

RESULTATS

A- CARACTERITZACIÓ FÍSICO-QUÍMICA DE LES FRACCIONS LDL(+) I LDL(-) D'INDIVIDUS NORMOLIPÈMICS I HIPERCOLESTEROLÈMICS

Es van estudiar diferents aspectes a nivell físico-químic de la fracció LDL(-), tant d'individus normolipèmics (NL) com de hipercolesterolèmics (HF). Això va incloure la determinació dels components majoritaris i minoritaris (lípid, apoproteïnes i àcid siàlic). També les molècules relacionades amb els processos oxidatius (aldehids, hidròxids i antioxidants). A més, es va avaluar la susceptibilitat a l'oxidació i a l'agregació "in vitro", la caracterització electroforètica i la distribució en el rang de densitat de l'LDL. Aquestes característiques condicionaran la seva interacció amb els receptors cel·lulars i el seu paper biològic a l'endoteli.

A.1 PROPORCIÓ D'LDL(-) DETERMINADA PER CROMATOGRÀFIA DE BESCANVI ANIÒNIC

La separació de les fraccions LDL(+) i LDL(-), a partir de l'LDL total dels dos grups d'individus a estudiar, es va realitzar per mitjà d'una columna preparativa Q-Sepharosa, per tal d'obtenir quantitats suficients de mostra per a realitzar la caracterització d'ambdues fraccions. L'LDL(-) d'NL va representar una proporció que va oscil·lar entre el 2 i el 10% del total d'LDL (n=51), mentre que la d'HF va representar un percentatge d'entre el 6 i el 17% (n=31). Les mitjanes dels valors d'LDL(-) calculats per colesterol, apoB i àrea dels pics cromatogràfics mesurats a 280 nm s'indiquen a la Taula 1.

Taula 1. Proporció d'LDL(-)

% LDL(-)	Àrea	Colesterol	ApoB
NL	5.75±1.80	5.51±1.13	6.87±1.56
HF	12.00±3.44*	11.44±2.57*	11.55±2.85*

* p<0.05 NL vs FH

Aquests resultats indiquen que els individus HF presenten significativament un major percentatge de fracció electronegativa que els NL, d'aproximadament el doble, i aquest percentatge va ser similar realitzant el càlcul per qualsevol dels tres mètodes.

La imprecisió inter-serial de la mesura de la proporció d'LDL(-) va ser inferior al 10% (n=5). La recuperació de la columna de Q-Sepharosa va ser en tots els experiments superior al 90%. Es va comprovar que l'LDL(-) estigués lliure de contaminació amb VLDL i amb Lp(a), ja que ambdues partícules són considerablement més electronegatives que l'LDL nativa. Es va descartar la contaminació amb VLDL pel límit d'exclusió de la columna (4×10^6 dalton), ja que l'VLDL presenta una major grandària. Respecte a l'Lp(a), com és una lipoproteïna de densitat superior a 1.050 kg/L, queda descartada pel tall de densitat al qual es va aïllar l'LDL.

Com s'ha esmentat a Material i Mètodes, abans de realitzar el mètode del gradient esglaonat, es va provar un gradient linial en la columna mono-Q, que es mostra a les Figures 1a i 1b. Com s'observa, la resolució del cromatograma no és la desitjada, ja que els dos pics no es separen de forma diferenciada. Com a conseqüència, es va realitzar un gradient esglaonat, el qual, malgrat que és "menys fisiològic", permet una separació més adient de les fraccions LDL(+) i LDL(-). La Figura 1c mostra un cromatograma esglaonat representatiu en columna mono-Q, quedant palès el tipus de gradient utilitzat i els pics d'elució de les dues fraccions. Aquest mètode analític va ser utilitzat en treballs previs realitzats pel nostre grup on es va mesurar la proporció d'LDL(-) en diferents situacions. El següent pas va ser l'adaptació del mètode esglaonat a una columna preparativa Q-Sepharose 35/100, per tal d'aconseguir la quantitat d'LDL(-) necessària per desenvolupar la resta d'experiments. Degut a les diferències intrínseques d'ambdues columnes, i amb la finalitat d'obtenir la mateixa proporció d'LDL(-) en els dos mètodes, es va modificar

lleugerament la força iònica dels diferents esglaons, com s'indica a Material i Mètodes.

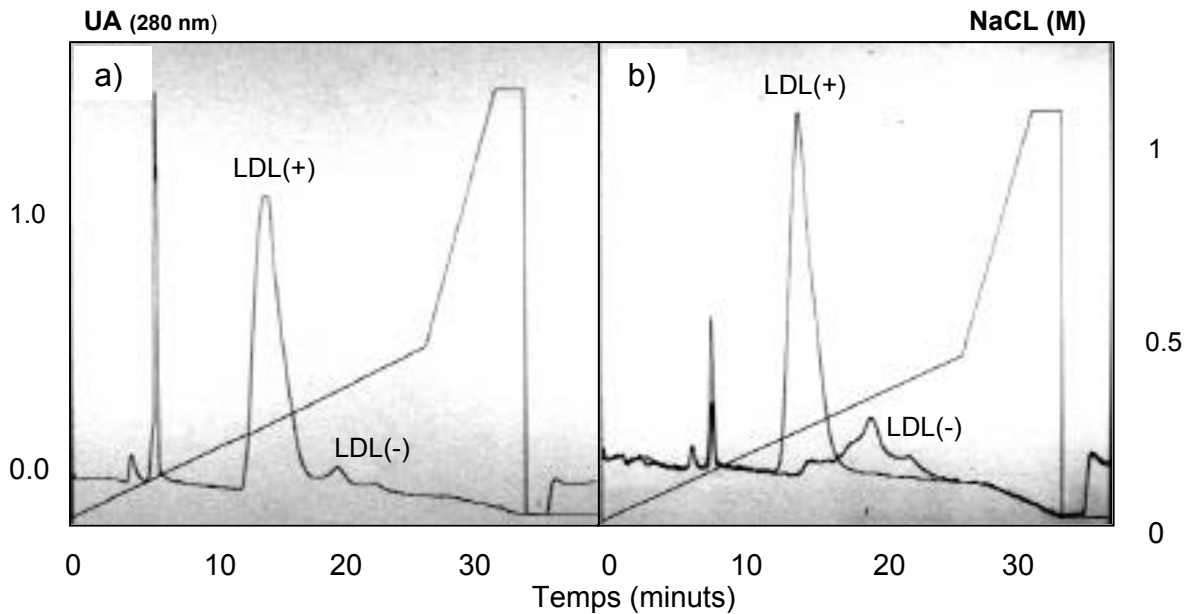


Figura 1a i 1b. Cromatograma lineal de les fraccions NL-LDL(+) i NL-LDL(-) en columna mono-Q, a partir d'LDL total (a) i de les fraccions re-cromatografiades per separat (b).

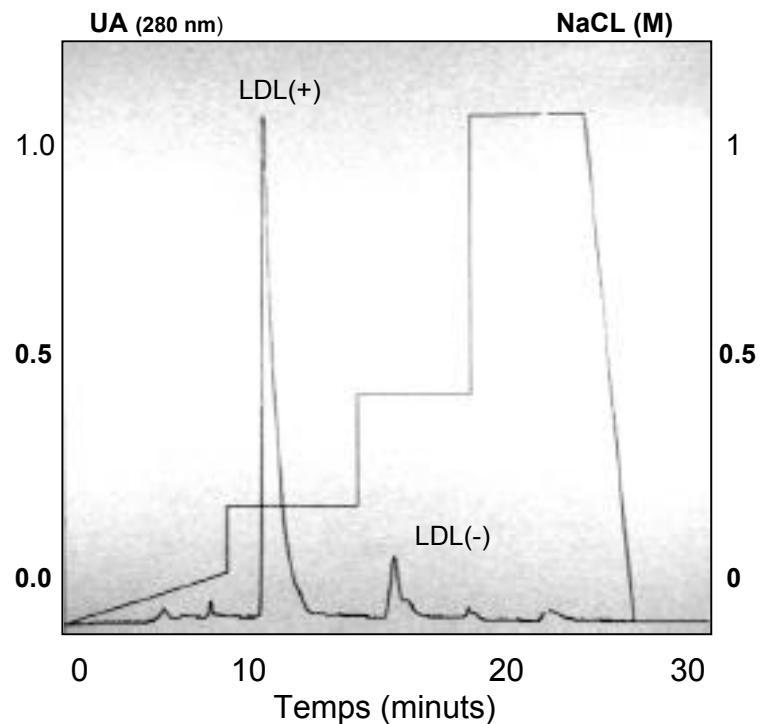


Figura 1c. Cromatograma esglaonat de les fraccions NL-LDL(+) i NL-LDL(-) en columna mono-Q, a partir d'LDL total.

En la Figura 2 queda palesa la diferent proporció de l'LDL(-) entre individus NL i HF, ja que, com s'ha comentat, s'observa que el pic corresponent a l'HF-LDL(-) presenta una àrea considerablement major que l'NL-LDL(-). En el cas dels HF va ser freqüent l'aparició d'un segon pic, posterior al de l'HF-LDL(+), corresponent a una fracció que va ser anomenada HF-LDL(+bis). L'HF-LDL(+bis) no va aparéixer en els estudis en què s'utilitzava la columna analítica mono-Q, en els quals aquesta fracció eluïa juntament amb l'HF-LDL(-). Per això, en aquestes condicions, el percentatge d'HF-LDL(-) va ser superior. La fracció HF-LDL(+bis) va presentar, com quedarà palès a apartats posteriors, característiques composicionals semblants a l'HF-LDL(+), però amb algunes diferències significatives. Per aquests motius, no es va considerar adient l'estudi de l'HF-LDL(+bis) i es va descartar, triant per als estudis subsegüents les dues fraccions més diferents respecte a la càrrega elèctrica.

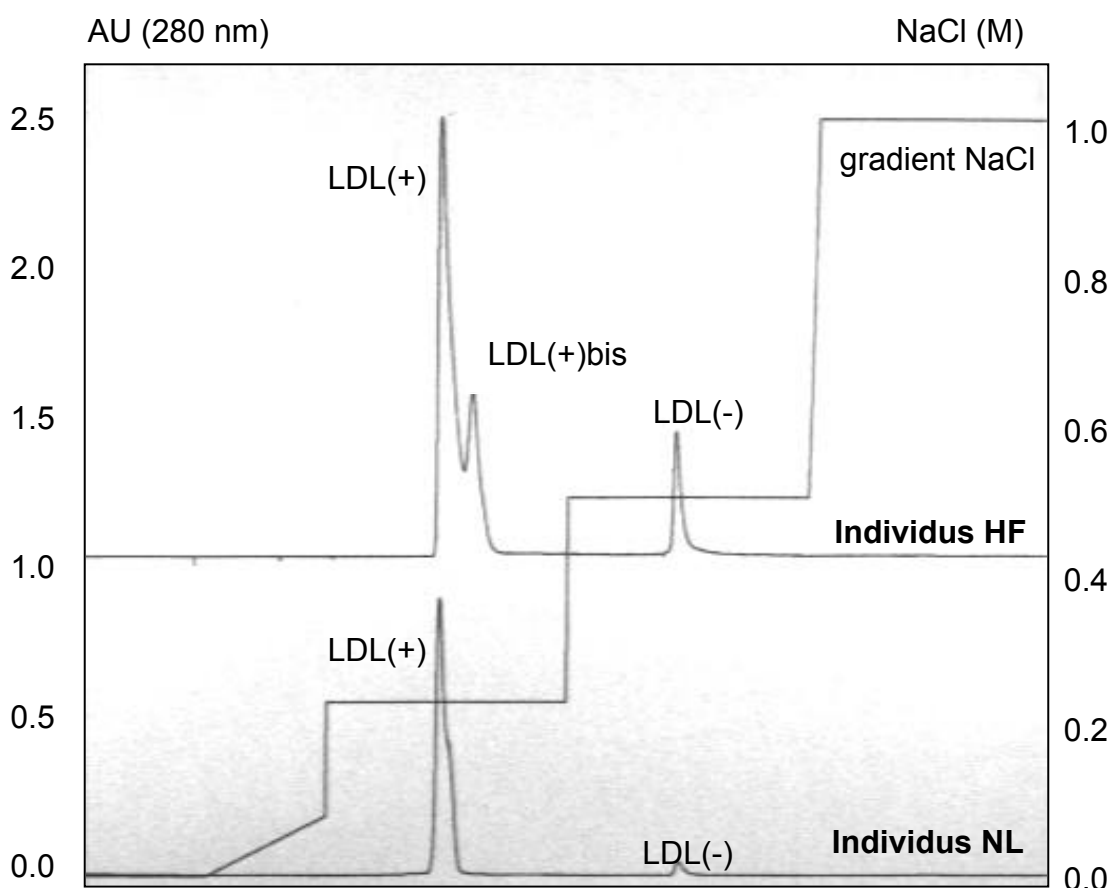


Figura 2. Cromatograma de les fraccions NL-LDL(+), NL-LDL(-), HF-LDL(+), HF-LDL(+bis) i HF-LDL(-) aïllades per cromatografia de bescanvi aniónic en columna Q-Sepharosa i gradient esglaonat.

