

LDL electronegativa: una LDL modificada presente en la circulación con características aterogénicas

S. Benítez, J.L. Sánchez-Quesada y J. Ordóñez-Llanos

Servicio de Bioquímica. Institut de Recerca. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

Existencia de LDL modificada en circulación plasmática

Diversos estudios llevados a cabo durante las 3 últimas décadas establecen que la lipoproteína de baja densidad (LDL) desempeña un papel central en el origen y evolución de la arteriosclerosis. Además de su concentración plasmática, diferencias en sus características cualitativas pueden comportar un mayor riesgo aterogénico, como es el caso de la LDL pequeña y densa¹. En este aspecto, existe una estrecha relación entre modificaciones de la LDL que aumentan su carga negativa y aterogenicidad de la partícula. Las LDL modificadas pierden afinidad por el receptor de LDL (rLDL), pero son reconocidas por los receptores *scavenger*, hecho que da lugar a la formación de células espumosas, características de la lesión aterosclerótica.

Una de las modificaciones de la LDL más estudiadas y con mayor relevancia en la aterogénesis ha sido la oxidación. Está bien establecido que la LDL oxidada interviene a diferentes niveles en el proceso ateromatoso, ya que es inflamatoria, pro-trombótica, citotóxica e inhibe la acción del óxido nítrico². Es ampliamente aceptado que la LDL se oxida en la pared arterial^{2,3}, pero existe más controversia respecto a si dicha partícula se encuentra presente en la circulación. Esta idea se descartó durante bastantes años^{4,5}, aunque algunas pruebas sugerían que podría existir LDL oxidada en el plasma⁶⁻⁸. Sin embargo, numerosos trabajos realizados en los últimos años han confirmado la existencia en la circulación de LDL oxidada, sugiriendo además que su concentración podría ser utilizada

como marcador de riesgo coronario⁹⁻¹¹ y de inestabilidad de la placa aterosclerótica¹². Otra prueba indirecta que apoya la presencia de LDL oxidada en la circulación es la presencia de autoanticuerpos. No obstante, el papel de estos autoanticuerpos ha generado una considerable controversia, ya que en algunos casos se ha descrito una correlación entre éstos y la progresión de la aterosclerosis¹³, mientras que otros autores le atribuyen un papel antiaterogénico, con la función de eliminar la LDL oxidada circulatoria^{14,15}. En cualquier caso, a pesar de los indicios que sugieren que la LDL oxidada existe en la circulación, los estudios suelen apuntar que se halla presente en baja concentración, con proporciones inferiores al 0,1% de la LDL total^{12,16}.

Además de la LDL oxidada, se ha descrito otra forma de LDL modificada plasmática denominada LDL electronegativa LDL(-), que algunos autores han relacionado con la oxidación. Dicha partícula se aisló por vez primera en 1988 mediante cromatografía de intercambio aniónico a partir de LDL total¹⁷. Esta LDL(-) representa una pequeña fracción del total de LDL (entre el 1 y el 10% en individuos normolipémicos), y en su estudio, llevado a cabo por varios autores, siempre han existido considerables discrepancias, especialmente sobre si es una forma oxidada o si su origen se debe a otro tipo de modificación.

LDL(-): ¿es una forma oxidada plasmática?

Entre quienes defienden la postura de que la LDL(-) presenta propiedades características de una forma oxidada se encuentran los grupos de Avogaro et al y Sevanian et al. Estos autores han observado en la LDL(-) disminución en las concentraciones de antioxidantes, valor aumentado de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)¹⁸⁻²⁰, alto contenido en colesterol oxidado^{21,22}, agregados de la apolipoproteína (apo) B^{17,18}, mayor susceptibilidad

Correspondencia: Dra. Sònia Benítez González.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Servicio de Bioquímica.
Avda. Sant Antoni M. Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: sbenitez@hsp.santpau.es

a la oxidación y contenido elevado en lipoperoxidos^{20,23}. También se ha descrito similitud en la estructura de la apo B entre la LDL(-) y la LDL oxidada²⁴.

