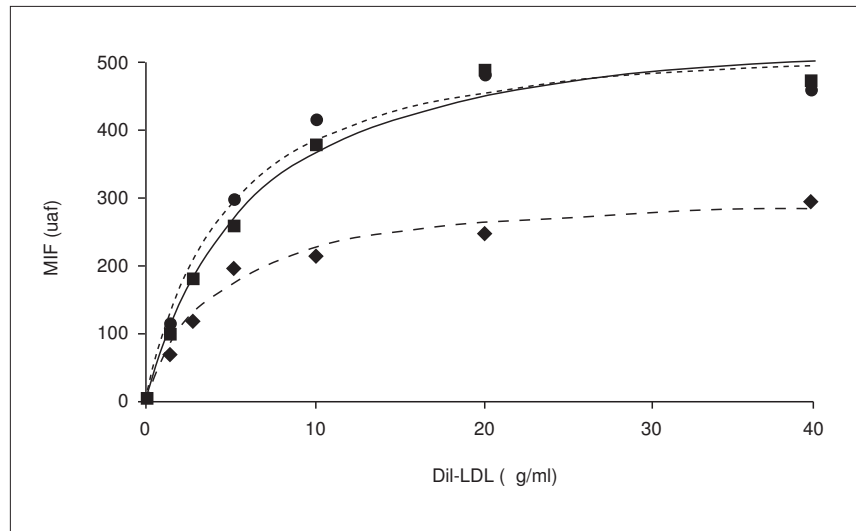


Figura 3. Cinéticas de internalización específica de LDL en linfocitos de pacientes con hipercolesterolemia. Se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica y se incubaron en presencia de DiI-LDL durante 2 h a 37 °C tras 4 días de cultivo en un medio libre de colesterol. Se procesaron para su análisis mediante citometría de flujo, obteniéndose los valores de mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) para cada condición y se calcularon los datos de internalización específica ("total" menos "no específica"). Las células se obtuvieron de un control sano (■), de un paciente clínicamente heterocigoto (◆) (paciente #8), así como de una paciente con enfermedad de CESD (●) (paciente #9). uaf: unidades arbitrarias de fluorescencia.



sentaron una eficiencia intermedia (fig. 4). En las células de la paciente con CESD, curiosamente, la eficiencia de las LDL para recuperar la proliferación era menor que en los controles, a pesar de que la actividad de rLDL era normal (fig. 3). Ahora bien, el colesterol libre, no asociado a lipoproteínas y que no entra en la célula por la vía endocitótica, sí que era capaz de restablecer la proliferación celular en los linfocitos de la paciente con CESD, con una eficiencia similar a la presentada por las células controles (fig. 5). Por tanto, en un caso, el del paciente #8, existe una concordancia entre la captación de DiI-LDL y la tasa de recuperación por LDL (54 y 56%, respectivamente) (tabla 2), mientras que en el caso de la paciente #9, una actividad de receptor normal no es suficiente para asegurar

una correcta utilización de las LDL con fines proliferativos (tabla 2).

Esta aproximación experimental se aplicó a otros pacientes con hipercolesterolemia para evaluar su calidad diagnóstica. Los resultados de captación de DiI-LDL y tasa de recuperación por LDL se incluyen en la tabla 2. En conjunto, los resultados obtenidos por ambos métodos de análisis permiten agrupar a los pacientes con hipercolesterolemia pero de distinta etiología, en tres grupos (fig. 6). Así, se puede distinguir claramente el grupo de pacientes con HF homocigota, que se caracterizan por presentar una baja captación de DiI-LDL y una baja tasa de recuperación por LDL. Por otro lado, también se puede distinguir el grupo de pacientes con HF heterocigota, que presentan valores inter-