A.2 DISTRIBUCIÓ DE L'LDL(-) EN LES FRACCIONS DE DENSITAT

A més de la proporció d'LDL(-) a partir del total d'LDL, es va valorar el percentatge de la fracció electronegativa a les subfraccions d'LDL de diferent densitat, les quals van ser aïllades per ultracentrifugació en gradient de densitat. L'aïllament de l'LDL(-) per cada subfracció de densitat es va realitzar en una columna analítica mono-Q i es va avaluar el seu percentatge, obtenint-se els resultats que s'observen a la Figura 3. També es presenten els resultats de percentatge d'LDL total i LDL(-) en les subfraccions denses (LDL 4-6) a la taula annexa (Taula 2).

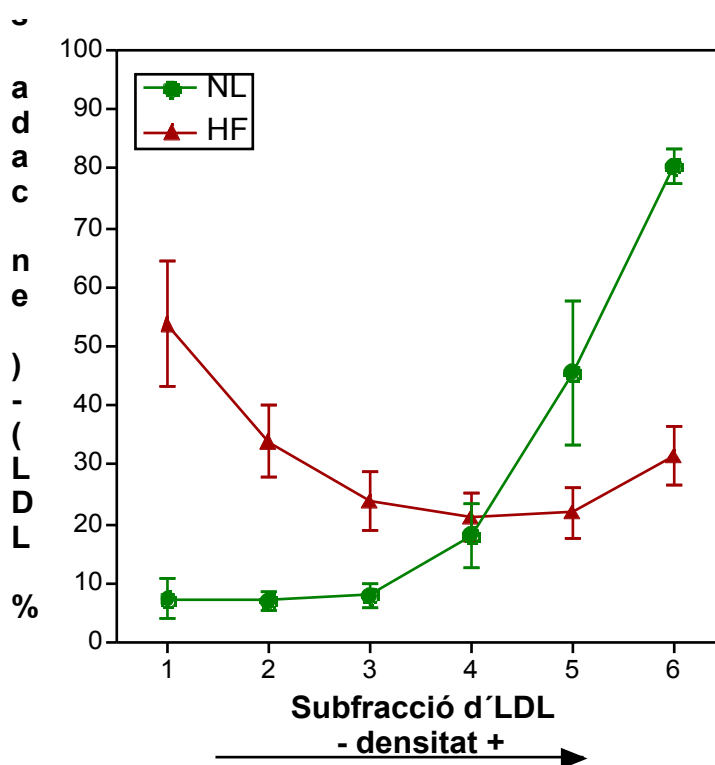


Figura 3. Distribució d'NL-LDL(-) i HF-LDL(-) a les fraccions de densitat de l'LDL.

Taula 2. Percentatge d'LDL total i LDL(-) continguda a les subfraccions denses (LDL4-6)

	NL	HF
LDL total	20.99±2.41	13.88±1.17*
LDL(-)	67.72±3.09	13.78±1.57*

* $p < 0.05$ HF vs NL.

En funció dels resultats de la Figura 3 s'observa que en els individus normolipèmics el gruix de la fracció electronegativa es distribueix a les fraccions de major densitat de l'LDL, sent el percentatge d'electronegativa en les formes més lleugeres molt inferior. Contràriament, com es pot comprovar, en els individus HF la forma electronegativa predomina en les subfraccions de menor densitat, sent molt baix el seu percentatge a les fraccions més denses. Com indica la Taula 2, tant en NL com en HF la fracció densa representa una petita fracció del total d'LDL, però, mentres que als HF també representa una petita proporció de l'LDL(-), als NL s'observa que l'LDL electronegativa és predominantment una forma densa. Per tant, segons el tipus d'individu, l'LDL(-) és heterogènia quant a densitat, sent en NL una forma més densa i, en el cas d'HF, més lleugera.

A.3 COMPOSICIÓ D'LDL(+) I LDL(-)

La composició de les fraccions d'LDL es pot observar a la Taula 3. El número d'experiments està indicat entre parèntesis i en el cas dels HF en lletra negreta i cursiva. En tots els casos les apoproteïnes l'apoCII i apoAI foren indetectables en ambues fraccions (ND).

Entre les fraccions LDL(+) i LDL(-) existeixen diferències composicionals, algunes comunes en NL i HF. Sense considerar el tipus d'individu, l'LDL(-) va presentar en tots els casos, i de forma significativa, increment en el contingut en triglicèrids, àcids grassos no esterificats (NEFA), colesterol lliure, apoproteïnes apoCIII i apoE, i àcid siàlic, i disminució en el contingut en apoB. Respecte a l'augment d'àcid siàlic, com es coneix que la apo(a), apoproteïna de l'Lp(a), es troba altament sialitzada, es va comprovar que l'increment en àcid siàlic en l'LDL(-) no fos un artefacte degut a contaminació per Lp(a). Amb aquest objectiu es va

mesurar la quantitat d'Lp(a) en les dues fraccions, que en principi ja quedava descartada pel tall de densitat emprat a l'aïllament. Es va observar que el contingut d'Lp(a), expressat com a proporció de la masa total d'LDL, va ser: LDL(+)=0.58±0.51%, NL-LDL(-)=2.10±1.48%, HF-LDL(+)= 0.46±0.36% i HF-LDL(-)=2.35±1.67%. La relevància d'aquesta lleugera contaminació d'Lp(a) sobre el contingut en siàlic es comentarà a la Discussió.

Taula 3. Composició LDL(+) i LDL(-) d'individus NL i HF.

		NL-LDL(+)	NL-LDL(-)	HF-LDL(+)	HF-LDL(-)
Components majoritaris (%) (n=51) (n=31)	CT	40.78±1.57	40.82±1.72	41.88±1.39#	42.81±1.61*#
	CE	28.96±1.80	28.58±2.00	30.11±1.36#	30.58±1.56*#
	CL	11.64±0.73	12.23±0.82*	11.78±0.51	12.22± 0.70*
	TG	6.74±1.29	7.98±2.47*	5.47±0.98#	7.47±1.44*
	FL	25.65±0.93	25.89±1.59	25.93±0.83	24.90±1.12*#
	apoB	26.84±1.47	25.28±1.99*	26.70±1.66	24.83±1.29*
Components minoritaris (mol/mol apoB) (n=43) (n=31) excepte siàlic (n=19) (n=14)	apoE	0.015±0.026	0.370±0.531*	0.013±0.020	0.158±0.171*#
	apoC-III	0.056±0.137	0.361±0.482*	0.048±0.075	0.132±0.129*#
	apoC-II	ND	ND	ND	ND
	apoA-I	ND	ND	ND	ND
	NEFA	11.71±8.60	23.21±11.77*	12.81±4.32	22.48±9.29*
	àcid siàlic	17.47±5.13	20.60±5.36*	18.13± 6.31	23.45±8.93*

* p<0.01 LDL(+) vs LDL(-) (excepte àcid siàlic p<0.03).

p<0.01 HF-LDL vs NL-LDL (excepte apoE p<0.03).

CT=colesterol total; CE=colesterol esterificat; CL=colesterol lliure; TG=triglicèrids; FL=fosfolípids; NEFA=àcids grassos no esterificats; apo=apoproteïnes.

Referent als trets diferencials entre els dos tipus d'LDL(-), l'HF-LDL(-), a més de les diferències mencionades anteriorment, també presenta un menor contingut en fosfolípids respecte l'HF-LDL(+) i major en colesterol total i esterificat. Aquestes característiques diferencials en composició de l'HF-LDL(-), a més del menor contingut en apoB, podrien estar relacionades amb el fet de que es tracta d'una forma de menor densitat.

Comparant les fraccions dels individus NL i els HF també s'observen algunes diferències estadístiques. L'LDL d'individus HF presenta més colesterol total i esterificat en ambdues fraccions respecte a les d'NL. L'HF-LDL(+) presenta menys triglicèrids que l'NL-LDL(+), i l'HF-LDL(-) conté menys fosfolípids, apoE i apoCIII que l'NL-LDL(-). Per tant, s'observen diverses diferències composicionals entre les fraccions electronegatives i les seves respectives LDL(+), i entre les fraccions provinents de subjectes NL i HF.

A.3.1 COMPOSICIÓ DE LA FRACCIÓ HF-LDL(+)BIS

A més d'avaluar la composició en les fraccions d'LDL(+) i LDL(-), també es va valorar en 9 experiments la composició de l'HF-LDL(+)bis, obtenint-se els resultats que es presenten a la Taula 4, on, per tal de no complicar la taula, només s'indiquen les diferències significatives de l'HF-LDLbis respecte les altres dues fraccions.

Taula 4. Diferències de composició d'HF-LDL(+)bis (n=9) respecte a les fraccions HF-LDL(+) i HF-LDL(-)

		HF-LDL(+)	HF-LDL(+)bis	HF-LDL(-)
Components majoritaris (%)	CT	41.88±1.39	42.74±1.11*	42.81±1.61
	CE	30.11±1.36	30.85±1.17	30.58±1.56
	CL	11.78±0.51	11.89±0.59	12.22± 0.70
	TG	5.47±0.98	5.83±1.13#	7.47±1.44
	FL	25.93±0.83	25.59±0.97*#	24.90±1.12
	apoB	26.70±1.66	26.16±1.81*#	24.83±1.29
Components minoritaris (mol/mol apoB)	apoE	0.013±0.020	0.036±0.041	0.158±0.171
	apoC-III	0.048±0.075	0.072±0.109	0.132±0.129
	apoC-II	ND	ND	ND
	apoA-I	ND	ND	ND
	NEFA	12.81±4.32	13.74±3.58#	22.48±9.29

* p<0.05 HF-LDL(+)bis vs HF-LDL(+)

p<0.05 HF-LDL(+)bis vs HF-LDL(-)

Es va verificar que l'HF-LDL(+)bis no és una fracció homogènia, presentant un contingut intermig entre les fraccions HF-LDL(+) i HF-LDL(-) en la majoria dels components lipídics i apoproteics. Comparativament, aquesta fracció presenta més diferències significatives en front la fracció electronegativa que respecte a l'HF-LDL(+), però també és diferent a aquesta en contingut de fosfolípids, colesterol total i apoB. A més, la seva migració electroforètica també va ser intermitja respecte a les altres dues fraccions (apartat A5). Com a resultat de tot això, i, ja que en NL no va aparèixer aquesta fracció, es va descartar l'HF-LDL(+)bis per a la realització dels altres estudis.

A.4 CARACTERÍSTIQUES OXIDATIVES

Com a paràmetres indicadors de l'estat oxidatiu de la partícula es van valorar els aldehids, els hidròxids i els antioxidants. Els aldehids són productes finals de la degradació dels àcids grassos poliinsaturats que es formen per fragmentació dels hidroperòxids durant l'oxidació de l'LDL, entre els quals només va ser detectable en totes les preparacions l'MDA (malondialdehid), provinent de la degradació del àcid araquidònic. En alguns experiments també es va detectar el 4-hidroxinonenal (4-HNE) però en quantitats molt baixes. Els hidròxids són els derivats estables dels hidroperòxids formats durant l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats, i s'han mesurat els derivats del linoleic (HODEs) i del araquidònic (HETEes). Els antioxidants es van valorar perquè al procés oxidatiu de l'LDL se'n produeix un consum, els principals antioxidants de l'LDL són el α -tocoferol i els carotenoids. D'altra banda, també es va avaluar la susceptibilitat a oxidació "in vitro" mitjançant la monitorització de la formació de diens conjugats. Aquests diens conjugats es formen durant l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats donant lloc a una estructura de dobles enllaços que absorbeix llum a 234 nm.

A.4.1 CONTINGUT EN ANTIOXIDANTS, HIDRÒXIDS I MDA

Els resultats de la Taula 5 mostren el contingut de les diferents fraccions en antioxidants, hidròxids i MDA, expressats com a mol/mol apoB.

Taula 5. Contingut en antioxidants, hidròxids i MDA (mol/mol apoB) en les fraccions LDL(+) i LDL(-) d'NL i HF.

		NL-LDL(+)	NL-LDL(-)	HF-LDL(+)	HF-LDL(-)
Antioxidants (n=19)(n=14)	-tocoferol	8.21±2.39	8.07±3.05	9.35±4.58	8.56±3.93
	-carotè	0.049±0.028	0.048±0.027	0.042±0.027	0.046±0.033
	-carotè	0.166±0.083	0.164±0.105	0.186±0.133	0.196±0.153
	licopè	0.24±0.14	0.28±0.19	0.44±0.35	0.42±0.32
Hidròxids (n=6)(n=6)	9-HODE	0.55±0.15	0.49±0.16	0.55±0.17	0.42±0.20
	13-HODE	0.45±0.12	0.42±0.13	0.67±0.16	0.53±0.29
	5-HETE	0.19±0.05	0.18±0.06	0.31±0.11	0.27±0.16
	8-HETE	0.15±0.04	0.14±0.04	0.23±0.07	0.19±0.10
	9-HETE	0.15±0.04	0.11±0.05	0.19±0.05	0.17±0.08
	11-HETE	0.11±0.04	0.11±0.04	0.19±0.05	0.17±0.08
	12-HETE	0.14±0.04	0.13±0.04	0.19±0.05	0.16±0.08
	15-HETE	0.11±0.04	0.11±0.04	0.19±0.05	0.16±0.08
MDA (n=6)(n=6)		2.36±0.77	2.36±1.15	2.60±1.20	2.50±1.11

Els resultats trobats en referència a les característiques oxidatives indiquen que les fraccions LDL(+) i LDL(-) no difereixen entre elles en aquest aspecte, ja que no es van observar pèrdua en el contingut d'antioxidants (-tocoferol, -carotè, -carotè i lycopè) de l'LDL(-) i tampoc van diferir quant al contingut en els diferents hidròxids o el MDA. Per tant, els resultats indiquen que es pot descartar que la fracció electronegativa sigui una forma d'LDL oxidada, al menys amb un grau d'oxidació suficient per disminuir els antioxidants o augmentar els hidròxids o el

MDA. Pel que respecta a la comparació entre individus NL i HF tampoc es va trobar cap diferència entre aquests dos grups.