En contraposición al origen oxidativo de la LDL(-) se encuentran los trabajos de otros autores que no hallan evidencias de oxidación en la LDL(-). Entre éstos se encuentran los del grupo de Moatti et al, que adaptó la cromatografía de intercambio aniónico a un sistema *fast protein liquid chromatography* (FPLC)²⁵⁻²⁷, y los de nuestro propio grupo. En resumen, éstos indican que la LDL(-) no presenta un nivel de oxidación superior al de la LDL no modificada (LDL[+]) o, al menos, no cuantificable por los métodos comúnmente utilizados: dienos conjugados, hidróxidos, aldehídos, TBARS y antioxidantes. Concretamente, en nuestros estudios no sólo no se hallan evidencias de que la LDL(-) presente oxidación por los métodos antes mencionados, sino que además se encuentra que dicha partícula es más resistente a la oxidación *in vitro*²⁸. En estos estudios se atribuye la mayor carga negativa de la partícula a otros factores, como el mayor contenido en ácido siálico²⁷ en apo E y apo CIII^{26,27,30} y en ácidos grasos no esterificados (NEFA)^{28,30}.

Los resultados aparentemente contradictorios entre los diferentes estudios, respecto a la cuestión de si la LDL(-) está o no oxidada, podrían ser debidos a diferencias metodológicas en el aislamiento de la partícula. El tipo de gradiente salino y la fuerza iónica utilizada para la elución en el proceso cromatográfico influirían en el porcentaje de la LDL(-), de manera que comportaría que en los diferentes trabajos no se separase exactamente la misma fracción y, por tanto, ésta presentase propiedades distintas. También es importante considerar que, al ser la LDL(-) una partícula heterogénea entre individuos, en función de la población elegida presentará diferentes características. Otro dato de gran relevancia es que en el caso de los grupos que defienden que la LDL(-) está oxidada utilizan una concentración de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en el tampón cromatográfico de tan sólo 10 mM, frente a 1 mM utilizado por los otros autores, lo cual podría implicar una insuficiente protección a la oxidación de la LDL, de manera que la LDL(-) podría generarse en los procesos de aislamiento y posterior manipulación. Un factor más a tener en cuenta es la contribución relativa de la LDL oxidada a la fracción de LDL(-). Es decir, dado que la LDL oxidada tiene mayor carga negativa, se aislaría incluida en la LDL(-), siendo responsable de una pequeña proporción de ella. Este fe-

Tabla 1. Situaciones fisiopatológicas con LDL(-) incrementada

Situaciones	Referencias
Ejercicio físico agudo	31, 34, 35
Hipercolesterolemia familiar	28, 29, 37
Diabetes mellitus	38, 39, 40, 41
Hipertrigliceridemia	42
Enfermedad renal (hemodiálisis)	43, 44

nómeno explicaría los resultados de Greilberger et al, que describen un mayor valor de LDL oxidada en la LDL(-) mediante técnicas de enzoinmunoanálisis (ELISA)³¹.

A pesar de las divergencias en los resultados sobre las características oxidativas de la LDL(-), sí existe acuerdo en otros aspectos propios de esta partícula, como son su aumento en determinadas situaciones fisiopatológicas y sus propiedades aterogénicas.

Situaciones fisiopatológicas con incremento de la LDL(-)

Está establecido que la proporción de LDL(-) se halla elevada en determinadas situaciones que se presentan en la tabla 1, aunque, desafortunadamente, en ninguno de los casos se define bien la causa de su aumento. Por otra parte, el hecho de que algunas de estas situaciones sean patológicas con riesgo cardiovascular se podría relacionar con la asociación observada en algunos trabajos entre porcentaje de LDL(-) y factores de riesgo cardiovascular tradicionales como el colesterol total y el colesterol unido a LDL^{27,29,32}.

Un caso no patológico en que la LDL(-) aumenta es el del ejercicio físico agudo, situación estudiada en profundidad por nuestro grupo. Inicialmente se lanzó la hipótesis de que el origen de la LDL(-) en esta situación podría ser oxidativo, ya que se halló que tras un ejercicio aeróbico intenso se producía una mayor susceptibilidad a la oxidación de la LDL y un aumento paralelo en la LDL(-)³³ y, además, que administrando oralmente ácido ascórbico se inhibían ambos efectos³⁴. En contraposición, al evaluar el ejercicio a largo plazo se observó una resistencia a la oxidación incrementada y un porcentaje de LDL(-) normal³⁵. Un estudio más exhaustivo concluyó que el aumento de LDL(-) después del ejercicio agudo no se debe al estrés oxidativo, sino a un aumento en su contenido en NEFA³⁶.

