

LDL modificada con fosfolipasa A₂. Relación con la LDL electronegativa

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

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

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

Introducción. La LDL electronegativa (LDL[-]) es una fracción minoritaria de LDL plasmática con características aterogénicas, como menor afinidad por el receptor de LDL e inducción de liberación de quimiocinas en células endoteliales. Por otra parte, la LDL(-) presenta un aumento en el contenido en ácidos grasos no esterificados (NEFA) y lisofosfatidilcolina (LPC), que son productos de la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) sobre la LDL. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la implicación de la PLA₂ en la generación de LDL(-).

Métodos. Se modificó *in vitro* LDL con PLA₂ (PLA₂-LDL) a diferentes concentraciones (0, 0,5, 1, 5, 10 y 20 µg/l) durante 2 h a 37 °C en presencia de albúmina.

Resultados. Se encontraron similitudes entre LDL(-) y PLA₂-LDL en sus propiedades. El tratamiento de la LDL con PLA₂ indujo un incremento progresivo en la carga eléctrica negativa, un menor tamaño, una menor susceptibilidad a la oxidación y mayor a la agregación, y un contenido aumentado en NEFA y LPC. En su interacción con el receptor de LDL en fibroblastos, la PLA₂-LDL presentó una afinidad disminuida. Por otra parte, también indujo la liberación de MCP-1 e IL-8 en células endoteliales. Todos los efectos de la PLA₂-LDL fueron dependientes de la dosis y similares a los de la LDL(-) cuando la PLA₂-LDL presentó un contenido en NEFA y LPC semejante al de la LDL(-) (la LDL tratada con 1-5 µg/l de PLA₂).

Conclusión. La modificación de la LDL por acción de la PLA₂ podría implicar la generación de LDL(-), ya que existen coincidencias tanto fisicoquímicas como biológicas entre la LDL(-) y la PLA₂-LDL.

Palabras clave:

LDL modificada. LDL electronegativa. PLA₂.

LDL MODIFIED WITH PHOSPHOLIPASE A₂. RELATIONSHIP WITH ELECTRONEGATIVE LDL

Introduction. Electronegative LDL (LDL[-]) is a minor plasma LDL fraction with atherogenic characteristics such as lower LDL receptor affinity and induction of chemokine release in endothelial cells. On the other hand, LDL(-) shows an increase in the content of non-esterified fatty acids (NEFA) and lysophosphatidylcholine (LPC), products of the action of phospholipase A₂ (PLA₂) on LDL. For this reason, the aim of this work was to study the relationship of PLA₂ in LDL(-) generation.

Methods. LDL was modified *in vitro* with PLA₂ (PLA₂-LDL) at different concentrations (0, 0.5, 1, 5, 10 y 20 µg/l) for 2 h at 37 °C in the presence of albumin.

Results. Similarities were found between LDL(-) and PLA₂-LDL properties. Treatment with PLA₂ induced a progressive increase in the negative charge of LDL, decreased size, diminished susceptibility to oxidation and greater to aggregation, and higher content in NEFA and LPC. PLA₂-LDL presented decreased affinity in its interaction with the LDL receptor in fibroblasts. Furthermore, it also induced MCP-1 and IL-8 release by endothelial cells. All the PLA₂-LDL effects were dose-dependent and similar to those of LDL(-) when PLA₂-LDL (LDL treated with 1-5 µg/l of PLA₂) presented a NEFA and LPC content similar to that of LDL(-).

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por las ayudas SAF2001/0480 del MCYT y Red Temática de Investigaciones Cardiovasculares 2003 del FIS.

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

Conclusion. LDL modification with PLA₂ could be responsible for LDL(-) generation, since physico-chemical and biological coincidences exist between LDL(-) and PLA₂-LDL.

Key words:

Modified LDL. Electronegative LDL. PLA₂.

Introducción

La LDL (lipoproteína de baja densidad) electronegativa (LDL(-)) es una fracción minoritaria (1-10%) de la LDL total, la cual, debido a su mayor carga negativa, es aislable por cromatografía de intercambio aniónico. Se aisló por vez primera en 1988 por Avogaro et al¹, y posteriormente estudiada por otros autores; existen considerables discrepancias, especialmente respecto a si se trata de una partícula con características oxidativas o no. Sí existe consenso en que la LDL(-) presenta propiedades aterogénicas como son una densidad y tamaño alterados^{2,6}, una mayor agregabilidad⁷, una afinidad disminuida por el receptor de LDL^{1,8}, inducción de toxicidad en células endoteliales⁵ y de liberación de proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) e interleucina (IL)-8 en células endoteliales^{7,9}. A pesar del interés que suscita la existencia de una LDL modificada en circulación con propiedades aterogénicas, no se conocen los mecanismos que dan lugar a la formación de dichas partículas. Un posible mecanismo sería de naturaleza enzimática y, dado que la LDL(-) presenta un contenido aumentado en ácidos grasos no esterificados (NEFA)^{7,9} y lisofosfatidilcolina (LPC)¹⁰, la fosfolipasa A₂ (PLA₂) sería candidata a generar esta forma modificada de LDL. La PLA₂ es una enzima, de la que existen diferentes tipos, que hidroliza los glicerofosfolípidos en el ácido graso en posición 2¹¹ y, debido a que la fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido más abundante en la LDL, por acción de esta enzima se formarán NEFA y LPC. Además, la concentración plasmática de PLA₂ secretora no pancreática (sPLA₂) está aumentada en situaciones inflamatorias¹² y está relacionada con riesgo cardiovascular^{13,14}. Igualmente, el porcentaje de LDL(-) también se halla incrementado en patologías de elevado riesgo cardiovascular que normalmente están asociadas a inflamación^{6,7,15,16}. Estos indicios hacen pensar en la implicación de la PLA₂ en la formación de LDL(-). En consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue modificar LDL nativa con PLA₂, concretamente con sPLA₂ del tipo II A, y estudiar sus características, comparándolas con las obtenidas en trabajos anteriores en la LDL(-), para evaluar en qué medida las reproduce.