Figura 4. Recuperación por LDL de la inhibición de la proliferación producida por lovastatina 0,5 mM en linfocitos de sangre periférica procedentes de pacientes con hipercolesterolemia. Las células mononucleadas de sangre periférica se aislaron de un control sano (■), de un paciente clínicamente heterocigoto (paciente #8) (◆), así como de una paciente con enfermedad de CESD (paciente #9) (●). Las células se incubaron en un medio libre de colesterol en presencia de lovastatina 0,5 mM y concentraciones crecientes de cLDL, se estimularon con fitohemaglutinina durante 72 h y se determinó la proliferación mediante la incorporación de [³H-metil]-timidina al ADN. Los resultados se expresan en porcentaje respecto a la condición control, en ausencia de lovastatina. Los datos corresponden a la media de cuadruplicados de un experimento representativo, donde el error estándar no superó el 11% en ningún caso.

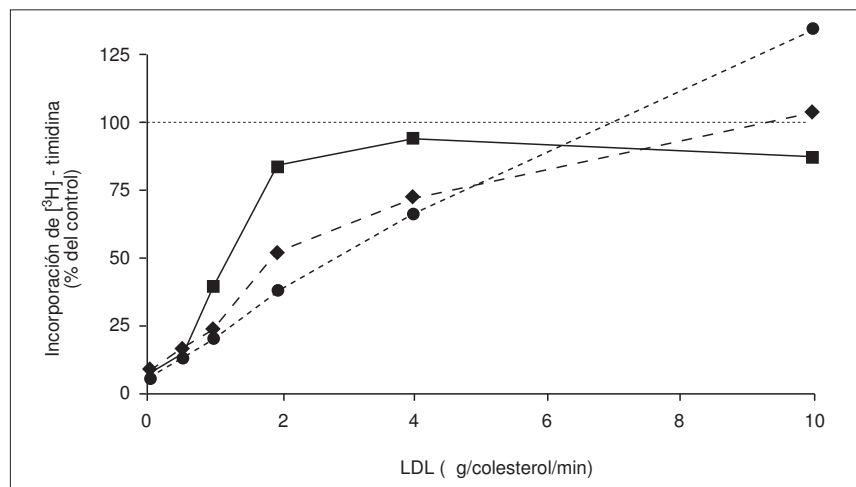
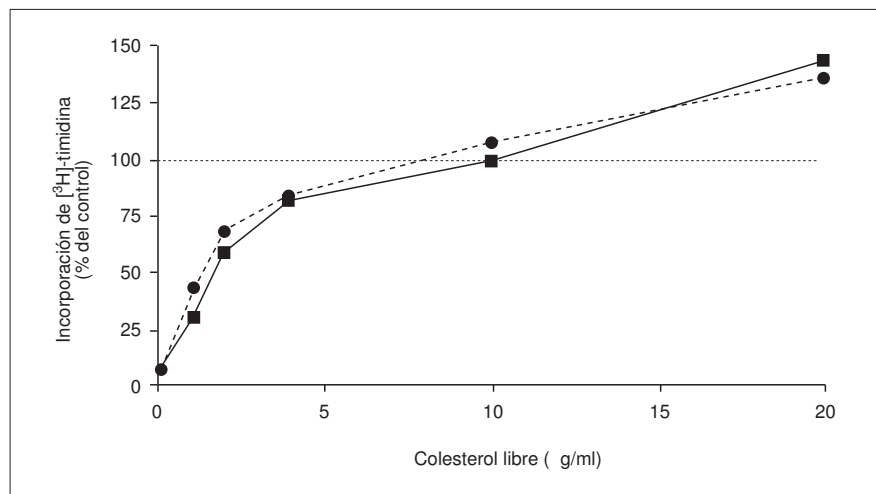