Además del ejercicio, existen casos patológicos en que se ha descrito una asociación con mayor porcentaje de LDL(-), concretamente en la hipercolesterolemia familiar (HF)^{28,29,37}, la diabetes me-

Tabla 2. Características aterogénicas de la LDL(-)

Características	Referencias
Citotóxica para células endoteliales	21, 22, 27
Densidad alterada	20, 26, 27, 42, 49
Mayor susceptibilidad a la agregación	17, 28
Menor afinidad por el receptor de LDL	17, 58
Inducción de quimiocinas en células endoteliales	28, 30

litus (DM)³⁸⁻⁴¹, la hipertrigliceridemia⁴² o la enfermedad renal^{43,44}.

En la HF, al existir un aclaramiento disminuido de la LDL, aumenta su tiempo de residencia en la circulación, por lo que sería más susceptible a modificarse y ello podría comportar la formación de LDL(-). Aunque algunos autores describen que la LDL de la HF es más susceptible a la oxidación^{45,46} y presenta algunas características propias de la forma oxidada⁴⁶, otros grupos encuentran resultados contrarios⁴⁷. Datos de nuestro grupo también descartan un posible origen oxidativo de la LDL(-) en individuos con HF^{28,37}.

En la DM se hipotetizó que el origen de la LDL(-) podría ser la glucación de la LDL, ya que se ha descrito que la LDL glucada posee mayor carga negativa⁴⁸. De hecho, se ha propuesto un papel de la glucación en el origen de la LDL(-) en los DM tipo 1 (insulinodependientes)⁴⁰, mientras que en su generación en los DM tipo 2 (no insulinodependientes) parecen estar implicados otros mecanismos diferentes de la glucación⁴¹.

Tampoco está clara la causa del aumento de LDL(-) en pacientes con patología renal sometidos a hemodiálisis, aunque parece que estas partículas se generan en el proceso de la hemodiálisis^{43,44}.

El hecho de que, excepto en el caso del ejercicio físico, sean situaciones de mayor riesgo ateroscлерótico en las que se incrementa la LDL(-), sugiere que dicha partícula podría estar implicada en el desarrollo de la arteriosclerosis. Realmente, a pesar de las discrepancias respecto al grado de oxidación de la LDL y otros aspectos, sí existe coincidencia en diversas pruebas que apuntan que la LDL(-) presenta propiedades aterogénicas, las cuales se enumeran en la tabla 2.

Características aterogénicas de la LDL(-)

A pesar de las discrepancias descritas entre los diferentes grupos que estudian la LDL(-), uno de los aspectos en que existe coincidencia es en el hecho de que es citotóxica para células endoteliales en cultivo, y en algunos trabajos este efecto se atribuye a un mayor contenido en colesterol oxidado

de la partícula^{21,22}, aunque en otros estudios no se hallaron evidencias de oxidación²⁷.

También existe acuerdo entre los autores en que la LDL(-) presenta una densidad anormal, más densa en el caso de los individuos normolipémicos^{20,26,27,42,49}, hecho que se ha relacionado con mayor riesgo aterogénico¹. En sujetos hipercolesterolémicos, la LDL(-) tampoco presenta la densidad considerada "normal" o intermedia, pero en este caso no es una forma de LDL densa sino más ligera y de mayor tamaño⁴², hecho que también se ha relacionado con mayor riesgo aterogénico⁵⁰.

Otra evidencia del posible rol aterogénico de la LDL(-) es su mayor susceptibilidad a la agregación²⁸, ya que se ha descrito que la LDL agregada puede dar lugar a la formación de células espumosas⁵¹. Además, la teoría de la retención de las lipoproteínas confiere un papel central a la agregación de la LDL, ya que la LDL retenida en la íntima arterial se agrega y adquiere propiedades aterogénicas^{52,53}.

Por otra parte, varios estudios muestran que subfracciones de LDL de diferente composición, carga, densidad y tamaño presentan una unión al rLDL alterada⁵⁴⁻⁵⁷. Es lógico, pues, pensar que una partícula como la LDL(-) con estos parámetros alterados pueda presentar cambios conformacionales que afecten a su interacción con el receptor. En efecto, un estudio describe que la LDL(-) presenta alteraciones en la conformación de la apo B²⁴, concretamente una pérdida de la estructura secundaria, desplegamiento y hundimiento en zonas hidrofóbicas. Además, algunos trabajos parecen confirmar la menor afinidad de la LDL(-) hacia el rLDL^{17,58}. Este hecho podría comportar un menor aclaramiento plasmático de la partícula y, por consiguiente, mayor tiempo de residencia plasmática y posibles modificaciones de esta LDL, que aumentarían su potencial aterogénico. Sin embargo, en este aspecto también existen discrepancias, ya que algunos autores describen que la LDL(-) presenta mayor^{26,27} o igual⁴⁹ afinidad por el rLDL.