Métodos

Obtención de LDL

Se utilizó plasma-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a partir de voluntarios normolipémicos (NL) con concentraciones de colesterol total < 6,5 mmol/l, colesterol LDL < 4,0 mmol/l y triglicéridos < 2 mmol/l. Todos los sujetos eran normoglucémicos, no fumadores y con una edad comprendida entre 32 y 59 años. Dado el elevado número de determinaciones a realizar y la cantidad de muestra necesaria para ello, se hicieron mezclas de plasma de 10-15 individuos con el fin de obtener un volumen de plasma de 100-150 ml.

Fraccionamiento de la LDL total en LDL(+) y LDL(-)

La LDL total (1,020-1,050 kg/l) se aisló mediante ultracentrifugación secuencial de flotación a 4 °C y con 1 mmol/l EDTA¹⁷. La LDL total se fraccionó en LDL(+) y LDL(-) mediante cromatografía de intercambio aniónico con un gradiente salino escalonado, utilizando una columna preparativa Q-Sepharose 35/100 en un sistema FPLC (Pharmacia), siguiendo la metodología descrita⁹. Posteriormente se concentraron las fracciones por ultracentrifugación, la LDL(+) se utilizó para modificarla con PLA₂ y la LDL(-) se conservó a 4 °C hasta el momento de realizar las determinaciones, las cuales se desarrollaron en el período de 1 semana.

Modificación de LDL(+) con fosfolipasa A₂

La fracción LDL(+) se dializó en tampón A (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, BHT 20 µM). Se procedió a incubarla a una concentración de 1 g/l de apolipoproteína (apo) B con diferentes concentraciones de PLA₂ secretora de tipo II, no pancreática, procedente de veneno de abeja (Sigma ref. # P9279) (0, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg/l) durante 2 h a 37 °C, en presencia de albúmina (45 g/l) y con tampón de PLA₂ (5 mM HEPES, 5 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 140 mM NaCl)¹⁸. Se detuvo la reacción con 10 mM de EDTA y se procedió a aislar la LDL modificada (PLA₂-LDL) por ultracentrifugación, para posteriormente evaluar las características de esta partícula.

Composición y características fisicoquímicas

El contenido de las LDL en colesterol total (CT), colesterol libre (CL), triglicérido (TG) y apo B (Roche Diagnostics) y en fosfolípidos totales (FL) y NEFA (Wako Diagnostics) se determinó en un autoanalizador Hitachi 911.

La composición en fosfolípidos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase directa, siguiendo el método descrito¹⁹ con algunas modificaciones. Como estándar interno se usó dipalmitoil-glicero-fosfodimetil etanolamina (DGPE, Sigma ref. # P0399). Los lípidos de las LDL se extrajeron por el método de Bligh and Dyer²⁰, el *pellet* obtenido se resuspendió con 200 µl de hexano:isopropanol:agua (vol:vol:vol 6/8/1) y, de éstos, 20 µl se inyectaron en una columna (Hibor Lichrosorb Si60, 5 µm, Merck). La fase móvil fue acetonitrilo:metanol:sulfato de amonio 5 mM (vol:vol:vol 56/23/6). La detección de los picos se realizó a 206 nm mediante un detector Diode Array (Modelo 168, Beckman).

La movilidad electroforética relativa se determinó en geles de agarosa comerciales (Biomidi). El tamaño de la LDL se determinó mediante electroforesis no desnaturante en gradiente de acrilamida⁶. La susceptibilidad a la oxidación de las fracciones de LDL se evaluó con la monitorización de la formación de dienos conjugados a 234 nm tras incubación con CuSO₄¹⁵. La susceptibilidad a la agregación se determinó por medida de absor-

bancia a 680 nm después de inducir la agregación de la LDL mediante agitación por vórtex a tiempos crecientes²¹.