Figura 5. Recuperación por colesterol libre de la inhibición de la proliferación producida por lovastatina 0,5 mM en linfocitos de sangre periférica procedentes de la paciente con CESD. Las células mononucleadas de sangre periférica se aislaron de un control sano (■) y de una paciente con enfermedad de CESD (paciente #9) (●). Las células se incubaron en un medio libre de colesterol en presencia de lovastatina 0,5 mM y concentraciones crecientes de colesterol libre, se estimularon con fitohemaglutinina durante 72 h y se determinó la proliferación mediante la incorporación de [³H-metil]-timidina al ADN. Los resultados se expresan en porcentaje respecto a la condición control, en ausencia de lovastatina. Los datos corresponden a la media de cuadruplicados de un experimento representativo, donde el error estándar no superó el 6,5% en ningún caso.



medios de ambos parámetros si se comparan con el grupo control. Por último, existe otro grupo de pacientes que no presentan HF, esto es, pacientes en los que la causa de su hipercolesterolemia no re-

side en el receptor de LDL, y que se caracterizan por presentar una captación de DiI-LDL prácticamente igual a la de los controles y tasas de recuperación por LDL también elevadas (fig. 6).

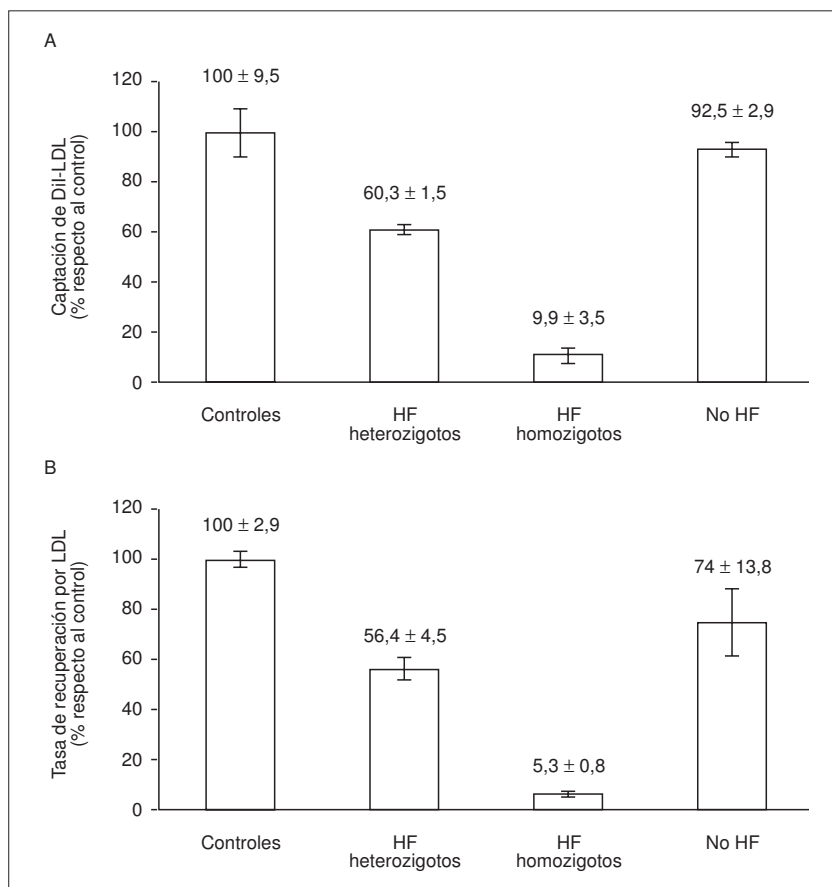
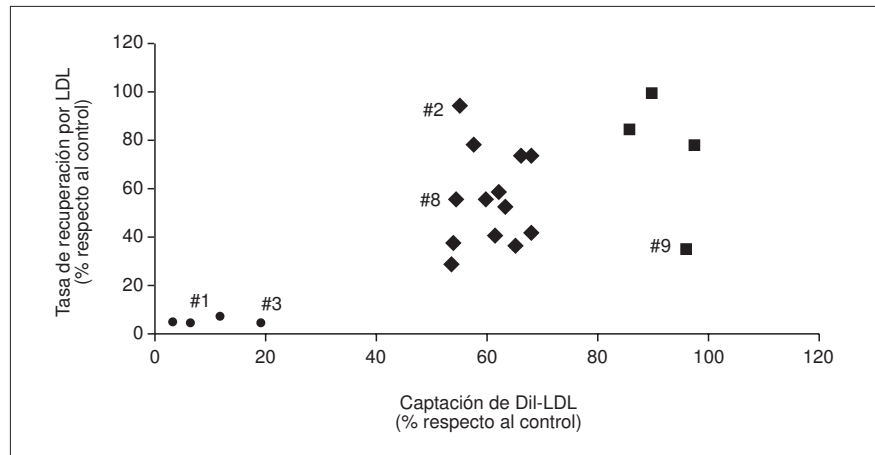