Finalmente, y tal vez sea esto lo más relevante, la principal propiedad aterogénica de la LDL(-) es su capacidad de inducir la liberación de quimiocinas en células endoteliales, concretamente la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y la interleucina 8 (IL-8), las cuales favorecen la quimiotaxis y activación de monocitos y linfocitos T, respectivamente, hacia las zonas de lesión. Este efecto inflamatorio se produce en ausencia de citotoxicidad, es decir, que induciría una disfunción endotelial sin denudación del endotelio, fenómeno que es suficiente para originar una lesión ateroscle-

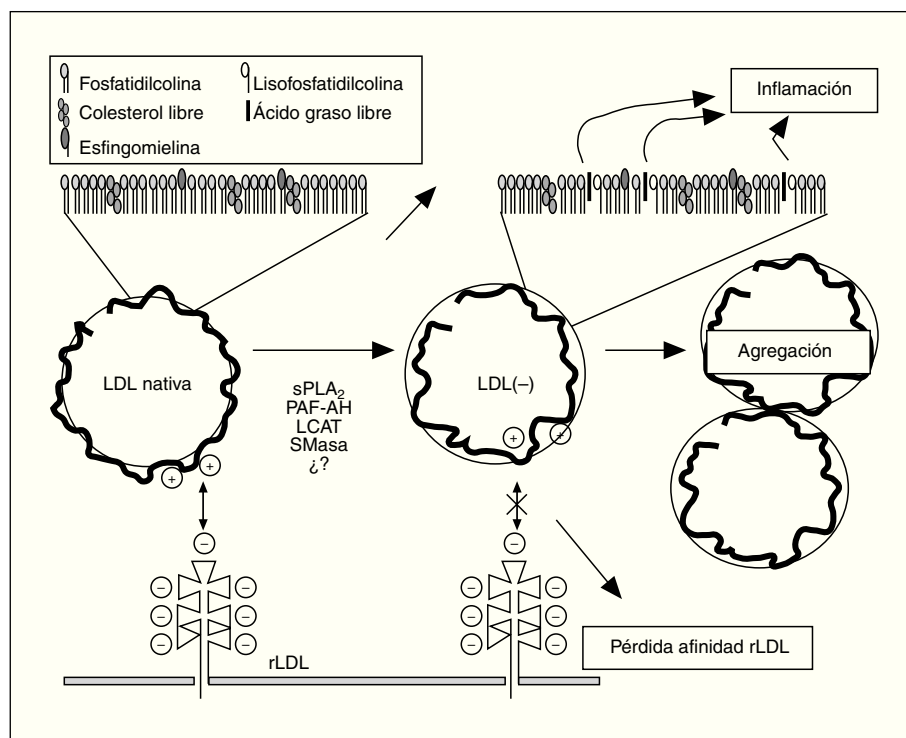


Figura 1. Esquema hipotético de la generación de LDL(-). La LDL nativa, al ser modificada por enzimas como la sPLA₂, SMasa, lecitín colesterol acetiltransferasa (LCAT) o PAF-AH, vería alterada la composición de la capa superficial polar, ya que la hidrólisis de los fosfolípidos daría lugar al aumento de productos proinflamatorios, como la lisofosfatidilcolina o los ácidos grasos libres, que podrían ser responsables de la inducción de la liberación de quimiocinas por las células endoteliales. Por otra parte, la hidrólisis de los fosfolípidos induce una pérdida neta de material de superficie que favorecería la formación de agregados lipoproteicos. A su vez, también se verían favorecidos cambios estructurales en la apo B que pueden inducir el ocultamiento de los dominios ricos en lisina responsables del reconocimiento entre la LDL y su receptor, con la consecuente pérdida de afinidad entre ambos.

rótica según la teoría de respuesta a la lesión³. La liberación de quimiocinas se produce independientemente de si la partícula proviene de individuos normolipémicos o de hipercolesterolémicos^{28,30}.