Estudios de afinidad al rLDL en fibroblastos

Se utilizaron fibroblastos humanos de explantes de piel obtenidos del American Type Culture Collection, cultivados en frascos de 75 cm² a 37 °C y 5% CO₂ en medio DMEM completo (suplementado con 10% suero bovino fetal [SBF], 2 mmol/l glutamina, 0,1 UI/l penicilina y 100 mg/l estreptomycin). Para los experimentos de unión al rLDL se separaron los fibroblastos del frasco de cultivo con tripsina/EDTA 0,05/0,02% y se sembraron inóculos de 50,000 células/ml en placas de cultivo de 12 pozos y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia. Se cambió el medio completo por medio deficiente en lipoproteínas (DMEM completo en que se ha sustituido el SBF por 10% de suero deficiente en lipoproteínas [Lpds]); el Lpds se obtuvo por ultracentrifugación secuencial a densidad 1,210 kg/l. Tras 2 días en medio deficiente, durante los cuales se aumenta la expresión del rLDL, se realizaron los experimentos de desplazamiento de la unión. Para éstos, se marcó LDL(+) con el compuesto fluorescente DiI (DiI-LDL) según la metodología descrita²² y se añadió una concentración fija (25 mg apo B/L) de DiI-LDL y, para desplazar la unión, concentraciones crecientes de las diferentes muestras de PLA₂-LDL sin marcar, por duplicado. La incubación tuvo lugar durante 3 h a 4 °C. A partir de estas curvas se determinó la concentración de desplazador necesaria para desplazar el 50% de la unión (IC₅₀), que es una estimación indirecta de la afinidad por el receptor.

Estudios de liberación de IL-8 y MCP-1 en células endoteliales

Las células endoteliales se obtuvieron a partir de la vena de cordones umbilicales (HUVEC) procedentes del Servicio de Obstetricia del Hospital de Sant Pau. El cultivo primario se obtuvo mediante digestión con collagenasa según métodos descritos²³. Las HUVEC crecieron en frascos de 75 cm² a 37 °C y 5% CO₂ con medio 199 de crecimiento (20% SBF, 2 mmol/l glutamina, 20 mmol/l HEPES, 30 mg/l suplemento de crecimiento endotelial, 10.000 unidades/l heparina, 0,1 UI/l penicilina y 100 mg/l estreptomycin). Una vez alcanzada la confluencia, las células fueron tripsinizadas (tripsina/EDTA, 0,05/0,02%) y se hicieron inóculos de 100.000 células/pozo en placas de 6 pozos donde crecieron de nuevo con medio 199 de crecimiento hasta alcanzar la confluencia. Entonces el medio fue cambiado por medio de mantenimiento (199 con 1% de SBF) y se incubaron las HUVEC con las diferentes lipoproteínas durante 24 h. Se utilizó IL-1β como control positivo de inducción de quimiocinas. En estos experimentos se comprobó la ausencia de contaminación por lipopolisacárido (E-toxate, Sigma). A partir del sobrenadante del medio de cultivo se determinó la liberación al

a (+)

(-)

b (-)

(+)

Figura 1. 1a: electroforesis en gel comercial de agarosa (Midigel, Biomidi). 1 y 9, LDLox; 2, LDL(+); 3, LDL(-); 4, PLA2 0 µg/l; 5, PLA2 5 µg/l; 6, PLA2 10 µg/l; 7, PLA2 25 µg/l; 8 y 10, PLA2 50 µg/l. (LDLox: LDL oxidada in vitro con cobre 10 µM durante 24 h.) 1b: electroforesis en gradiente de acrilamida (4-16%) en ausencia de SDS, en ausencia (1-4) o presencia de 45 g/l de albúmina (6-9). 1 y 6- PLA2 5 µg/l; 2 y 7, PLA2 10 µg/l; 3 y 8, PLA2 25 µg/l; 4 y 9, PLA2 50 µg/l; 5, estándar diámetro; 10, LDL nativa. El estándar de diámetro presenta cuatro bandas de LDL con diámetro conocido.

medio de IL-8, MCP-1 mediante enzoinmunoanálisis (ELISA) comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (Endogen y Pharmingen, respectivamente).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Las diferencias entre grupos de datos apareados se analizaron con la prueba T de Wilcoxon, y entre grupos de datos no apareados con la U de Mann-Whitney. Una significación de p < 0,05 fue considerada significativa.

Resultados

Composición

La modificación de la LDL(+) con PLA₂ reproduce las características descritas previamente por

Tabla 1. Composición de la LDL tratada a diferentes concentraciones de PLA₂ (n = 19)

PLA ₂ (µg/l)	% CT	% TG	% FL	% CL	% CE	% apo B	NEFA (mol/mol apo B)
0	38,5 ± 0,6	7,4 ± 0,2	27,4 ± 0,9	11,2 ± 0,2	27,3 ± 0,7	26,7 ± 0,3	5,8 ± 2,3
0,5	38,4 ± 0,2	7,8 ± 0,1	27,3 ± 0,1 ^a	11,3 ± 0,1	27,0 ± 0,2	26,5 ± 0,3	18,5 ± 4,3 ^a
1	38,5 ± 0,2	7,8 ± 0,2	27,0 ± 0,1 ^a	11,5 ± 0,1	27,0 ± 0,2	26,7 ± 0,3	25,5 ± 2,7 ^a
5	40,0 ± 0,6	8,1 ± 0,8	24,0 ± 0,6 ^a	11,8 ± 0,2	27,8 ± 0,1	28,1 ± 0,3	47,0 ± 5,2 ^a
10	41,6 ± 0,7	8,3 ± 0,3	21,3 ± 0,4 ^a	12,2 ± 0,4	28,8 ± 0,4	28,8 ± 0,1	66,5 ± 6,5 ^a

^ap < 0,05 respecto a PLA₂-LDL 0 µg/l. Resultados expresados como media ± desviación estándar (DE). Los resultados se expresan como porcentaje en masa de los principales componentes: colesterol total (CT), triglicéridos (TG), fosfolípidos totales (FL), colesterol libre (CL) y apolipoproteína B (apo B), mientras que el contenido en ácidos grasos no esterificados (NEFA) se expresa en mol/mol apo B.