Figura 6. Captación de DiI-LDL (A) y tasa de recuperación por LDL (B) en los distintos grupos de pacientes. Para cada grupo de pacientes los resultados están expresados como porcentajes respecto al control sano y son las medias de los datos de captación de DiI-LDL (A) o de las tasas de recuperación por LDL (B) ± error estándar (EE). En los controles el EE es tomado de los valores absolutos. HF: pacientes con hipercolesterolemia familiar.

Figura 7. Correspondencia entre los datos de captación de DiI-LDL y los de tasa de recuperación por LDL. Los datos de captación de DiI-LDL corresponden a los valores de B_{max} obtenidos de las cinéticas de internalización para cada paciente y expresados en porcentaje con respecto al control analizado en paralelo. La tasa de recuperación por LDL es el valor de la pendiente, referido en porcentaje respecto al control, de los datos de incorporación de [3 H-metil]-timidina al ADN para las concentraciones de cLDL comprendidas entre 0 y 2 mg/ml, entre las cuales la respuesta de las células controles es lineal.



El estudio individualizado dentro de cada uno de estos grupos de pacientes permitió observar que en el caso de los pacientes con HF homocigota existía una gran correspondencia entre los dos parámetros considerados (fig. 7). Algo similar ocurría en la mayoría de los pacientes con HF heterocigota, si bien apareció un caso, como el comentado del paciente #2, en el cual existía una discrepancia entre ambas variables (con una captación intermedia y una tasa de recuperación elevada). De igual forma, dentro del grupo de los no HF, en la paciente #9 también se producía una falta de correspondencia entre la captación de DiI-LDL y la tasa de recuperación por LDL (elevada captación y discreta tasa de recuperación) (fig. 7).

Discusión

La medición de la actividad del rLDL es necesaria para el diagnóstico bioquímico de la HF, como paso previo a la caracterización del defecto a nivel molecular. En el presente trabajo hemos aplicado dos ensayos funcionales del rLDL para evaluar su calidad diagnóstica.

Uno de los métodos empleados está basado en la citometría de flujo y para el mismo se han utilizado LDL marcadas con el fluorocromo lipofílico DiI³⁹, las cuales son muy estables y además su marcaje no supone alteración alguna de la partícula. Esta alternativa permite realizar estudios tanto de internalización como de unión^{27,31}, lo cual es una ventaja sobre el método que emplea anticuerpos frente al rLDL, pues este último únicamente permite la detección de su presencia y no su actividad²⁷. Además, y a diferencia de los ensayos clásicos con LDL marcadas con isótopos radiactivos, que únicamente informan sobre la capacidad global de una preparación de células para unir o captar las LDL,

la citometría de flujo, en primer lugar, permite eliminar la fluorescencia inespecífica del medio y de los restos celulares y, en segundo lugar, aporta medidas de la actividad individual de cada célula de la preparación, ofreciendo una imagen real de la posible heterogeneidad celular³².