Posibles mecanismos aterogénicos e inflamatorios de la LDL(-)

Todas las observaciones mencionadas sugieren que la LDL(-) podría constituir un importante factor aterogénico. Sin embargo, no se conoce qué componentes de la partícula serían los responsables de sus propiedades inflamatorias. Algunos trabajos sugieren que las moléculas candidatas más posibles serían la lisofosfatidilcolina (LPC) y los NEFA, cuyo contenido se encuentra aumentado en la LDL(-)^{23,28,30}. Estos productos son conocidos mediadores de la inflamación⁵⁹ y, por lo tanto, podrían ser responsables de su efecto inductor de quimiocinas en células endoteliales. Existen varios mecanismos enzimáticos que al actuar sobre la LDL originan un aumento en su carga negativa y en el contenido de LPC y NEFA. Estas enzimas posibles candidatas a generar LDL(-) serían principalmente fosfolipasa A₂ (PLA₂), esfingomielinasa (SMasa), colesterol esterasa (CEasa) o PAF acetilhidrolasa (PAF-AH), tal como se indica en el modelo hipotético de la figura 1. Además, estas modificaciones en-

zimáticas afectan a la conformación de la LDL⁶⁰ y pueden ser responsables de su menor afinidad por el rLDL y mayor agregabilidad descrita por algunos autores. En concordancia con este tema, recientes resultados de nuestro grupo indicaron que existen considerables coincidencias entre la LDL modificada por la PLA₂ *in vitro* (PLA₂-LDL) y la LDL(-), tanto en sus características fisicoquímicas como biológicas. Concretamente, la PLA₂-LDL presentó una mayor carga negativa, menor tamaño, un mayor contenido en NEFA y LPC, menor susceptibilidad a la oxidación y mayor a la agregación, afinidad disminuida por el rLDL e inducción de la liberación de IL-8 y MCP-1⁶¹. Por otra parte, en otro estudio de nuestro grupo⁶² se describe un aumento de más de 5 veces de la actividad PAF-AH en la LDL(-). El papel proaterogénico o antiaterogénico de la PAF-AH ha sido muy controvertido, ya que, a pesar de la idea generalizada de su efecto protector al inactivar PAF y fosfolípidos oxidados, también existen estudios que muestran una correlación positiva entre dicha enzima y factores de riesgo cardiovascular^{63,64}. Asimismo, hay que considerar que los productos de la acción de la PAF-AH son LPC y NEFA oxidados⁵⁹, los cuales presentan características inflamatorias. Tanto la LPC como los NEFA oxidados son quimiotácticos para monocitos^{59,65}. Ade-

más la LPC presenta otros efectos, como inducción de apoptosis en células musculares⁶⁶ o aumento de la expresión de MCP-1 en células endoteliales⁶⁷. El hecho de que la LDL(-) esté enriquecida en PAF-AH podría implicar que, como consecuencia de ello, la producción aumentada de LPC y/o NEFA sean responsables de la liberación de quimiocinas por parte de las células endoteliales.

Además, enzimas como la PLA₂ y la PAF-AH se hallan aumentadas en situaciones de inflamación, lo que coincide con el hecho de que en todas las situaciones en que aumenta la LDL(-) exista una inflamación subyacente. Por lo tanto, sería de gran relevancia el estudio de estas posibles enzimas u otros mecanismos implicados en la generación de la LDL(-) y en los componentes responsables de su efecto aterogénico, donde los candidatos principales serían la LPC y los NEFA, como se ha comentado. De esta manera, un conocimiento más exhaustivo del origen y las propiedades de la LDL(-) nos permitiría diseñar estrategias terapéuticas para evitar la formación de LDL(-). Por ejemplo, si la mayor actividad PAF-AH fuera la responsable del efecto inflamatorio, se podría utilizar inhibidores de esta enzima. Por otra parte, ya se ha descrito que el tratamiento con simvastatina o con insulina reduce la proporción de LDL(-) en determinadas situaciones^{37,41}, aunque no se conocen los mecanismos exactos responsables de este descenso. Por ello, un mejor conocimiento de los procesos de generación de LDL(-) podría llevar a optimizar el efecto del tratamiento con estos fármacos u otras estatinas o análogos de insulina de acción similar, que reduzcan las concentraciones de esta partícula. A su vez, además de su acción inductora de quimiocinas, sería de gran interés profundizar en otros efectos inflamatorios de la LDL(-) para poder valorar objetivamente su implicación en el proceso de la arteriosclerosis, y de esta manera evaluar el papel de dicha partícula como factor de riesgo. Por consiguiente, la LDL(-), esta LDL circulante modificada con propiedades aterogénicas, es un interesante tema de estudio del cual aún quedan muchos interrogantes por resolver.