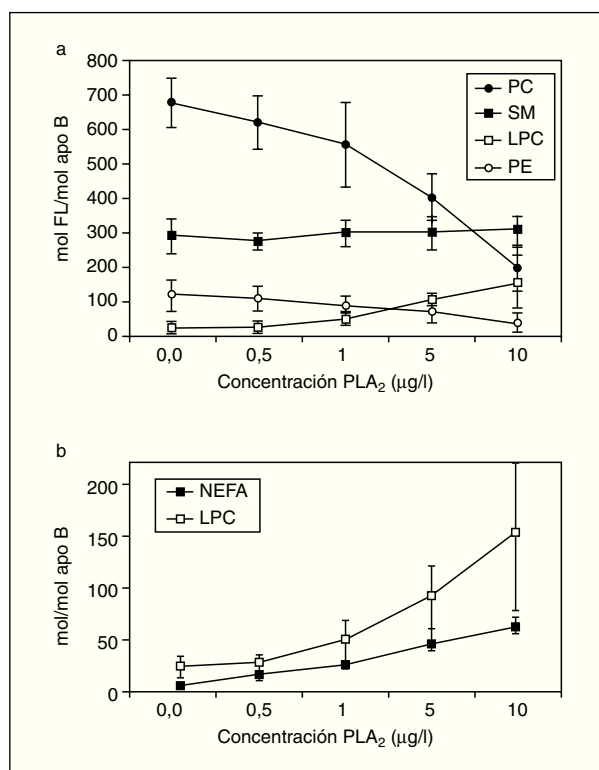


Figura 2. Contenido de los principales fosfolípidos (2a) en LDL(+) tratadas con PLA₂ determinados por HPLC de fase directa (n = 5). La figura 2b muestra el aumento de LPC y NEFA. Resultados expresados en mol/mol de apo B. PC: fosfatidilcolina; SM: esfingomielina; PE: fosfatidiletanolamina; LPC: lisofosfatidilcolina; NEFA: ácidos grasos no esterificados.

otros autores: ganancia de carga eléctrica negativa y menor tamaño²⁴, como se observa en las figuras 1a y 1b. Asimismo, la PLA₂-LDL indujo de manera significativa un aumento dependiente de la dosis

del contenido en NEFA y una disminución en fosfolípidos totales (tabla 1). Con el fin de analizar detalladamente el descenso de fosfolípidos totales, se procedió a analizar el contenido de los principales fosfolípidos de la PLA₂-LDL por HPLC, y se observó que el tratamiento con PLA₂ producía una disminución gradual del fosfolípido mayoritario, la PC, y también de la fosfatidiletanolamina (PE); paralelamente se observó un aumento de LPC (fig. 2a). En la figura 2b se muestra el aumento progresivo de NEFA y LPC inducido por la acción de la PLA₂. El tratamiento con concentraciones de PLA₂ de entre 1 y 5 µg/l genera un contenido en NEFA y LPC similar al observado en la fracción de LDL(-) (NEFA, 32,65 ± 12,34; LPC, 54,80 ± 23,31 mol/mol apo B) y superior al observado en la LDL(+) (NEFA, 15,70 ± 13,37; LPC, 28,51 ± 16,50 mol/mol apo B).

Susceptibilidad a la oxidación y a la agregación

Se observó un diferente comportamiento de la PLA₂-LDL al aumentar la concentración de la enzima a la que se expuso la LDL, concretamente la susceptibilidad a la oxidación disminuyó (fig. 3), dato reflejado en el aumento dependiente de la dosis en la fase de latencia. Este resultado coincidió con lo previamente descrito para la LDL(-)⁷. En cuanto a la susceptibilidad a la agregación, también se observó un aumento gradual con el tratamiento con PLA₂ (fig. 4), efecto también observado en la LDL(-)⁷.

Interacción con el rLDL

Previamente se ha indicado que la LDL(-) presenta una afinidad disminuida por el rLDL⁸, efecto que también se observa en la PLA₂-LDL, como