La alta sensibilidad de esta técnica y el prácticamente ilimitado rango de medida, da un amplio margen para diferenciar células con distinta actividad del rLDL. Así, la actividad determinada en los linfocitos de la paciente #3 fue prácticamente nula, tanto en el ensayo de unión como en el de internalización, lo que se corresponde con el defecto molecular que presenta: heterocigoto compuesto para las mutaciones D280G (exón 6) y G528V (exón 11), que afectan a la región de unión y a la región de homología con el precursor de EGF, respectivamente, dando lugar a un fenotipo de clase 2⁴⁰. Por su parte, los resultados obtenidos con los linfocitos de los pacientes #1 y #2 fueron muy elocuentes. Ambos pacientes presentan la mutación N804K (FH_{Colmenar}), el primero en condición homocigota y el segundo en condición heterocigota. Esa mutación se localiza en el exón 17 y afecta a la región citoplasmática, impidiendo que el receptor se aloje correctamente en la fosa recubierta de clatrina, por lo que aunque el receptor se exprese en la membrana y reconozca y una las LDL, no es capaz de internalizarlas¹⁷. Pues bien, en los linfocitos del paciente #1 la internalización de DiI-LDL fue prácticamente nula, y en el paciente #2 aproximadamente la mitad que la observada en los linfocitos del individuo control sano (fig. 1B). Por el contrario, la capacidad de unión, en ambos pacientes era prácticamente igual a la presentada por los linfocitos del control sano (fig. 1A). Estos resultados demuestran que, conforme a la predicción, en estos pacientes el

defecto del rLDL afecta exclusivamente la internalización y no el reconocimiento de las LDL. Como vemos, el abordaje conjunto del estudio de la unión a 4 °C y de la internalización a 37 °C permite determinar el tipo de defecto del rLDL, ejemplificado en los casos de la paciente #3, con un fenotipo de clase 2, y del paciente #1, con un fenotipo de clase 4.

Para un estudio de barrido de la actividad de rLDL, en una primera fase es suficiente con determinar la captación de DiI-LDL. Esta aproximación se aplicó a un conjunto de pacientes que presentaban hipercolesterolemia (tabla 1). Los resultados demostraron que la mayoría de ellos presentaba una disminuida captación de DiI-LDL, sugestiva de un defecto en el rLDL, lo que permitía confirmar el diagnóstico de HF (tabla 2). En cambio, en los pacientes #9, #10 y #11 la captación de DiI-LDL no estaba disminuida, lo que descartaba este diagnóstico. Por tanto, esta técnica es válida para el ensayo de la actividad del rLDL. Además, y aparte de las ya comentadas, esta técnica presenta una importante ventaja con respecto al ensayo habitual de actividad del rLDL con LDL marcadas con isótopos radiactivos, que es el análisis individual de las células, lo que permite centrarlo en las células viables; así que la presencia de células muertas en el cultivo, que puede ser muy variable, no afecta al resultado en este ensayo. No obstante, hay que reconocer que, al igual que en otros ensayos, los linfocitos deben aislarse rápidamente de la sangre, y que ésta no está estandarizada, por lo que es necesario analizar junto con los casos, células controles como referencia de la actividad del rLDL.

El segundo ensayo empleado se basa en la dependencia que tienen las células sobre el colesterol para poder proliferar. Esto permite plantear un ensayo funcional en el que se determina la capacidad de las LDL para recuperar la inhibición de la proliferación inducida por la lovastatina *in vitro*^{16,17}. En ausencia de colesterol en el medio, la lovastatina detiene la proliferación de los linfocitos estimulados con fitohemoaglutinina, mientras que la adición de cLDL al medio permite restablecer la proliferación siempre y cuando las células puedan disponer del colesterol de las LDL. Esto es así en las células procedentes de controles sanos; por el contrario, en los linfocitos de los pacientes con HF homocigota (#1 y #3), las LDL fueron incapaces de restaurar la proliferación (fig. 2). Este fenómeno pone de manifiesto el papel del rLDL facilitando la captación de colesterol por las células, y se ha utilizado para identificar defectos en la vía del rLDL que alteren su función¹⁶⁻¹⁸, así como modificaciones en las propias lipoproteínas que alteren su re-