Bibliografía

- Krauss RM. Relationship of intermediate and low-density lipoprotein subtypes to risk of coronary artery disease. *Am Heart J* 1987;113:578-82.
- Steinberg D. LDL oxidation and its pathological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963-6.
- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- Van Berkel TJC, De Rijke YB, Kruijt JK. Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. *J Biol Chem* 1991;266:2282-9.
- De Rijke YB, Voegelzang CJM, Van Berkel TJC, Princen HMG, Verwey HF, Van der Laarse A, et al. Susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in coronary bypass patients. *Lancet* 1992;340:858-9.
- Yagi K. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids* 1987;45:337-51.
- Maggi E, Chiesa R, Melissano G, Castellano R, Astore D, Grossi A, et al. LDL oxidation in patients with severe atherosclerosis. A study of in-vitro and in-vivo markers. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1892-9.
- Holvoet P, Pérez G, Zhao Z, Brouwers E, Bernar H, Collen D. Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. *J Clin Invest* 1995;95:2611-9.
- Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, et al. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2243-7.
- Holvoet P, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low density lipoprotein is a prognostic marker of transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:698-702.
- Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeg R, et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:844-8.
- Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1649-54.
- Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, et al. Autoantibodies against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992;339:883-7.
- Fukumoto M, Shoji T, Emoto M, Kawagishi T, Okuno Y, Nishizawa Y. Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:703-7.
- Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M, Shimamura K, Kimura J, Kanda H, et al. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis* 2000;148:171-7.
- Witztum JL, Horkko S. The role of oxidized LDL in atherogenesis: immunological response and anti-phospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 1997;811:88-96.
- Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis* 1988;8:79-87.
- 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.
- Avogaro P, Cazzolato G, Bittolo-Bon G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. *Atherosclerosis* 1991;91:163-71.
- Sevanian A, Hwang J, Hodis H, Cazzolato 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.
- 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, Hodis HN, Hwang J, McLeod LL, Peterson H. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *J Lipid Res* 1995;36:1971-86.
- 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.
- Parasassi T, Bittolo-Bon G, Brunelli R, Cazzolato G, Krasnowska EK, Mei G, et al. Loss of apo B-100 secondary structure and conformation in hydroxide rich, electronegative LDL(-). *Free Rad Biol Med* 2001;31:82-9.
- 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.
- 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.
27. Demuth K, Myara I, Chappey B, Védie 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.
 28. Sánchez-Quesada JL, Camacho M, Antón R, Benítez S, Vila L, Ordóñez-Llanos J. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2003;166:261-70.
 29. Védie B, Jeunemaitre X, Mégnien JL, Myara I, Trébeden H, Simon A, et al. Charge heterogeneity of LDL in asymptomatic hypercholesterolemic men is related to lipid parameters and variations in the apoB and CIII genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1780-9.
 30. De Castellarnau C, Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Rosa R, Caveda L, 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.
 31. Greilberger J, Wang X, Ledinski G, Chen Q, Jürgens G. Presence of aldehydic epitopes on a minor low-density lipoprotein fraction. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1489-94.
 32. Nyssönen 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.
 33. Sánchez-Quesada JL, Homs-Serradesanferm R, Serrat-Serrat J, Serra-Grima JR, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos J. Increase of LDL to susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration aerobic exercise. *Atherosclerosis* 1995;118:297-305.
 34. Sánchez-Quesada JL, Jorba O, Payés A, Otal C, Serra-Grima JR, González-Sastre F, et al. Ascorbic acid inhibits the increase in low-density lipoprotein (LDL) susceptibility to oxidation and the proportion of electronegative LDL induced by intense aerobic exercise. *Coronary Artery Dis* 1998;9:249-55.
 35. 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.
 36. 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.
 37. 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.