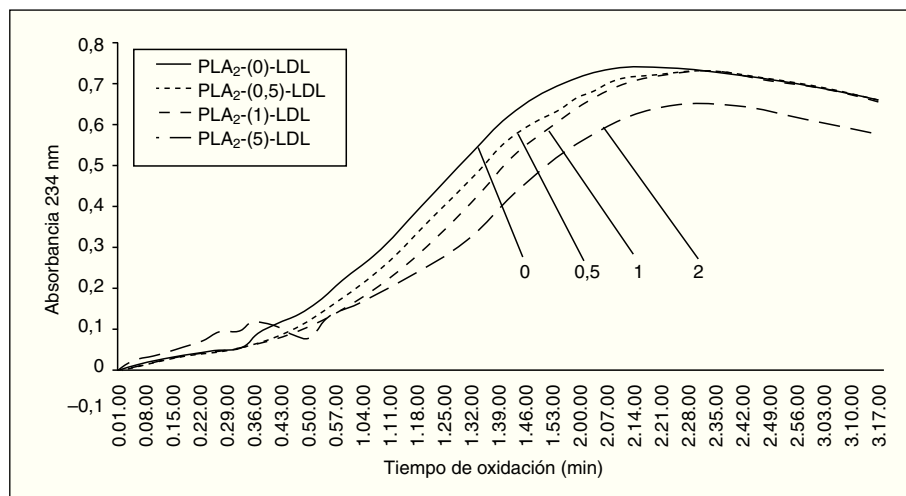


Figura 3. Susceptibilidad a la oxidación valorada por la formación de dienos conjugados (absorbancia a 234 nm) tras inducir la oxidación con 2,5 µM de cobre a las LDL modificadas con PLA₂, dializadas en PBS (0,05 g/l) (n = 6).

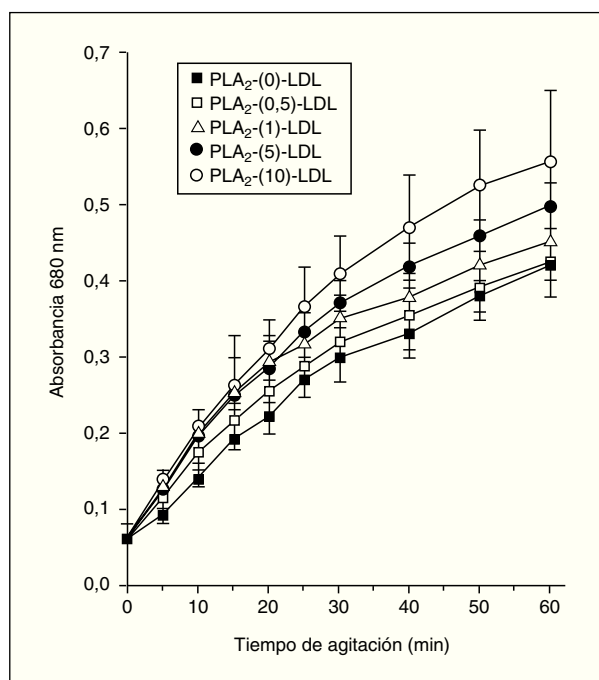


Figura 4. Susceptibilidad a la agregación de las LDL modificadas con PLA₂, determinada como absorbancia a 680 nm tras agitación con vórtex a tiempos crecientes (n = 4).

muestra la figura 5. Se observó que a mayor exposición a la enzima, la PLA₂-LDL era menos eficaz en el desplazamiento de la unión de la LDL nativa

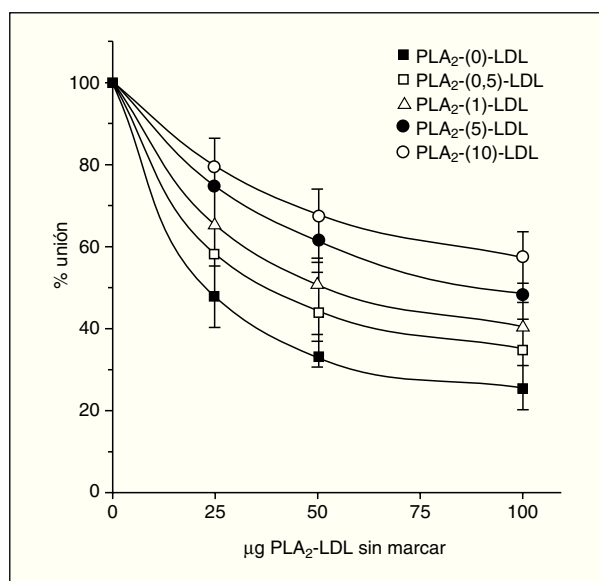


Figura 5. Estudios de desplazamiento de la unión total de LDL(+) marcada con DiI (25 mg/l apo B) con cantidades crecientes de LDL tratada con PLA₂ a las diferentes concentraciones tras 3 h de incubación a 4 °C en cultivos de fibroblastos humanos (n = 7).