conocimiento¹⁰. Como índice numérico de este efecto, que permitiría comparar los distintos casos, calculamos lo que denominamos “tasa de recuperación por LDL”, que es la pendiente de la recta de regresión de los datos de proliferación para el rango lineal de concentraciones de cLDL. Observamos que la tasa de recuperación por LDL estaba disminuida en los pacientes con HF, más del 90% en los homocigotos y alrededor del 50% en los heterocigotos (tabla 2), datos que coinciden con la actividad de rLDL determinada como la captación de DiI-LDL. El caso del paciente #2 es peculiar, ya que siendo portador heterocigoto de la mutación N804K y teniendo una actividad de rLDL del 55% (tabla 2), la recuperación de la proliferación por LDL era similar a la del control (fig. 2). La causa de estos resultados aparentemente contradictorios probablemente reside en el peculiar defecto del rLDL del que se trata, que afecta a la cola citoplasmática. Recientemente, se ha descubierto que esta región de la proteína puede participar en la generación de señales de tipo regulador^{19,41}, por lo que cabe la posibilidad de que la unión de las LDL al receptor desencadene una señal que repercuta positivamente en la proliferación celular. Dado que en este paciente la provisión de colesterol a las células no se encuentra impedida totalmente, ya que uno de sus alelos es normal, se puede hipotetizar que sus células responden eficientemente a las LDL del medio porque la señal reguladora se da en toda su extensión. Este comportamiento, sin embargo, no se observa en el paciente #1, que presenta el mismo tipo de defecto pero en condición homocigota, probablemente porque si bien la señal puede originarse al unirse las LDL al receptor, la incapacidad para internalizarlas determina una falta de disponibilidad de colesterol necesaria también para la proliferación celular.

Otro caso ilustrativo es el de la paciente #9, que presentaba una actividad de rLDL prácticamente igual a la del control (fig. 3) y, sin embargo, las LDL no fueron del todo eficientes a la hora de recuperar la inhibición de la proliferación celular (fig. 4). Esta paciente presentaba CESD⁴², que se caracteriza por una deficiencia en la actividad de la LAL⁴³, enzima que se encarga de hidrolizar los ésteres de colesterol y los triglicéridos de las lipoproteínas captadas por el rLDL, y cuya disfunción causa la acumulación intralisosomal de ésteres de colesterol, como era el caso de esta paciente. A diferencia de las LDL, el colesterol libre no asociado a lipoproteínas, que no entra en la célula por endocitosis mediada por receptor, fue capaz de restaurar la inhibición de la proliferación celular con similar eficiencia en los

linfocitos de esta paciente que en los de controles (fig. 5). Por tanto, la menor eficiencia de las LDL para recuperar la inhibición de la proliferación celular, en este caso, puede atribuirse a la dificultad para utilizar el colesterol procedente de las LDL y no a un defecto en el propio receptor.

Con el empleo de ambas técnicas analíticas, se pueden agrupar a los pacientes en tres categorías claramente diferenciadas (fig. 6). En la mayoría de los casos existe una correspondencia entre la captación de DiI-LDL y la tasa de recuperación por LDL, de manera que con la realización de uno solo de ellos hubiera sido suficiente. Ahora bien, existen casos (pacientes #2 y #9) donde esa correspondencia no se da (fig. 7). Concretamente, atendiendo sólo a la tasa de recuperación por LDL, el paciente #2 hubiera podido considerarse como normal, mientras que la paciente #9 hubiera podido considerarse como portadora de un defecto del rLDL. Esto pone de manifiesto que ambas técnicas son complementarias y necesarias para un correcto diagnóstico bioquímico de la HF.