 38. Moro E, Zambón C, Pianetti S, Cazzolato G, Pais M, Bittolo Bon G. Electronegative low density lipoprotein subform (LDL-) is increased in type 2 (non-insulin dependent) microalbuminuric diabetic patients and is closely associated with LDL susceptibility to oxidation. *Acta Diabetol* 1998;35:161-4.
 39. Moro E, Alessandrini P, Zambon C, Pianetti S, Pais M, Cazzolato 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.
 40. Sánchez-Quesada JL, Pérez A, Caixàs A, Ordóñez-Llanos J, Carerras G, Payés A, 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.
 41. Sánchez-Quesada JL, Pérez A, Caixàs A, Rigla M, Payés A, Benítez S, et al. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: nonenzymatic glycosylation and oxidative modifications. *J Clin Endocrin Metab* 2001;86:3243-9.
 42. Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Franco M, Otal C, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res* 2002;43:699-705.
 43. Ziouzenkova O, Asatryan L, Akmal M, Tetta C, Wratten ML, Lose-to-Wich G, et al. Oxidative cross-linking of apoB100 and hemoglobin results in low density lipoprotein modifications in blood. *J Biol Chem* 1999;274:18916-24.
 44. Ziouzenkova O, Sevanian A. Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) in HD patients: role in electronegative formation. *Blood Purif* 2000;18:169-76.
 45. Lavy A, Brook GJ, Dankner G, Amotz AM, Aviram M. Enhanced in-vitro oxidation of plasma lipoprotein derived from hypercholesterolemic patients. *Metabolism* 1991;40:794-9.
 46. Napoli C, Postiglione A, Triggiani M, Corso G, Palumbo G, Carbone V, et al. Oxidative structural modifications of low density lipoprotein in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1995;118:259-73.
 47. Raal FJ, Areias AJ, Waisberg R, Von Arb M. Susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1995;115:9-15.
 48. Gugliucci-Creriche A, Stahl AJC. Glycation and oxidation of human low density lipoproteins reduces heparin binding and modifies charge. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;53:125-32.
 49. 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.
 50. Campos H, Roederer GO, Lussier-Cacan S, Davignon J, Krauss RM. Predominance of large LDL and reduced HDL2 cholesterol in normolipemic men with cardiovascular artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1043-8.
 51. Aviram M. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1993;98:1-9.
 52. Wiams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:551-61.
 53. Wiams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol* 1998;9:471-4.
 54. Nigon F, Lesnik P, Pouis M, Chapman J. Discrete subspecies of human low density lipoprotein are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J Lipid Res* 1991;32:1741-53.
 55. Campos H, Arnold KS, Balestra ME, Innerarity TL, Krauss RM. Differences in receptor binding of LDL subfractions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:794-801.
 56. McNamara JR, Small DM, Li Z, Schaefer EJ. Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1996;37:1924-35.
 57. Lund-Katz S, Laplaud PM, Philips MC, Chapman MJ. Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies implication for LDL receptor interaction. *Biochemistry* 1998;37:12867-74.
 58. Benítez S, Sánchez-Quesada JL, Camacho M, Vila L, Ordóñez-Llanos J. Caracterización de la subfracción electronegativa de la LDL en individuos con hipercolesterolemia familiar. *Clin Invest Arterioscl* 2002;14:57-66.
 59. Macphee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 1999;338:479-87.
 60. Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488:189-210.
 61. Benítez S, Camacho M, Arcelus R, Jorba O, Vila L, Sánchez-Quesada JL, et al. LDL modificada con fosfolipasa A₂. Relación con la LDL electronegativa. *Clin Invest Arterioscler* 2004;16:133-40.
 62. Benítez S, Sánchez-Quesada JL, Ribas V, Jorba O, Blanco-Vaca F, González-Sastre F, et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) is mainly associated with electronegative LDL subfraction. *Circulation* 2003;108:92-6.
 63. Packard CJ, O'Reilly CSJ, Caslake MJ, McMahon AD, Ford HI, Cooney J, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 as an independent predictor of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2000;343:1148-55.
 64. Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, Holmes SD, Chamberlain P, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2000;150:413-9.
 65. Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role on atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:20805-9.
 66. Carpenter KLH, Dennis IF, Challis IR, Osborn DP, Macphee CH, Leake DS, et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 diminishes the death-inducing effects of oxidised LDL on human monocyte-macrophages. *FEBS letters* 2001;505:357-63.
 67. Takahara N, Kashiwagi A, Maegawa H, Shigeta Y. Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells. *Metabolism* 1996;45:559-64.