A.4..2 SUSCEPTIBILITAT A L'OXIDACIÓ

Quant als assajos de susceptibilitat a oxidació (n=19), en els quals es monitoritza la formació de diens conjugats, es van valorar una sèrie de paràmetres, obtenint-se els resultats que s'exposen a la Taula 6.

Taula 6. Paràmetres indicatius de la susceptibilitat a l'oxidació en les fraccions LDL(+) i LDL(-) d'NL i HF.

	NL-LDL(+)	NL-LDL(-)	HF-LDL(+)	HF-LDL(-)
fase latència (minuts)	40.8 ± 9.5	44.8 ± 9.5*	40.9 ± 12.9	52.9 ± 13.0*
pendent (UA/min x10 ³)	17 ± 3	15 ± 3*	17 ± 3	16 ± 4
absorbància inicial (UA)	0.40 ± 0.07	0.47 ± 0.10*	0.47 ± 0.16	0.57 ± 0.20*
absorbància final (UA)	1.34 ± 0.36	1.37 ± 0.29	1.52 ± 0.34	1.68 ± 0.42* #
increment absorbància	0.94 ± 0.30	0.89 ± 0.25	1.06 ± 0.21	1.12 ± 0.21* #

* p<0.05 LDL(-) vs LDL(+)

p<0.05 HF vs NL

Els resultats en els diferents experiments, tant en el cas d'individus HF com el d'NL, coincideixen en el fet que l'LDL(-) tendeix a ser més resistent a oxidar-se, ja que presenta una major fase de latència, quedant més palès aquest fenomen en el cas dels HF. El pendent de la cinètica va ser a més, en el cas d'NL-LDL(-) significativament inferior respecte la seva fracció positiva, indicant que la partícula s'oxida més lentament. L'absorbància inicial va ser significativament superior en l'LDL(-) en front a les seves LDL(+), tant en NL com en HF. Aquesta dada podria apuntar que la fracció electronegativa podria tenir, prèviament a la inducció de l'oxidació, un petit contingut en lípids oxidats. No obstant això, pels resultats

presentats anteriorment de contingut en antioxidants, MDA i hidròxids, queda descartat que es tracti d'una forma extensament oxidada. En HF va ser major l'absorbància final i l'increment d'absorbància en l'LDL(-) respecte a la d'NL.

A la Figura 4 es mostren dos exemples representatius del tipus de cinètica obtinguda, observant-se que l'LDL(-) és més resistent a oxidar-se, sent aquest efecte més marcat en el cas dels individus HF.

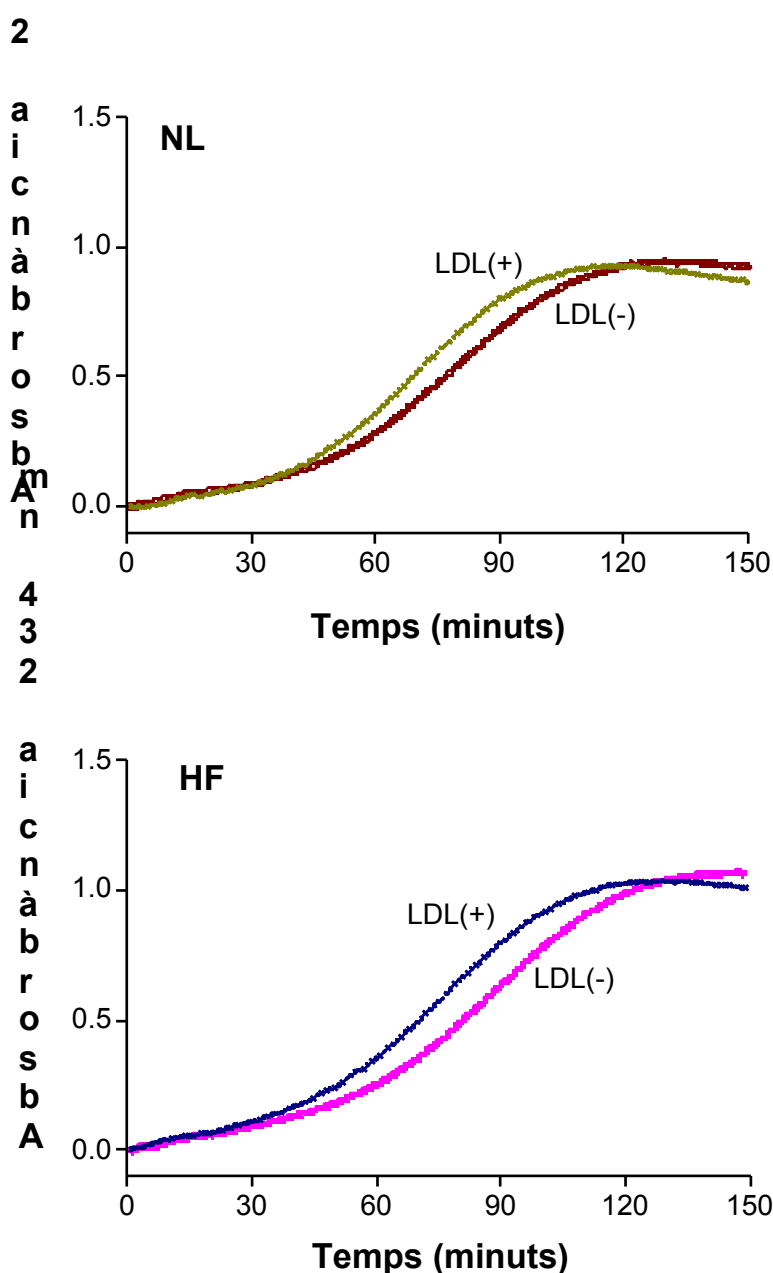


Figura 4. Cinètiques de formació de diens conjugats, després d'induir l'oxidació "in vitro" amb coure, en les fraccions LDL(+) i LDL(-) d'NL i HF.

A.5 CARACTERIZACIÓ ELECTROFORÈTICA

Per comprovar la diferent càrrega, grandària i integritat de l'apoB de les fraccions es van realitzar diferents tipus d'electroforesi, que ens aporten informació sobre les característiques de l'LDL(-) (Figures 5, 6 i 7).

Els gels de les Figura 5 estan realitzats en un suport d'agarosa. En aquest tipus de gel les partícules migren en funció de la seva càrrega elèctrica. A la Figura 5a, es pot observar que l'LDL(-) presenta una mobilitat electroforètica lleugerament major que l'LDL(+) ($R_f 1.1 \pm 0.1$, $p < 0.05$), però no tan gran com l'LDL acetilada. El resultat obtingut no varia en funció de si l'LDL ha estat aïllada d'individus HF o NL. Una mostra d'un individu HF homozigot té el mateix tipus de comportament. En el gel 5b queda representada la fracció HF-LDL(+)bis corresponent al pic cromatogràfic d'elució posterior a l'HF-LDL(+). Es pot comprovar que presenta una càrrega intermitja entre les dues fraccions pures, és a dir, és lleugerament més electronegativa que l'HF-LDL(+), però sense adquirir la mobilitat com l'HF-LDL(-).

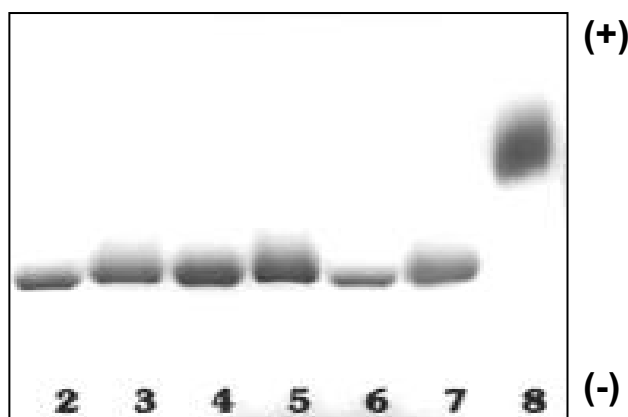


Figura 5a. Gel d'agarosa

2: NL-LDL(+)
3: NL-LDL(-)
4: HF-LDL(+)
5: HF-LDL(-)
6: homozigot HF-LDL(+)
7: homozigot HF-LDL(-)
8: LDL acetilada

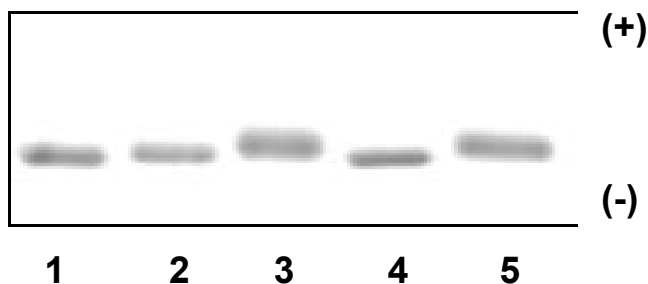
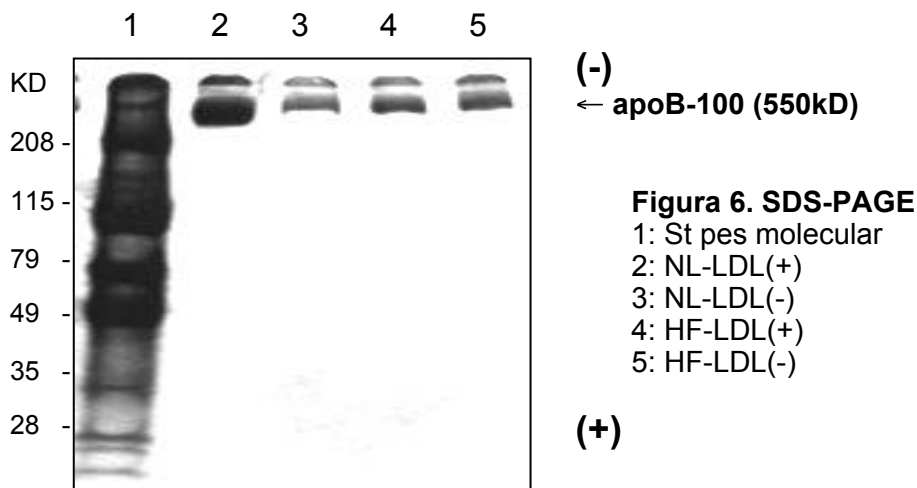


Figura 5b. Gel d'agarosa

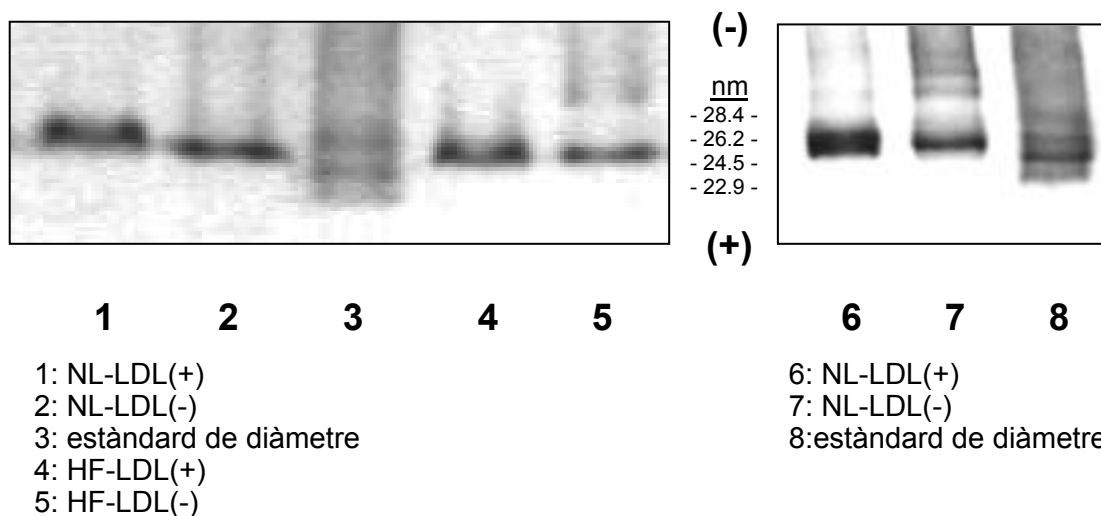
1: HF-LDL(+)
2: HF-LDL(+bis)
3: HF-LDL(-)
4: NL-LDL(+)
5: NL-LDL(-)

El gel de la Figura 6 és en suport de poliacrilamida (gradient 4-20%) amb presència d'SDS (SDS-PAGE), en el qual es pot verificar si l'apoB es troba intacta o pel contrari està degradada o fragmentada, que seria el cas de l'apoB de l'LDL oxidada. En aquest cas observem que l'apoB de l'LDL(-), al igual que l'LDL(+), presenta una única banda. Tampoc es detecta la presència de proteïnes contaminants.