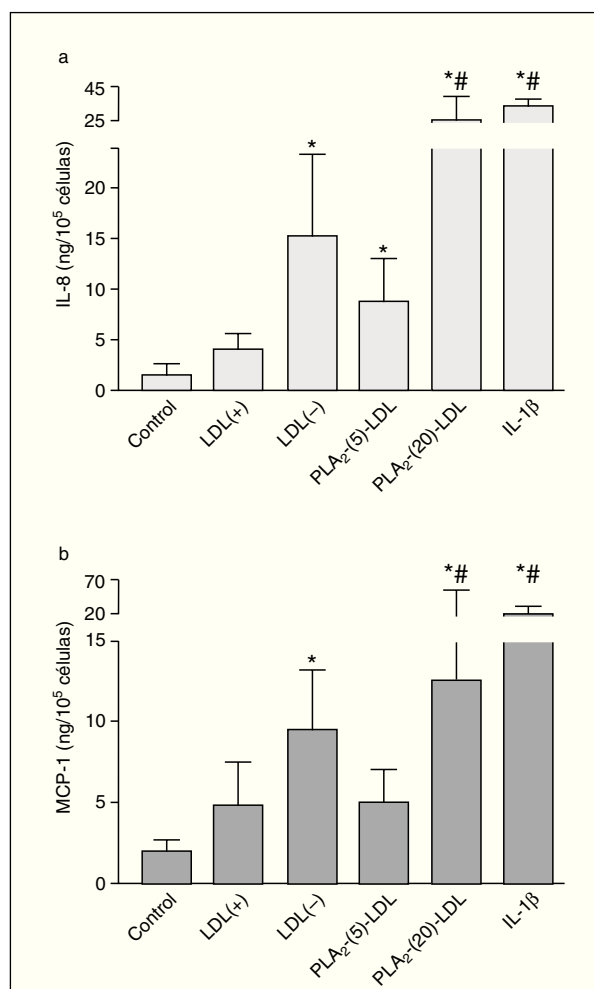


Figura 6. Efecto sobre la liberación de quimiocinas al medio de cultivo por parte de células HUVEC incubadas con 100 µg de muestra: LDL(+), LDL(-), PLA₂-LDL (5 y 20 µg/l) o interleucina-1 (IL-1) a 20 µg/l durante 24 h a 37 °C. Se evaluó la producción de IL-8 (fig. 6a) y MCP-1 (fig. 6b) (n = 3). *p < 0,05 frente a LDL(+); #p < 0,05 frente a LDL(-).

marcada con DiI, indicando una menor afinidad por el receptor.

Liberación de quimiocinas por células endoteliales

La PLA₂-LDL indujo la liberación de IL-8 y MCP-1 por células endoteliales (figs. 6a y 6b) reproduciendo también esta propiedad de la LDL(-)^{7,9}. Este efecto se observó a 2 concentraciones diferentes: la de 5 µg/l, de contenido en NEFA y LPC similar a la LDL(-) aislada de plasma, y una concentración mayor, de 20 µg/l, en que se observó este mismo efecto pero aumentado. En paralelo, para comprobar el buen funcionamiento de los experimentos, también se incubaron las células con LDL(+), LDL(-) y, como control positivo, con IL-1β.

Discusión

Existen diversas pruebas que apuntan a una posible implicación de la LDL(-) en el proceso aterosclerótico. Una de las más relevantes es su capacidad de inducir la liberación de quimiocinas en células endoteliales, concretamente IL-8 y MCP-1^{7,9} implicadas en la atracción de neutrófilos y monocitos, respectivamente, a la pared endotelial. El reclutamiento de leucocitos tiene lugar en las primeras fases de la lesión, hecho que desencadena el desarrollo de eventos posteriores que desembocan en su evolución y la aparición de arteriosclerosis²⁵. Por tanto, la LDL(-), al ejercer un efecto inflamatorio, desempeñaría un papel en el inicio del proceso arteriosclerótico y, en consecuencia, sería de gran interés el conocimiento de su origen y características. Sin embargo, no se ha establecido cuál es el mecanismo responsable de la generación de esta LDL modificada presente en la circulación. Algunos autores defienden que la LDL(-) presenta un origen oxidativo, ya que hallan pruebas que parecen indicarlo^{2,3,10}, mientras que otros lo descartan^{4,5,9}. Varios estudios han descrito la presencia en la circulación de LDL oxidada, pero mayoritariamente en concentraciones muy bajas, inferiores al 0,1%^{26,27}, lo cual implicaría que, aunque se aislara junto a la LDL(-), sólo representaría una pequeña parte de ella. Otros mecanismos que podrían generar la aparición de LDL(-) serían los enzimáticos, concretamente debido a enzimas presentes en circulación o en lesión y que tengan como sustrato la LDL. Se ha descrito que la acción de algunas enzimas –como la PLA₂, la acetil hidrolasa del factor activador plaquetario (PAF-AH) o la esfingomielinasa (SMasa)– sobre la LDL induce cambios en la composición, la modificación de la estructura y la agregabilidad²⁸ de la partícula. Además, también generan productos inflamatorios, como en el caso de la PLA₂ y PAF-AH, en que se produce LPC y NEFA íntegros o fragmentados²⁹. Está establecido que la LDL(-) tiene aumentado su contenido en NEFA^{7,9}, y un trabajo indica que también lo está el de la LPC¹⁰, resultado que se ha verificado en el presente estudio, en que se han obtenido valores de LPC en la LDL(-) que duplican a los observados en la LDL(+). Estos resultados hacen pensar que la PLA₂ y/o la PAF-AH podrían desempeñar un papel en la formación de LDL(-).

En un reciente estudio se ha descrito que la LDL(-) presenta mayores contenido y actividad de PAF-AH³⁰, lo cual podría implicar a esta enzima como causal de la concentración aumentada de NEFA y LPC de la partícula. En realidad, la PAF-AH es una PLA₂ asociada a lipoproteínas³¹, por lo que

otra posibilidad es que la LDL(-) también podría generarse por acción de la sPLA₂, la cual es secretada principalmente por células musculares lisas y macrófagos, y su liberación está extraordinariamente aumentada en inflamación¹², coincidiendo con el hecho de que la proporción de LDL(-) también se incrementa en situaciones asociadas con inflamación^{6,7,15,16}. La artritis reumatoide es una situación en la cual se describen aumentos tanto de PLA₂ como de LDL(-)^{32,33}. Además, se ha establecido que el tratamiento con estatinas disminuye las concentraciones de sPLA₂, y también las de LDL(-), en pacientes hipercolesterolémicos^{34,35}.