Bibliografía

- Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low-density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from normal and from a patient with homozygous hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 1974;249:5153-62.
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
- Sprecher DL, Hoeg JM, Schaefer EJ. The association of LDL receptor activity, LDL cholesterol level, and clinical course in homozygous familial hypercholesterolemia. *Metabolism* 1985;34: 294-9.
- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 1995; p. 1981-2030.
- Teruel JL, Lasunción MA, Castañón MA, Herrera E, Ortuño J. Aféresis de lipoproteínas con columnas de sulfato de dextrano. *Clin Invest Arterios* 1991;3:5-10.
- Lasunción MA, Teruel JL, Álvarez JJ, Carrero P, Ortuño J, Gómez Coronado D. Changes in lipoprotein(a), LDL-cholesterol and apolipoprotein B in homozygous familial hypercholesterolaemic patients treated with dextran sulfate LDL-apheresis. *Eur J Clin Invest* 1993;23:819-26.
- Varret M, Rabes JP, Thiaert GM, Kotze MJ, Baron H, Cénarro A, et al. LDLR Database. 2nd ed. New additions to the database and software, and the results of the first molecular analysis. *Nucleic Acids Res* 1998;26:248-52.
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
- Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 1990;24:133-70.
- Cuthbert JA, Lipsky PE. Provision of cholesterol to lymphocytes by high density and low density lipoproteins. Requirement for low density lipoprotein receptors. *J Biol Chem* 1987;262:7808-18.
- Chen HW, Kandutsch AA, Waymouth C. Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature* 1974;251:419-21.
- Brown MS, Goldstein JL. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem* 1974;249: 7306-14.
- Suárez Y, Fernández C, Ledo B, Ferruelo AJ, Martín M, Vega MA, et al. Differential effects of ergosterol and cholesterol on Cdk1 activation and SRE-driven transcription: sterol specificity for cell cycle progression in human cells. *Eur J Biochem* 2002;269: 1761-71.
- Martínez-Botas J, Suárez Y, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Cholesterol starvation decreases p34cdc2 kinase activity and arrests the cell cycle at G2. *FASEB J* 1999;13:1359-70.
- Carrero P, Gómez-Coronado D, Martínez-Botas J, Lasunción MA. Efecto de las lipoproteínas en la duplicación celular de linfocitos. Papel del receptor LDL. *Clin Invest Arterios* 1994;6:113-23.
- Cuthbert JA, East CA, Bilheimer DW, Lipsky PE. Detection of familial hypercholesterolemia by assessing functional low-density-lipoprotein receptors on lymphocytes. *N Engl J Med* 1986;314:879-83.
- Martínez-Botas J, Suárez Y, Reshef A, Carrero P, Ortega H, Gómez-Coronado D, et al. Impact of different low-density lipoprotein (LDL) receptor mutations on the ability of LDL to support lymphocyte proliferation. *Metabolism* 1999;48:834-9.
- Koivisto PV, Koivisto UM, Kovanen PT, Gylling H, Miettinen TA, Kontula K. Deletion of exon 15 of the LDL receptor gene is associated with a mild form of familial hypercholesterolemia. *FH-Espoo. Arterioscler Thromb* 1993;13:1680-8.
- Howell BW, Herz J. The LDL receptor gene family: signalling functions during development. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11:74-81.
- Metzler B, Li C, Hu Y, Sturn G, Ghaffari-Tabrizi N, Xu Q. LDL stimulates mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression, independent of LDL receptors, in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1862-71.
- Williams RR, Hunt SC, Schumaker Hegele RH, Leppert MF, Ludwig EH. Diagnosis of heterozygous hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol* 1993;72:171-6.
- Bilheimer DW, Ho YK, Brown MS, Anderson RGW, Goldstein JL. Genetics of low density lipoprotein receptor diminished activity in lymphocytes from heterozygous with familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1978;61:678-96.
- Koivisto PV, Koivisto UM, Miettinen TA, Kontula K. Diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. DNA analysis complements clinical examination and analysis of serum lipids levels. *Arterioscler Thromb* 1992;12:584-95.
- May K, Kramer FB, Chen J, Cooper AD. ELISA measurement of LDL receptors. *J Lipid Res* 1990;31:1638-89.
- Stephan ZF, Yurachek EC. Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res* 1993;34:325-30.
- Benhamamouch S, Kuznierz JP, Agnani G, Marzin D, Lecerf JM, Clavey V. Determination of LDL receptor binding capacity of human lymphocytes by immunocytofluorimetric assay. *Biophys Acta* 1988;1002:45-53.
- Schmitz G, Bruning T, Kovacs E, Barlage S. Fluorescence flow cytometry of human leukocytes in the detection of LDL receptor defects in the differential diagnosis of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1053-65.
- Ho YK, Brown MS, Kaiden HJ, Goldstein JC. Binding, internalization and hydrolysis of low density lipoprotein in long-term lymphoid cell lines from a normal subject and a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Exp Med* 1976;144:444-55.
- Ranganathan S, Hattori H, Kashyap ML. A rapid flow cytometric assay for low-density lipoprotein receptors in human peripheral blood mononuclear cells. *J Lab Clin Med* 1995;125:479-86.
- Reynolds GD, St. Clair RW. A comparative microscopic and biochemical study of the uptake of fluorescent and ¹²⁵I-labeled lipoproteins by skin fibroblasts, smooth muscle cells, and peritoneal macrophages in culture. *Am J Pathol* 1985;121:200-11.
- Suárez Y, Martínez-Botas J, Ortega H, Ferruelo AJ, Gómez-Coronado D, Teruel JL, et al. Determinación de la actividad del receptor de LDL en linfocitos mediante citometría de flujo para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar. *Clin Invest Arterios* 1997;9:47-54.
- Yen CF, Kalunta CI, Chen FS, Kaptein JS, Lin CK, Lad PM. Flow cytometric evaluation of LDL receptors using DiI-LDL uptake and its application to B and T lymphocytic cell lines. *J Immunol Methods* 1994;177:55-67.