Els gels de la Figura 7 són en gradient d'acrilamida (del 2-16%) en condicions no desnaturalitzants (absència d'SDS). En aquest suport les partícules migren en funció de la grandària.

Figura 7. Gel en gradient acrilamida (2-16%) no desnaturalizant



Com queda representat a la Figura 7, s'observen diferències entre NL-LDL(-) i HF-LDL(-). Es va visualitzar una migració més gran per part de l'NL-LDL(-), fet que ens indica que té lleugerament menor diàmetre que la fracció electropositiva. Aquesta menor grandària concorda amb els resultats obtinguts a l'apartat A.2 que indiquen major densitat de l'NL-LDL(-). En el cas de l'HF-LDL(-), es van observar bandes de grandària normal i la presència d'altres amb menor migració, corresponents a partícules de major diàmetre. Aquestes partícules més grans podrien correspondre a una predominància d'LDL més lleugeres en l'HF-LDL(-), com indicaven els resultats de distribució de densitat i composició. Tanmateix, aquestes bandes de major grandària podrien ser una conseqüència de la formació d'agregats en l'HF-LDL(-). Com es pot comprovar al carril 7, en alguns dels casos també es va observar en l'NL-LDL(-) un diàmetre més gran, inclús superior a 30 nm. Respecte a la presència dels agregats, això podria estar relacionat amb l'observació de que l'LDL(-), tant en el cas d'NL com d'HF, presenta una major susceptibilitat a l'agregació "in vitro" versus la fracció més positiva. Aquestes dades es mostren al següent apartat dels resultats.

A.6 SUSCEPTIBILITAT A L'AGREGACIÓ

Mesurant la susceptibilitat a l'agregació de l'LDL es pot evaluar altra característica aterogènica d'aquestes lipoproteïnes. Segons la teoria de la retenció de les lipoproteïnes, un dels primers fenòmens que succeixen a l'LDL retinguda a la íntima és l'agregació de la partícula, degut a l'acció d'agents prooxidants i agents hidrolítics. A més, l'LDL agregada té la capacitat de induir l'acumulació de colesterol esterificat en els macròfags i SMC, afavorint la formació de cèl·lules espumoses. En aquest procés sembla ser que intervenen mecanismes de fagocitosi i és independent de la unió a receptors scavenger.

En un total de 6 experiments de cada tipus d'individus sempre es va observar que l'LDL(-) era més susceptible a agregar-se "in vitro" que l'LDL(+), independentment de si l'origen d'aquesta LDL són individus HF o NL. En el cas d'HF es van obtenir valors d'absorbància superiors que en NL per ambdues fraccions, indicant que la seva LDL s'agrega amb més facilitat. Aquests resultats queden reflectits a la Figura 8 en què es representa la mitjana d'aquests experiments.

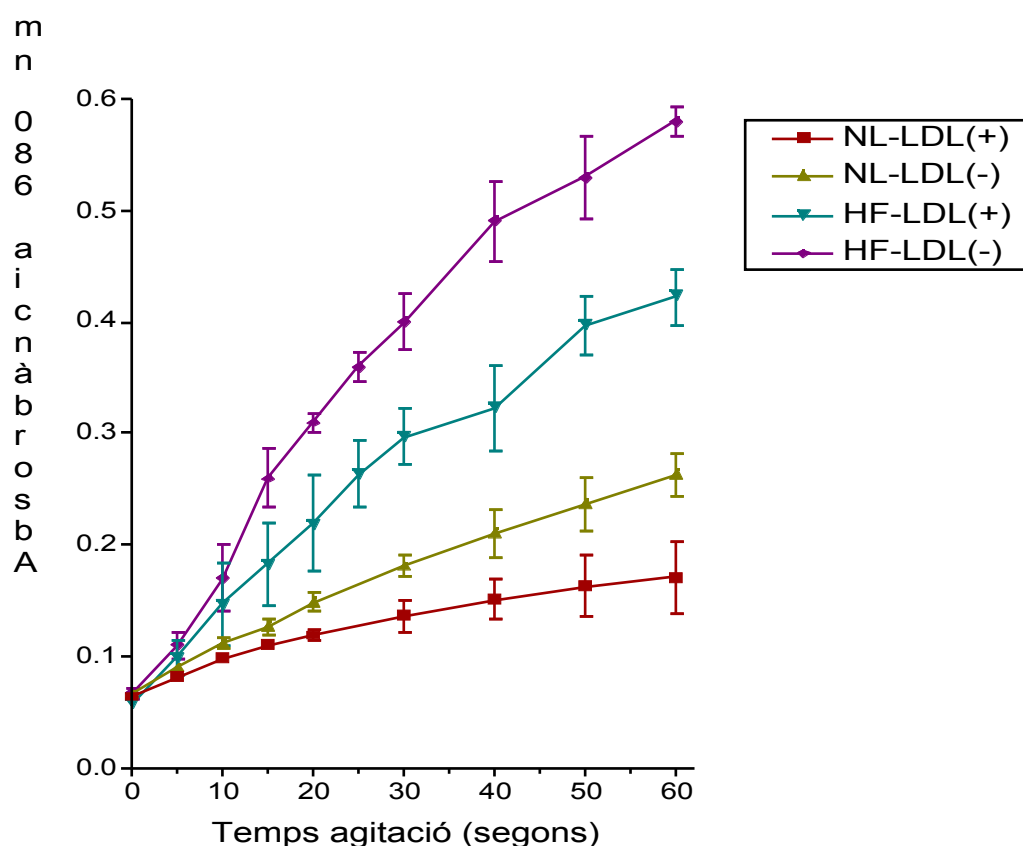


Figura 8. Susceptibilitat a l'agregació induïda per agitació amb vòrtex a temps creixents i mesurada com a absorbància a 680 nm. Les diferències entre LDL(+) i la seva corresponent LDL(-) són significatives ($p < 0.05$) en tots els punts a partir dels 10 segons d'agitació. Les diferències entre NL i HF són significatives ($p < 0.05$) en tots els punts a partir dels 15 segons d'agitació.

B - INTERACCIÓ AMB ELS RECEPTORS CEL·LULARS

Està ben determinat que la càrrega de l'LDL té una gran influència en la interacció amb els receptors cel·lulars, ja que modificacions com oxidació, glicació o acetilació, indueixen una acumulació d'ésters de colesterol intracel·lular, provocant la formació de cèl·lules espumoses, degut a que són capaces d'interaccionar amb el SR. Degut a això es va avaluar el comportament de l'LDL(-) en aquest aspecte mitjançant l'acumulació d'ésters de colesterol en macròfags.

D'altra banda, està descrit que les modificacions de l'LDL que augmenten la càrrega elèctrica negativa de la partícula, alteren la unió al receptor disminuint-la. Com l'LDL(-) presenta una major càrrega electronegativa, això podria afectar a la seva unió al rLDL, fet que tindria com a efecte un aclariment menys eficaç de la partícula. Per aquest motiu es va avaluar l'afinitat pel rLDL mitjançant estudis de saturació i de desplaçament de la unió en fibroblasts.

D'altra banda, les formes modificades d'LDL que presenten augmentada la càrrega negativa

B.1 INDUCCIÓ D'ACUMULACIÓ DE COLESTEROL ESTERIFICAT EN MACRÒFAGS

Per estudiar la interacció amb el receptor scavenger de macròfags (línia P388D₁) es va avaluar l'acumulació en ésters de colesterol induïda després de la incubació durant 72 hores amb les dues fraccions, LDL(+) i LDL(-). A més, es va comprovar que el fet d'incubar 72 hores amb les fraccions d'LDL no induïu citotoxicitat als macròfags, per mitjà del test de la LDH. Es va verificar que la viabilitat cel·lular va ser superior al 90% en tots els experiments, comparant respecte les cèl·lules que no havien estat incubades amb LDL.

Com a control positiu en aquests experiments es va triar l'LDL acetilada, la qual es coneix que és internalitzada a través del receptor scavenger i indueix la acumulació d'ésters de colesterol (Goldstein 1979).

Els resultats obtinguts es presenten en la Figura 9 on es pot comprovar que no existeixen diferències entre LDL(+) i LDL(-) ni entre el tipus d'individu en la acumulació en ésters de colesterol. En conseqüència d'aquesta absència de diferències entre ambdues fraccions, d'NL i HF, es pot concloure que aquestes formes més electronegatives no estan prou modificades com per ser internalitzades pel receptor scavenger de macròfags. En canvi, l'LDL acetilada, com és captada a través del SR, fa que s'acumulin intracel.lularment ésters de colesterol de manera eficaç, de l'ordre de 6 vegades més que la forma nativa.

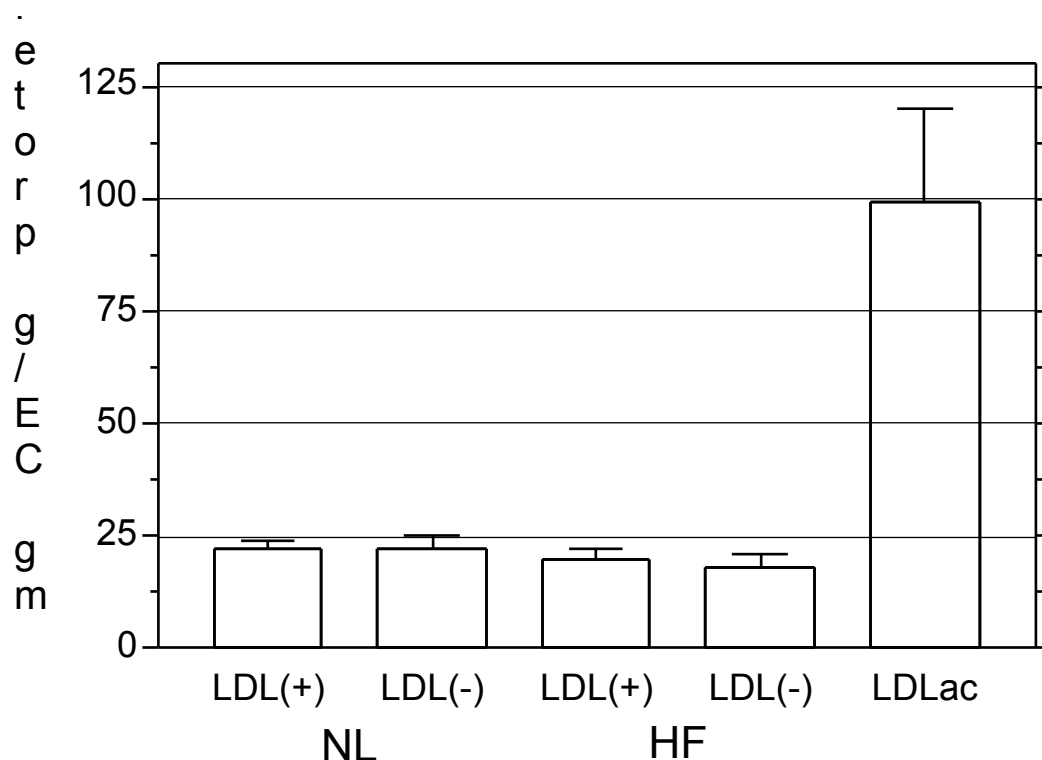


Figura 9. Inducció de l'acumulació d'EC en macròfags P388D1 amb 25 mg/L apoB d'LDL(+) i LDL(-) d'NL i HF (n=5).

B.2 INTERACCIÓ AMB EL rLDL.

B.2.1 MARCATGE DE LES FRACCIONS AMB Dil

Els estudis d'interacció de les fraccions amb el receptor d'LDL, tant els de saturació com els de desplaçament de la unió, es van evaluar en fibroblasts amb LDL marcada fluorescentement amb Dil, seguint el procediment de Stephan i Yurachek (Stephan 1993).

En els estudis de saturació es van marcar les diferents fraccions d'LDL amb el compost fluorescent Dil. En canvi, en els experiments de desplaçament es va marcar l'LDL total bé d'NL o d'HF. En tots els casos es va comprovar que el marcatge no afectés a les característiques fisico-químiques de les partícules, mitjançant electroforesi en gel d'agarosa-acrilamida, en el qual la migració és en funció de la càrrega elèctrica i de la grandària. En la Figura 10 es mostra un gel representatiu, en què es presenten les fraccions NL-LDL(+) i NL-LDL(-) prèvia i posteriorment al marcatge.