En este trabajo se estudiaron las características de la PLA₂-LDL y se compararon con las de la LDL(-), y se observó que la primera reproducía gran parte de las propiedades tanto fisicoquímicas como biológicas de la segunda, de forma dependiente de la dosis. Se hallaron más coincidencias en aquellas condiciones en las que, por efecto de la modificación con la enzima, se obtuvieron valores de NEFA y LPC similares a los que se observan en la LDL(-). En primer lugar, se comprobaron cualidades de la PLA₂-LDL previamente descritas, como son su mayor carga negativa, la disminución del tamaño y la formación de NEFA y LPC²⁴. También se realizó la incubación con y sin albúmina en concentraciones fisiológicas, y se obtuvo que, en ausencia de albúmina, la modificación producida en la LDL era excesiva para nuestros objetivos. Estos parámetros fueron de utilidad para decidir las concentraciones de PLA₂ que debían emplearse para que el resultado fuera una LDL similar a la LDL(-). En el análisis de la composición se comprobó que el descenso en fosfolípidos totales de la PLA₂-LDL era debido a que se producía una disminución en el fosfolípido mayoritario, la PC, y paralelamente aumentaba el contenido en LPC, aunque no de forma proporcional al descenso en PC. Este hecho ocurre porque no toda la LPC formada queda retenida en la LDL, sino que una gran parte se transfiere a la albúmina utilizada en la incubación, la cual se usó en concentraciones fisiológicas para intentar reproducir las condiciones *in vivo*; de igual manera, también parte de los NEFA generados se transfieren a la albúmina. A pesar de esta transferencia a la albúmina, una parte de los productos permanecen en la PLA₂-LDL, aumentando su contenido en NEFA y LPC respecto a la LDL no modificada²⁴.

Por otra parte, la PLA₂-LDL también presentó menor susceptibilidad a la oxidación y mayor a la agregación, características que han sido descritas para la LDL(-)⁷. La mayor agregabilidad también

parece demostrarse al visualizar en la PLA₂-LDL bandas de mayor tamaño en los geles en gradiente de poliacrilamida que indicarían la presencia de agregados, observación que coincide con el hecho descrito de que la LDL modificada con PLA₂ se puede agregar y fusionar³².

La menor afinidad al rLDL de PLA₂-LDL, que coincide con la LDL(-)⁸, había sido sugerida por otros autores²⁴, quienes indican que tendría lugar una unión inespecífica en fibroblastos en cultivo, este efecto se ha atribuido a cambios en la expresión de epítomos de la apo B que disminuirían la interacción con el rLDL. También se ha descrito que la LDL(-) presenta una estructura alterada de la apo B³⁶. Esta diferente conformación de la apo B de ambas partículas podría ser responsable de algunas de sus características, como la mayor resistencia a la oxidación y la tendencia aumentada a agregarse. Por otra parte, esta alteración estructural en la apo B puede ser propiciada por cambios en la composición lipídica de la partícula, ya que hay una íntima relación entre todos los componentes de la LDL^{37,38}. Esto implicaría que la disminución en fosfolípidos totales o bien la mayor concentración de LPC y NEFA podrían ser candidatos a ocasionar la afinidad disminuida por el rLDL. Existe confirmación de este hecho en el caso de los NEFA, en que el mayor contenido de éstos en la LDL causa una menor unión al receptor³⁹.

Respecto al efecto sobre células endoteliales, se observó una vez más coincidencia entre la PLA₂-LDL y la LDL(-), ya que ambas inducían la producción de IL-8 y MCP-1. Este fenómeno se podría deber al mayor contenido de dichas partículas en NEFA y LPC, los cuales son conocidos mediadores de la inflamación²⁹. La inducción de quimiocinas por la PLA₂-LDL no se había descrito anteriormente y es de gran importancia, ya que si la PLA₂ está aumentada en situaciones inflamatorias y al actuar sobre la LDL le confiere más propiedades inflamatorias, el efecto se magnificaría.

Todos estos resultados indican que la PLA₂-LDL comparte una serie de características con la LDL(-), lo cual sugiere que la PLA₂ podría ser uno de sus mecanismos que intervienen en la formación de la LDL(-), pero no lo demuestra con certeza, ya que se podría observar el mismo comportamiento por causas distintas. Por ejemplo, la menor susceptibilidad a la oxidación se podría deber a la mayor presencia de agregados en el caso de la PLA₂-LDL y a la mayor actividad PAF-AH en el de la LDL(-). De todas formas, existen diversas coincidencias que hacen probable la hipótesis inicial del estudio, como el hecho de que el porcentaje de

LDL(-) esté aumentado en situaciones asociadas con inflamación, circunstancia también descrita para la PLA₂. La PLA₂ podría actuar sobre la LDL en circulación o bien en la pared arterial, donde es más abundante⁴⁰, sobre todo en inflamación, modificando a la LDL, la cual podría volver a la circulación como LDL(-).