33. Lohne K, Urdal P, Leren TP, Tonstad S, Ose L. Standardization of a flow cytometric method for measurement of low-density lipoprotein receptor activity on blood mononuclear cells. *Cytometry* 1995;20:290-5.
34. Teruel JL, Lasuncion MA, Navarro JF, Carrero P, Ortuno J. Pregnancy in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing low-density lipoprotein apheresis by dextran sulfate adsorption. *Metabolism* 1995;44:929-33.
35. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:77-89.
36. Gutiérrez C, Bernabé RR, Vega J, Kreiler M. Purification of human T and B cells by discontinuous density gradient of percoll. *J Immunol Methods* 1979;29:57.
37. Chung BH, Segrest JP, Ray MJ, Brunzell JD, Hokanson JE, Krauss RM, et al. Plasma lipoproteins, part A, Preparation, Structure, and Molecular Biology. En: Segrest JP, Alber JJ, editors. Orlando, Florida: Academic Press, 1986;181-209.
38. Via DP, Smith LC. Fluorescent labeling of lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986;129:848-57.
39. Pitas RE, Innenarity TL, Weinstein JN. Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblast from macrophages in vitro by fluorescence microscopy. *Arteriosclerosis* 1981;1:177-85.
40. Chaves J, Real JT, Puig O, Ascaso JF, Teruel JL, Lasuncion MA, et al. Hipercolesterolemia familiar: identificación y caracterización molecular del primer homocigoto compuesto español. *Med Clin (Barc)* 1998;110:300-2.
41. Nimf J, Schneider WJ. From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:287-98.
42. Schmitz G, Assmann G. Acid lipase deficiency: Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. En: Scriver, CR, Beaudet, AL, Sly WS, Valle D, editors. *Metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, Inc., 1995; p. 1623-44.
43. Lohse P, Lohse L, Chahrokh-Zadeh S, Seidel D. Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase and human gastric lipase: site-directed mutagenesis of Cys227 and Cys236 results in substrate-dependent reduction of enzymatic activity. *J Lipid Res* 1997; 38:1896-905.