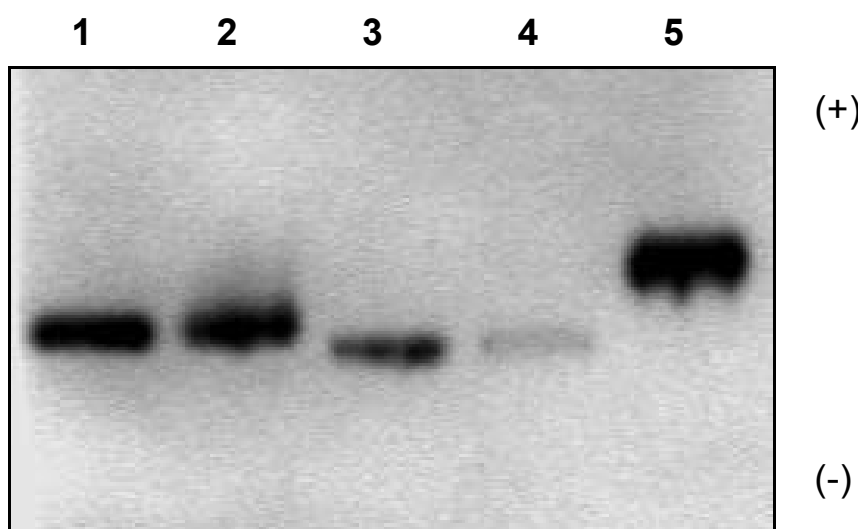


Figura 10. Gel en agarosa-acrilamida

1: NL-LDL(+)
2: NL-LDL(-)
3: Dil-NL-LDL(+)
4: Dil-NL-LDL(-)
5: LDL oxidada

S'observa que abans del marcatge, l'LDL(-) presenta una mobilitat lleugerament superior a l'LDL(+). Les mobilitats no s'alteren posteriorment al marcatge i la diferent migració de les fraccions es manté. Tampoc va resultar afectada la migració electroforètica deguda a la incorporació de Dil ni al cas de les fraccions d'HF, ni al de l'LDL total d'NL i HF. Això indica que no es modifiquen les característiques fisico-químiques, com ara tamany, l'agregació o càrrega elèctrica de la partícula pel marcatge fluorescent.

D'altra banda, en cadascun dels experiments es va calcular l'activitat específica del marcatge, a partir de la mesura de fluorescència d'una recta patró de diferents concentracions de Dil-LDL i de la d'una recta patró amb el marcador fluorescent Dil, com s'ha explicat a Material i Mètodes. Els resultats obtinguts són comparables als del treball d'Stephan i Yurachek (Stephan 1993). En la taula següent (Taula 7) s'expressa la mitjana de les activitats específiques de tots els experiments, tant dels de saturació com dels de desplaçament.

Taula 7. Activitat específica del marcatge fluorescent (mg Dil/g Dil-LDL) dels experiments de saturació i desplaçament de l'LDL total i fraccions.

experiments de saturació	activitat específica (mg Dil/g Dil-LDL)
NL-LDL(+)	49.98 ± 3.83
NL-LDL(-)	32.43 ± 7.67
HF-LDL(+)	52.84 ± 7.98
HF-LDL(-)	45.95 ± 12.72
experiments de desplaçament	activitat específica (mg Dil/g Dil-LDL)
NL-LDL total	44.81 ± 11.45
HF-LDL total	53.96 ± 12.23

B.2.2 CINÈTIQUES DE SATURACIÓ

Un cop comprovat que el marcatge havia estat eficient, es va procedir a realitzar els estudis de cinètica de saturació amb NL-LDL(+) i NL-LDL(-) per una banda (n=4) i amb HF-LDL(+) i HF-LDL(-) per una altra (n=4).

L'objectiu dels experiments va ser la de avaluar l'afinitat pel rLDL, determinant la constant d'afinitat (K_D) de les diferents fraccions. Per assolir aquesta finalitat, a partir de la unió específica es va realitzar la representació de Scatchard, mitjançant aquesta linearització es va calcular la K_D com a mesura de l'afinitat i la B_{max} que és un paràmetre indicador de la unió màxima. El valor de K_D ve determinat per l'invers de la pendent de la representació d'Scatchard. La B_{max} ve donada pel punt de tall a l'eix de les X, o també es pot calcular com $K_D \times B/F$. A partir de la B_{max} , considerant el número d'Avogadro per calcular el número de partícules d'LDL totals unides, i el número de cèl.lules a cada pou, es pot calcular el número de llocs d'unió per cèl.lula o número de receptors. En el nostre cas el número de receptors va oscil.lar entre 85000 i 130000 que és de l'ordre dels valors trobats a la literatura (Myant 1983).

A la Figura 11 es mostra una cinètica de saturació representativa de les fraccions LDL(+) i LDL(-) en NL i a la Figura 12 una cinètica de les fraccions d'HF. A les figures es representa la unió total que es va obtenir amb concentracions creixents de $Dil-NL-LDL(+)$ i $Dil-NL-LDL(-)$, la unió inespecífica en què s'afegeix a més 10 vegades d'excés de la mateixa LDL sense marcar, i la unió específica valorada com la resta de la total menys la inespecífica. A partir de la unió específica es va realitzar la representació de Scatchard (al costat dret de la cinètica). A la Taula 8 es mostren les mitjanes dels resultats obtinguts a partir de la linearització de Scatchard de cadascuna de les cinètiques de saturació.

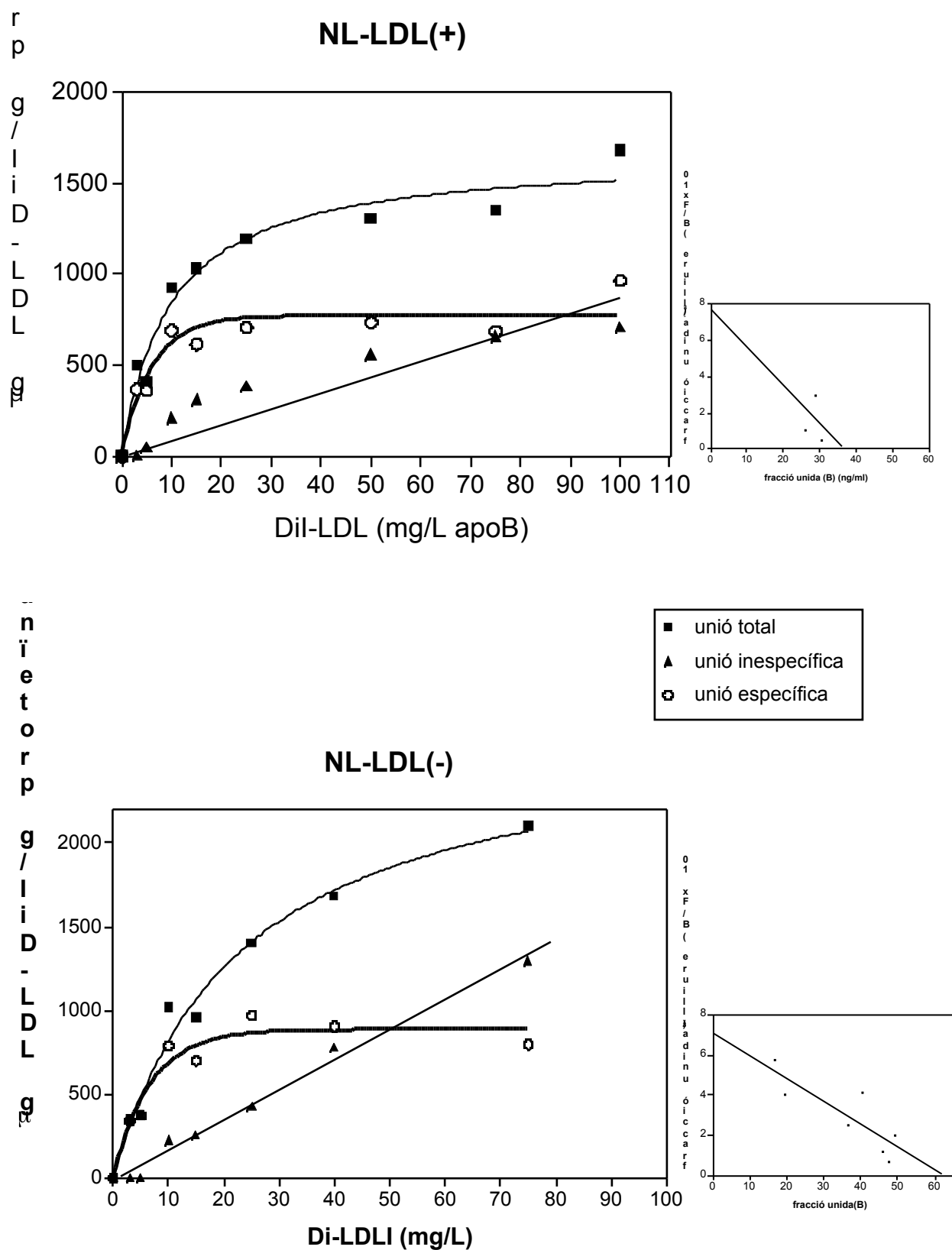


Figura 11. Cinètica de saturació de la unió d'NL-LDL(+) i NL-LDL(-) al rLDL de fibroblasts. A partir de la unió específica es va obtenir la linearització de Scatchard

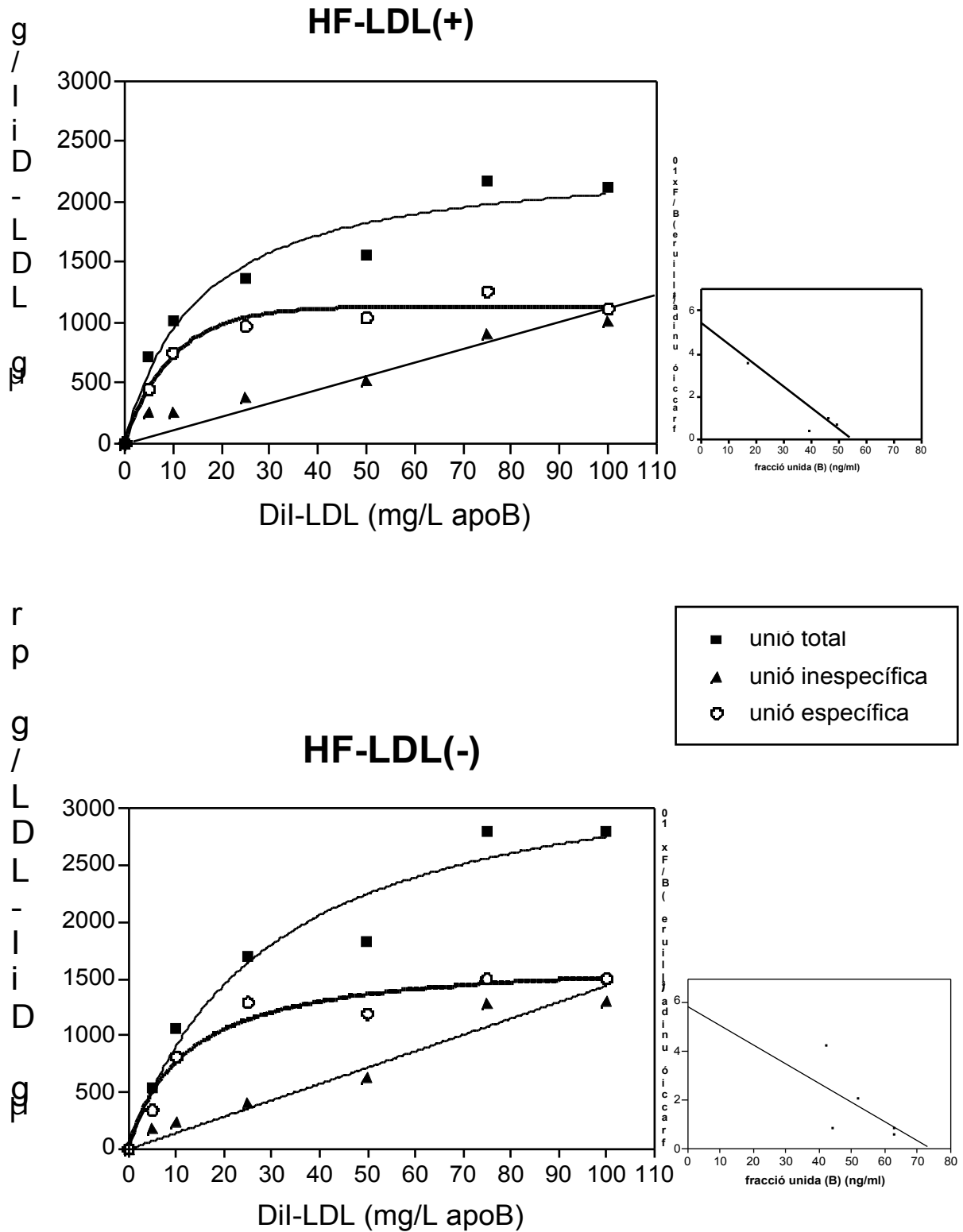


Figura 12. Cinètica de saturació de la unió d'HF-LDL(+) i HF-LDL(-) al rLDL de fibroblasts. A partir de la unió específica es va obtenir la linearització de Scatchard.

Taula 8. Valors de Bmax i K_D d'LDL(+) i LDL(-) d'individus NL i HF obtinguts a partir dels estudis de cinètica de saturació de la unió (n=4).