La PLA₂-LDL reproduce gran parte de las propiedades de la LDL(-), aunque sería de gran interés valorar si existe también coincidencia en otros factores como es la mayor afinidad por proteoglicanos ya descrita para la PLA₂-LDL⁴¹, que implica una mayor retención en la pared arterial, característica relacionada con aterogenicidad de la LDL. La coincidencia entre PLA₂-LDL y LDL(-) no siempre se da en el mismo grado; por ejemplo, la PLA₂-LDL 1 µg/l, con un contenido de NEFA y LPC más cercano al de la LDL(-), comparativamente es menos susceptible a agregarse y presenta menos afinidad por el receptor que la LDL(-). En consecuencia, no se puede afirmar que la PLA₂ sea la única causa de generación de LDL(-), ya que no hay que descartar que participen otros mecanismos diferentes, como el ya mencionado de la PAF-AH. Por tanto, podrían existir distintas partículas de LDL(-) con diferente origen entre ellas y/o LDL(-) generada por la combinación de varios mecanismos que actúen sobre la misma partícula.

En conclusión, los datos sugieren que la LDL tratada con PLA₂ reproduce las principales características fisicoquímicas y biológicas de la LDL(-), de manera que modificando LDL(+) con PLA₂ se obtiene como resultado la generación *in vitro* de LDL(-).

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer el excelente apoyo técnico de Esther Gerbolés y Sonia Alcolea.

Bibliografía

1. Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis* 1988;8:79-87.
2. 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.
3. 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.
4. Chappay 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.
5. Demuth K, Myara I, Chappay 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Dennis EA. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994;269:13057-60.
12. Nevalainen TJ. Serum phospholipase A₂ in inflammatory diseases. *Clin Chem* 1993;39:2453-9.
13. Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, et al. Circulating levels of secretory type II phospholipase A₂ predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:1280-4.
14. Porela P, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM, Pettersson K, Leppanen V, Nevalainen TJ. Level of circulating phospholipase A₂ as an independent predictor of coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;343:1148-54.
15. 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.
16. Ziouzenkova O, Sevanian A. Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) in HD patients: role in electronegative formation. *Blood Purif* 2000;18:169-76.
17. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally-separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345-53.
18. Hakala JK, Öörni K, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Lipolytic modification of LDL by phospholipase A₂ induces particle aggregation in the absence and fusion in the presence of heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1276-83.
19. Patton GM, Robins SJ. Separation and quantitation of phospholipid classes by HPLC. En: Ordóñez JM, editor. *Lipoprotein protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1998.
20. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-4.
21. Khoo J, Miller E, McLaughlin P, Steinberg D. Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. *Arteriosclerosis* 1988;8:348-58.
22. Stephan ZF, Yurachek EC. Rapid fluorimetric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res* 1993;34:325-30.
23. 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.
24. Kleinman Y, Krul ES, Burnes M, Aronson W, Pfleger B, Schonfeld G. Lipolysis of LDL with phospholipase A₂ alters the expression of selected apoB-100 epitopes and the interaction of LDL with cells. *J Lipid Res* 1988;29:729-43.
25. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Macphée 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.
30. 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.
31. Macphée CH, Milliner K, Moores KE, et al. The involvement of LDL-associated phospholipase A₂ in atherogenesis. *Pharmacol Rev* 1996;8:309-15.
32. Hurt-Camejo E, Camejo G, Peilot H, Öörni K, Kovanen P. Phospholipase A₂ in vascular disease. *Circ Res* 2001;89:298-304.
33. Dai L, Zhang Z, Winyard PG, Gaffney KG, Jones H, Blake DR, et al. A modified form of low-density lipoprotein with increased electronegative charge is present in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Free Rad Biol Med* 1997;22:705-10.
34. Wiklund O, Mattsson H, Hurt-Camejo E, Oscarsson J. Effects of simvastatin and atorvastatin on inflammation markers in plasma. *J Intern Med* 2002;251:338-47.
35. 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.
36. Parasassi T, Bittolo-Bon G, Branelli R, Cazzolato G, Krasnowska EK, Mei G, et al. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroxide rich, electronegative LDL(-). *Free Radic Biol Med* 2001;31:82-9.
37. Harduin P, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C. Modulation of the expression of human LDL-apoB100 epitopes by lipids and apolipoproteins. *Arterioscler Thromb* 1993;13:529-35.
38. Bañuelos S, Arrondo JL, Goni FM, Pifat G. Surface-core relationships in human low density lipoprotein as studied by infrared spectroscopy. *J Biol Chem* 1995;270:9192-6.
39. Benítez S. LDL electronegativa: caracterización fisicoquímica y biológica en individuos normolipémicos e hipercolesterolémicos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, 2002.
40. Romano M, Romano E, Björkerud S, Hurt-Camejo E. Ultrastructural localization of secretory type II phospholipase A₂ in atherosclerotic and nonatherosclerotic regions of human arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:519-25.
41. Hurt-Camejo E, Camejo G, Sartipy P. Phospholipase A₂ and small, dense low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:465-71.