	Bmax (pM)	K_D (nM)	intervalos valors K_D
NL-LDL(+)	50.55 ± 19.09	10.88 ± 5.72	5.16 - 16.6
NL-LDL(-)	76.29 ± 52.10	32.99 ± 21.40*	11.59 - 54.39
HF-LDL(+)	55.45 ± 35.14	16.65 ± 7.02#	9.63 - 23.67
HF-LDL(-)	76.88 ± 56.4	24.37 ± 7.12*	17.17 - 31.49

* p < 0.11 per HF-LDL(-) i p < 0.07 NL-LDL(-) vs NL-LDL(+).

p < 0.11 HF-LDL(+) vs NL-LDL(+)

El valor de K_D per l'NL-LDL(+) coincideix amb el descrit a la literatura (Innerarity 1986, Agnani 1991, Nigon 1991). Es pot observar que la K_D de l'NL-LDL(-) és significativament major, aproximadament tres vegades, indicant que la partícula presenta una afinitat disminuïda pel rLDL. Malgrat la desviació en els valors, en tots els experiments l'NL-LDL(-) va resultar menys afí que la fracció positiva.

La K_D de l'HF-LDL(-) va resultar en tots els experiments major que la d'HF-LDL(+), malgrat que la diferència no és tan patent com al cas d'NL, 1.5 vegades, però indicant que la forma electronegativa també presenta una afinitat lleugerament disminuïda pel rLDL en front a l'HF-LDL(+).

Comparant els valors entre NL i HF es va observar que el valor de K_D per l'HF-LDL(+) és superior al descrit a la literatura per l'LDL nativa, i també 1.5 vegades superior al trobat per l'NL-LDL(+) en aquests experiments. Aquest valor lleugerament augmentat de K_D per part de l'HF-LDL(+) indicaria que presenta menor afinitat que la d'NL. En canvi, l'HF-LDL(-) va presentar una K_D similar a la d'NL-LDL.

Quant a la Bmax els valors van ser molt semblants entre NL i HF, indicant que no existeixen grans diferències en el número de receptors. En ambdós casos

es va obtenir que la Bmax es troba augmentada en l'LDL(-), malgrat que no és una diferència significativa, probablement degut a la dispersió dels valors. De totes maneres, aquesta tendència suggereix que l'LDL(-) es podria unir a llocs d'unió diferents del rLDL. Aquests altres llocs d'unió podrien ser altres receptors amb una afinitat més baixa que el rLDL, ja que la KD de l'LDL(-) és superior. Altra possibilitat és que sigui una conseqüència d'unió inespecífica per part de l'LDL(-) a la membrana citoplasmàtica.

B.2.3 ESTUDIS DE DESPLAÇAMENT

B.2.3.a Desplaçament de Dil-NL-LDL i Dil-HF-LDL per part de les seves respectives fraccions LDL(+) i LDL(-) i formes modificades

Per ratificar els resultats de la cinètica de saturació, es van realitzar una sèrie d'estudis de desplaçament de la unió de l'LDL total marcada amb Dil (n=6), a una concentració de 25 mg/L apoB, per mitjà de la addició de concentracions creixents d'LDL(+), LDL(-), LDL oxidada i LDL acetilada sense marcar. En els experiments autòlegs es van obtenir els resultats que es presenten en la Figura 13a i 13b. La Figura 13a és la representació de la mitjana de 6 estudis en què es va marcar l'LDL total d'NL i es va desplaçar amb NL-LDL(+) i NL-LDL(-), i la 13b la representació dels experiments (n=6) en què es marcava LDL total d'HF i es desplaçava amb HF-LDL(+) i HF-LDL(-).

A partir de les dades obtingudes de cada experiment individual es va obtenir la IC50, i a través d'aquest valor i de la KD obtinguda als experiments de saturació, es va calcular per l'equació de Cheng-Prusoff la Ki (constant d'inhibició) que és una mesura d'afinitat equivalent a una KD aparent. Les mitjanes dels valors es presenten a la Taula 9.

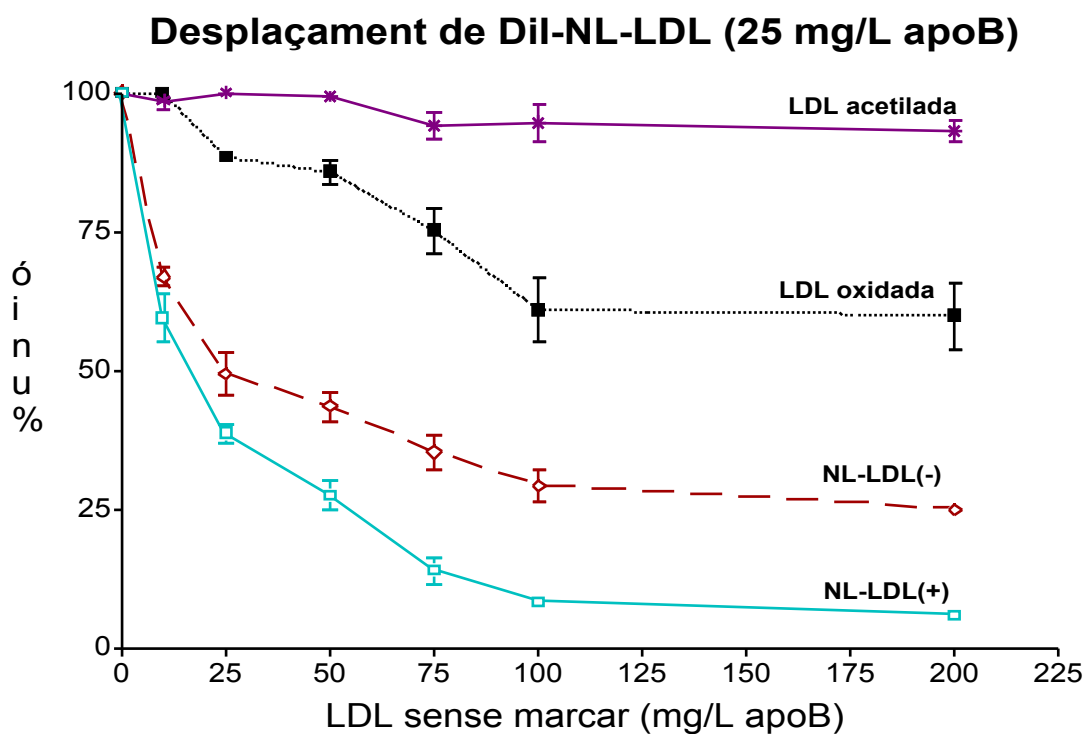


Figura 13a. Estudis de desplaçament de la unió realitzats amb una concentració fixa (25mg/L apoB) d'LDL total d'NL marcada amb Dil (Dil-NL-LDL) i desplaçant amb concentracions creixents d'NL-LDL(+), NL-LDL(-) i LDLs modificades.

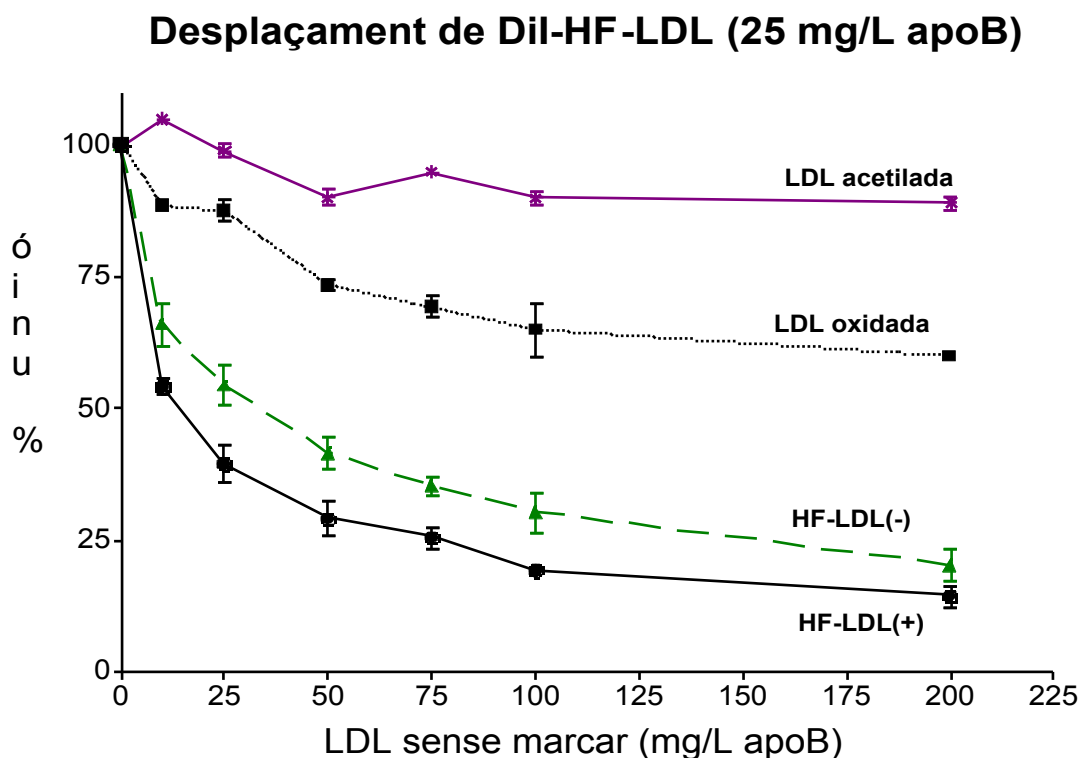


Figura 13b. Estudis de desplaçament de la unió realitzats amb una concentració fixa (25 mg/L apoB) d'LDL total d'HF marcada amb Dil (Dil-HF-LDL) i desplaçant amb concentracions creixents d'HF-LDL(+), HF-LDL(-) i formes modificades.

Taula 9. Valors de Ki i IC50 obtinguts a partir dels experiments de desplaçament (n=6)

Lligand	Desplaçador	IC50 (mg/L apoB)	Ki (nM)	intervals valors Ki
Dil-NL-LDL	NL-LDL(+)	17.3 ± 2.12	5.15 ± 0.64	4.51 - 5.79
	NL-LDL(-)	32.1 ± 10.97*	18.24 ± 6.23*	12.04 - 24.47
Dil-HF-LDL	HF-LDL(+)	19.7 ± 5.35	7.86 ± 2.14	5.72 - 10
	HF-LDL(-)	32.2 ± 12.9*	15.93 ±	12.63 - 22.88
		6.38*		

* p<0.05 LDL(-) vs LDL(+).

En aquests estudis de desplaçament es va fer servir LDL acetilada i LDL oxidada com a control, ja que, al tenir modificades les lisines responsables de la unió, es produeix una pèrdua d'afinitat pel rLDL. Per tant, s'observà una molt baixa eficàcia de l'LDL acetilada per desplaçar la unió de l'LDL-Dil amb el receptor, sense arribar a desplaçar més d'un 10% a cap de les concentracions. L'LDL oxidada també presentà una menor capacitat per desplaçar la unió, no tan disminuïda com al cas de l'acetilació però força inferior comparant amb LDL(-).

Quant als resultats amb NL es va observar una diferent afinitat pel rLDL per part d'NL-LDL(+) i NL-LDL(-), ja que la fracció electronegativa presentà una menor capacitat per desplaçar la unió de l'LDL marcada (p<0.05). Com a conseqüència, la IC50 va ser major, i també la Ki que és de l'ordre de 3.5 vegades superior respecte a l'NL-LDL(+). Aquesta diferència entre Ki d'NL-LDL(-) i NL-LDL coincidí amb la trobada en la KD als estudis de saturació, corroborant doncs el fet que l'NL-LDL(-) té disminuïda l'afinitat pel rLDL, respecte l'NL-LDL(+).

En els experiments realitzats marcant l'LDL total d'HF, també s'observà una diferent afinitat pel rLDL per part d'HF-LDL(+) i HF-LDL(-). Els resultats van en el mateix sentit que en NL, però les diferències de Ki entre les fraccions van ser menys marcades malgrat que els valors en IC50 són molt similars als obtinguts en

NL. Això va ser degut als resultats de KD obtinguts als estudis de saturació necessaris per al càlcul de K_i . De totes maneres, la K_i d'HF-LDL(-) va ser significativament major, aproximadament 2 vegades, respecte l'HF-LDL(+). Per tant, la fracció electronegativa presenta una menor capacitat per desplaçar la unió de l'LDL marcada. Aquests resultats corroboren els obtinguts a partir de la cinètica de saturació, però obtenint-se en aquest cas més divergència entre l'afinitat d'HF-LDL(-) i HF-LDL(+), ja que, la forma electronegativa presenta el doble de valor de K_i que l'HF-LDL(+). En conclusió, tant en els estudis de saturació com en els de desplaçament es va observar una menor afinitat de l'LDL(-) en front LDL(+).

D'altra banda, comparant entre ambdós tipus d'individu, les diferències de K_i (1.5 vegades) coincideixen amb les observades a les cinètiques de saturació. Tanmateix, el valor d'IC₅₀ és molt similar, degut a la influència de la KD en el càlcul de K_i segons l'equació de Cheng-Prusoff. Per confirmar la menor afinitat de HF-LDL(+) pel rLDL es van realitzar una sèrie d'experiments creuats que es detallen a continuació.

B.2.3.b Desplaçaments creuats

Es van realitzar estudis de desplaçament creuat, marcant LDL total d'HF i desplaçant amb concentracions creixents de NL-LDL(+) i NL-LDL(-) i marcant LDL total d'NL i desplaçant amb HF-LDL(+) i HF-LDL(-). A les Figures 14a i 14b es presenten les mitjanes dels experiments, en ambdós casos $n=6$, afegint els valors obtinguts a l'apartat anterior (en línia menys marcada) per comparar entre les dues condicions i l'LDL acetilada com a control negatiu. Els valors mitjans, a partir dels valors de IC₅₀ i K_i de cadascú d'aquests experiments, queden reflexats a la Taula 10 en lletra negreta, on a més també es presenten els resultats de B.2.3.a, en lletra menys marcada, per contrastar.

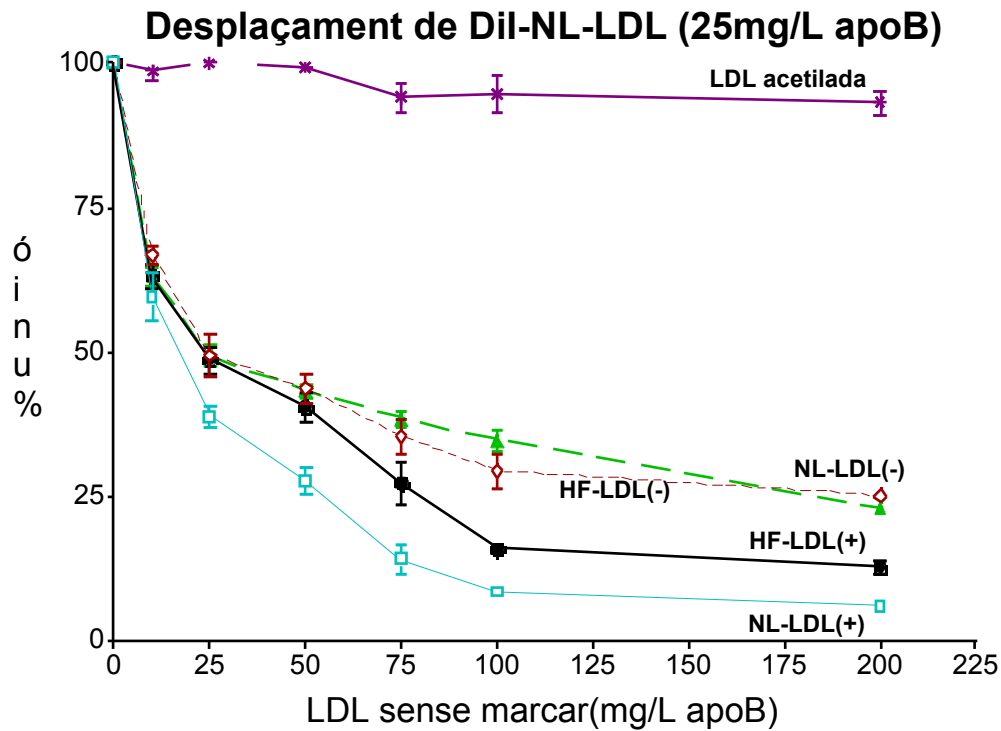


Figura 14a. Estudis de desplaçament de la unió realitzats amb concentració fixa (25 mg/L apoB) d'LDL total d'NL marcada amb Dil (Dil-NL-LDL) i desplaçant amb concentracions creixents d'HF-LDL(+), HF-LDL(-) i LDL acetilada.

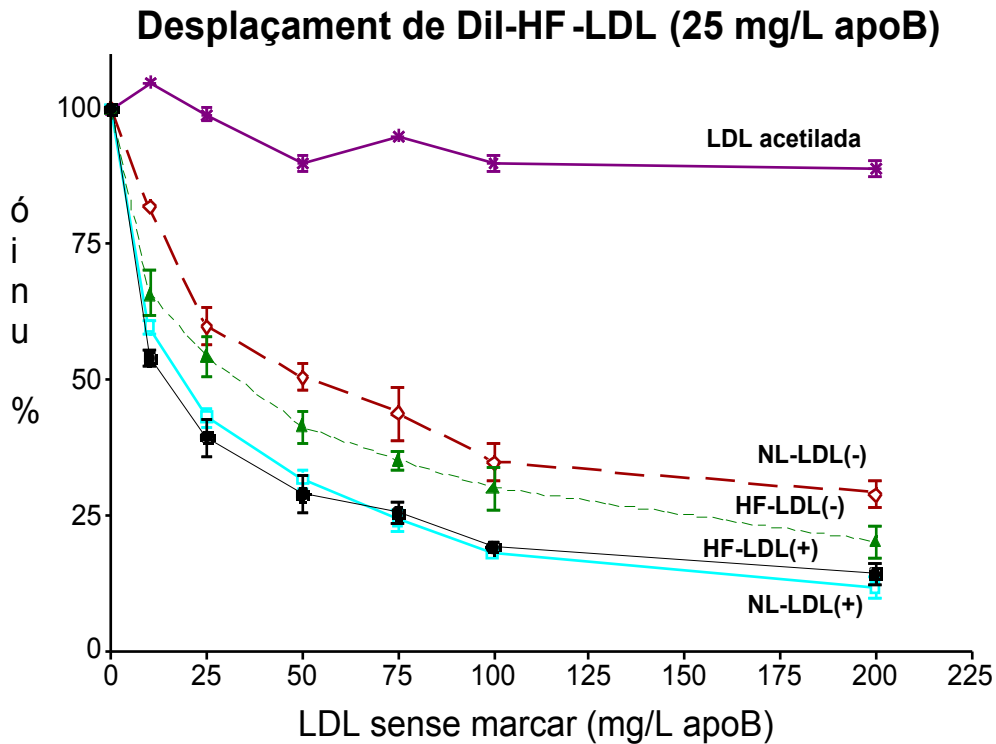


Figura 14b. Estudis de desplaçament de la unió amb concentració fixa (25mg/L apoB) d'LDL total d'HF marcada amb Dil (Dil-HF-LDL) i desplaçant amb concentracions creixents d'NL-LDL(+), NL-LDL(-) i LDL acetilada.

Taula 10. Valors de Ki i IC₅₀ calculats a partir dels experiments de desplaçament creuats, comparant amb els dels desplaçament autòlegs (n=6).

Lligand	Desplaçador	IC ₅₀ (mg/L apoB)	Ki (nM)	intervalos valors Ki
DiI-NL-LDL	HF-LDL(+)	24.51 ± 10.07	9.80 ± 4.83	4.97 - 14.63
	HF-LDL(-)	26.2 ± 8.86	12.93 ± 4.38	8.55 - 17.31
	NL-LDL(+)	17.0 ± 2.12	5.15 ± 0.64	4.51 - 5.79
	NL-LDL(-)	32.1 ± 10.97*	18.24 ± 6.23*	12.04 - 24.47
DiI-HF-LDL	NL-LDL(+)	20.75 ± 3.77	6.3 ± 1.14	5.16 - 7.44
	NL-LDL(-)	46.25 ± 14.93*	26.27 ± 8.48*	17.80 - 34.75
	HF-LDL(+)	19.67 ± 5.35	7.86 ± 2.14	5.72 - 10
	HF-LDL(-)	32.17 ± 12.88*	15.93 ± 6.38*	12.63 - 22.88

* p<0.07 en els experiments creuats i p<0.05 en els autòlegs LDL(-) vs LDL(+)

Es comprova pels resultats que les NL-LDL(+) i NL-LDL(-) tenen pràcticament la mateixa capacitat per desplaçar LDL dels dos tipus d'individus i en les dues condicions es coincideix en l'afinitat disminuïda de l'NL-LDL(-), sent la Ki entre 3.5-4 vegades superior a la de l'NL-LDL(+).

Com s'observa a la Taula 10, en els experiments en què es desplaçava amb concentracions creixents d'HF-LDL(+) i HF-LDL(-) els resultats són diferents depenent de quina fos l'LDL marcada a desplaçar, sent la Ki de l'HF-LDL(-) 2 o 1.31 vegades superior al de l'HF-LDL(+) segons si el desplaçament era autòleg o heteròleg. En els experiments en què es desplaçava la unió de l'LDL d'NL (DiI-NL-LDL) no s'observava una disminució marcada en l'afinitat per part de la fracció HF-LDL(-), ja que aquesta presentava IC₅₀ del mateix ordre que la de l'HF-LDL(+). Les dades de les cinètiques de saturació indicaven que l'NL-LDL(+) presentava una major unió al rLDL que l'HF-LDL(+), i en conseqüència es pot deduir que aquesta última no és tan eficaç per desplaçar la unió, minvant les diferències en afinitat entre HF-LDL(+) i HF-LDL(-).

C- ESTUDIS D'INCUBACIÓ DE L'LDL AMB ACIDS GRASSOS "IN VITRO". COMPARACIÓ AMB LDL(-).

Prèviament, als resultats de composició, hem observat que una de les característiques més marcades que l'LDL(-) presenta és un guany en el contingut en NEFA respecte a la fracció electropositiva, de l'ordre del doble, tant en individus NL com HF. A més, està descrit que l'enriquiment en NEFA proporciona càrrega electronegativa a la partícula (Shafir 1958, Chung 1995). Per tant, per discernir si la càrrega en NEFA de l'LDL podria ser una possible causa de l'origen de l'LDL(-), es van desenvolupar estudis d'incubació "in vitro" d'LDL, provinent d'NL, amb àcids grassos, amb l'objectiu d'aconseguir LDL enriquida en NEFA (LDL-NEFA). També per analitzar l'efecte dels diferents àcids grassos, es van realitzar incubacions de l'LDL amb àcid palmític, oleic i linoleic per separat. Posteriorment, es va evaluar aquesta LDL-NEFA en diferents aspectes per comprovar si presenta característiques similars a l'LDL(-).

Per caracteritzar aquestes partícules es va valorar, posteriorment a la incubació amb NEFA, la seva composició, càrrega elèctrica mitjançant electroforesi en agarosa, susceptibilitat a l'oxidació i percentatge d'LDL(-) per cromatografia de bescanvi aniònic en columna monoQ. En una altra tanda d'experiments, es va repetir el procediment de càrrega amb la barreja fisiològica de NEFA i es va estudiar l'efecte d'aquestes partícules sobre la interacció amb els receptors cel·lulars, concretament amb el rLDL de fibroblasts, per mitjà d'estudis de desplaçament de la unió, i amb el SRAII de macròfags, avaluant l'acumulació de colesterol esterificat.

C.1 CARACTERÍSTIQUES FÍSICO-QUÍMIQUES

A continuació s'exposen els resultats obtinguts en l'avaluació de les propietats físico-químiques incubant amb la barreja d'àcids grassos (Figures 15, 16, 17 i 18).

Taula 11. Càrrega en NEFA de les LDL-NEFA

NEFA incubació (mM)	mol NEFA/mol apoB
0	7.6±3.7
0.25	20.9±4.8
0.5	31.8±7.7
1	139.6±58.4
2	322.0±59.5

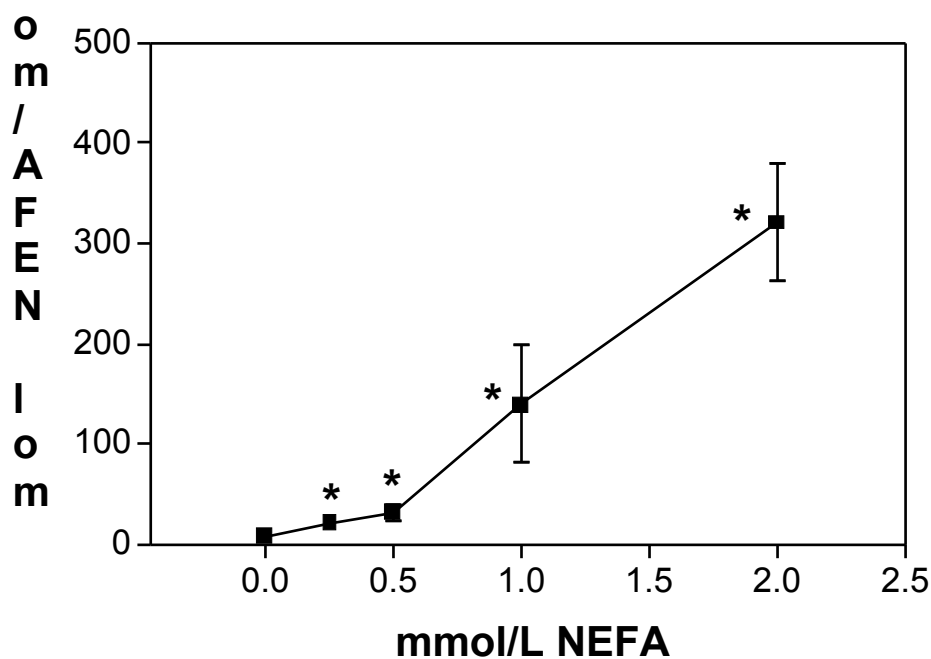


Figura 15. Valoració del guany en el contingut de NEFA de l'LDL (mol NEFA/mol apoB) després de ser incubada amb concentracions creixents de la barreja de NEFA. *p<0.05 vs NEFA 0 mM.

Primerament es va determinar la composició de les LDL-NEFA i així es va poder avaluar en quin grau s'havien carregat les LDL amb NEFA, i si el fet d'enriquir-se en NEFA podia modificar la composició de l'LDL. No van haver-hi diferències significatives en la composició lipídica de la partícula, excepte, com s'observa a la Taula 11 i a la Figura 15, en la quantitat de NEFA, aspecte en què es va observar un augment dosi-depenent. Incubant amb 0.25 mM i 0.5 mM de la barreja s'assolien nivells semblants de NEFA als que es troben en l'LDL(-), mentre que, amb la concentració de 1 o 2 mM s'obtenia una LDL altament carregada en NEFA, per damunt del que es podria considerar una concentració fisiològica. El blanc d'LDL sense incubar amb àcids grassos tenia un contingut en NEFA del mateix nivell que una LDL nativa.

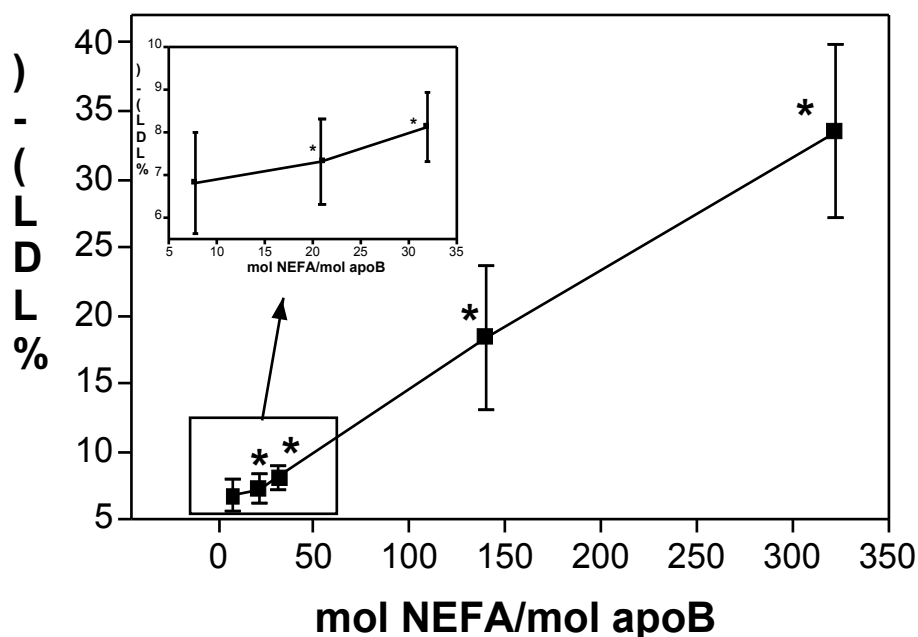


Figura 16. Percentatge d'LDL(-) per cromatografia de bescanvi aniónic segons la càrrega en NEFA de l'LDL-NEFA. * $p < 0.05$ vs NEFA 0 mM.

Respecte al guany d'electronegativitat, es va observar que en la proporció d'LDL(-), mesurada per cromatografia de bescanvi aniónic en columna analítica mono-Q, es van apreciar diferències inclús amb una càrrega en NEFA lleugerament

superior al de l'LDL nativa (Figura 16). L'augment en el percentatge d'LDL(-) va ser progressiu amb l'increment del contingut en NEFA. Cal recordar, però que, aproximadament, les concentracions superiors a 50-100 mol NEFA/mol apoB no es poden considerar com a fisiològiques.

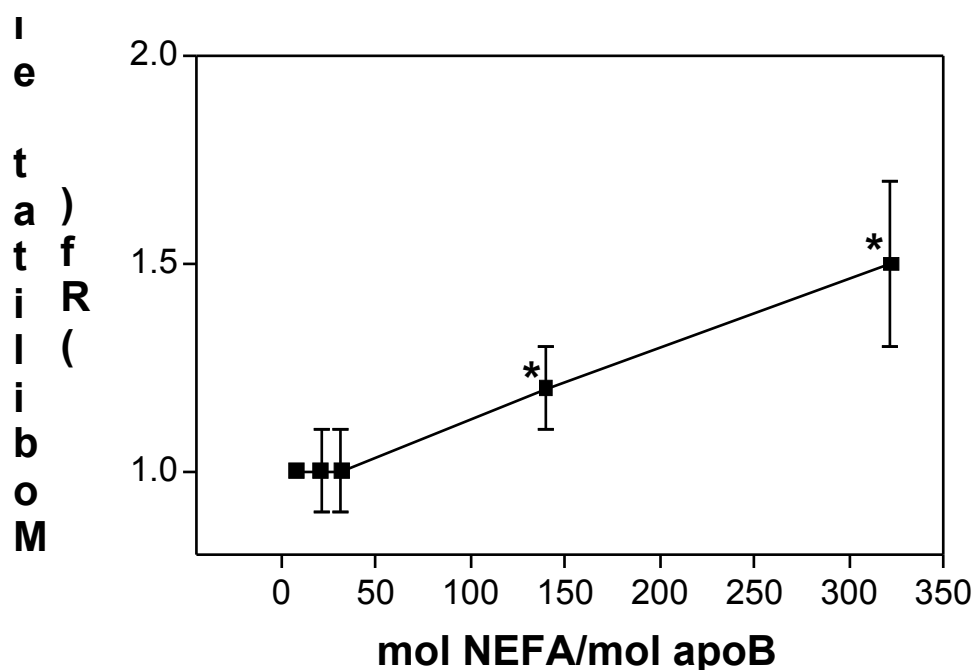


Figura 17. Mobilitat electroforètica en agarosa en funció de la càrrega en NEFA de l'LDL-NEFA. *p<0.05 vs NEFA 0 mM.

Per electroforesi en agarosa es va observar un lleuger augment en la mobilitat electroforètica, però tan sols a partir de que l'LDL adquirí un cert contingut en NEFA, que estaria per sobre del rang que es pot considerar com a fisiològic, és a dir, superior a 50 mol NEFA/mol apoB. Tanmateix, com no s'observen diferències en mobilitat electroforètica en gel d'agarosa (Figura 17) per les concentracions baixes de NEFA, es pot afirmar que la mesura d'LDL(-) és una avaluació més acurada i adient pels nostres objectius, ja que és més sensible a l'increment de la càrrega negativa induïda pel guany en el contingut de NEFA.

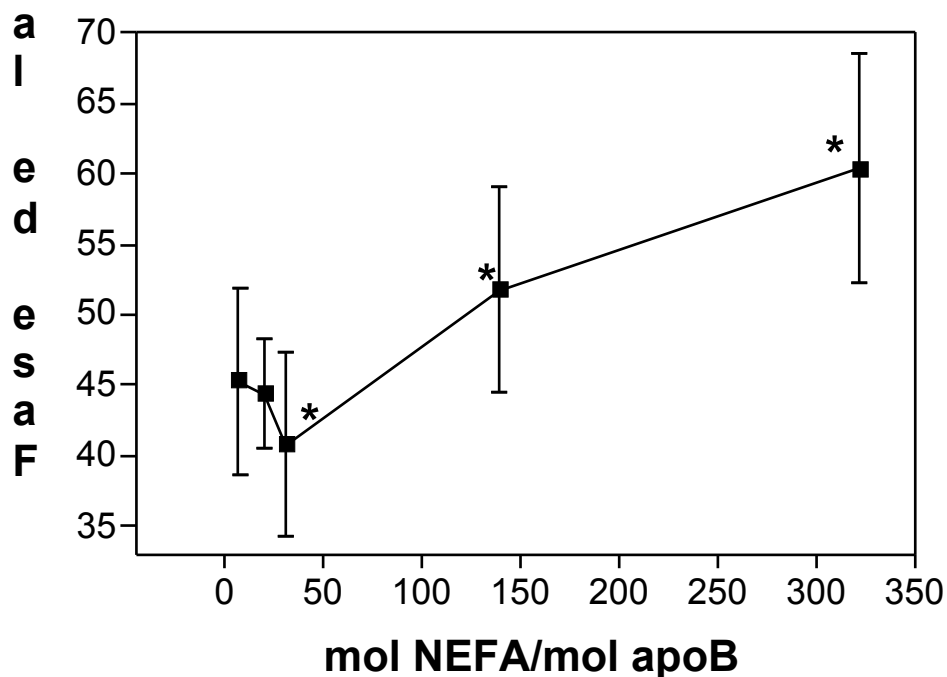


Figura 18. Valor de la fase de latència obtinguda en cinètiques d'oxidació "in vitro", dependent de la càrrega en NEFA de l'LDL-NEFA. * $p < 0.05$ vs NEFA 0 mM.

Respecte a la susceptibilitat de les LDL-NEFA a oxidar-se "in vitro" (Figura 18) s'observa un fenomen interessant: quan la càrrega en NEFA és aproximadament inferior a 50 mol NEFA/mol apoB, l'LDL presenta una major susceptibilitat a l'oxidació. Però quan el seu contingut en NEFA és més elevat, incubació amb 1-2 mM, presenta força més resistència a l'oxidació. Com a conseqüència d'aquests resultats s'observa que, dependent del nivell de càrrega en NEFA, l'LDL presenta un comportament oxidatiu o altre. Aquest efecte es podria associar amb l'LDL(-), en el sentit que segons l'enriquiment en NEFA pot contribuir a definir el comportament oxidatiu de la partícula.

Per acabar de confirmar els resultats i comprovar si existeixen diferències segons que s'incubi amb un àcid gras o altre, es van realitzar experiments (n=3) en què la incubació va ser amb els diferents àcids grassos individualment. Es va incubar amb dues concentracions de NEFA, 0.5 mM en què el guany de NEFA era baix, similar al contingut de l'LDL(-), i 2 mM en que la càrrega era molt superior. Seguidament s'indica a la següent taula els resultats realitzant la incubació en aquestes condicions.

Taula 11. Contingut en NEFA, % d'LDL(-) i fase de latència als estudis d'incubació amb àcid palmític, oleic i linoleic per separat a les concentracions de 0.5 i 2 mM.

Àcid gras	Concentració (mM)	mol NEFA/mol apoB	% LDL(-)	fase de latència (minuts)
Blanc	0	11.04±3.49	5.46±0.55	57.66±2.88
Palmític	0.5	49.67±6.08*	5.96±0.82*	56.00±0.00
	2	494.04±82.62*#	15.08±3.06*#	68.66±2.51*#
Oleic	0.5	26.01±2.97*	6.26±0.40*	52.66±2.08*
	2	247.94±55.99*#	14.81±6.91*#	70.33±13.20*#
Linoleic	0.5	27.51±3.43*	6.27±0.70*	50.67±4.93*
	2	270.45±39.58*#	18.90±7.01*#	68.00±5.00*#

* p<0.11 vs blanc

p<0.11 NEFA 2 mM vs NEFA 0.5 mM

Els resultats van reproduir els obtinguts amb la barreja d'àcids grassos, trobant que en incubar amb els diferents àcids grassos s'incrementa el contingut en NEFA de l'LDL i també la seva electronegativitat, valorada com a % d'LDL(-). Referent a la susceptibilitat a l'oxidació es va observar, igualment que amb la barreja de NEFA, que l'LDL molt enriquida en NEFA presenta una major resistència a l'oxidació. En canvi, amb un nivell similar a l'LDL(-), aproximadament uns 20 mol NEFA/mol apoB, la partícula és més susceptible a oxidar-se, seria el cas de l'oleic i el linoleic. L'LDL incubada a 0.5 mM de palmític té una fase de latència similar a la de la forma nativa, probablement degut a que la seva càrrega en NEFA (50 mol

NEFA/mol apoB) va ser superior a la de oleic i linoleic, i estaria al llindar per sobre del qual la partícula es fa més resistent a l'oxidació. A més, s'ha de tenir en compte que el palmític, en ser un àcid gras saturat, no és un bon substrate per iniciar l'oxidació.

C.2 INTERACCIÓ AMB ELS RECEPTORS CEL.LULARS

C.2.1 INDUCCIÓ D'ACUMULACIÓ DE COLESTEROL ESTERIFICAT EN MACRÒFAGS

Es va avaluar la capacitat de l'LDL carregada amb diferents nivells de NEFA per interaccionar amb el SRAII valorant la inducció en l'acumulació d'ésters de colesterol en macròfags en 6 experiments (Figura 19). La càrrega en NEFA de les mostres d'aquests experiments es mostra a la Taula 12.

Com el període de incubació va ser de 72 hores i a més s'ha descrit que les lipoproteïnes enriquides en NEFA indueixen citotoxicitat (Chung 1995) es va avaluar el possible efecte citotòxic sobre els macròfags. En tots els casos la viabilitat va resultar superior al 80%.

Taula 12. Càrrega en NEFA de les LDL-NEFA i inducció en acumulació intracel.lular de colesterol esterificat.

NEFA incubació (mM)	mol NEFA/mol apoB	mg CE/g proteïna cel.lular
0	9.71±1.24	25.90±4.37
0.25	20.62±5.40	27.56±2.22
0.5	36.38±12.80	26.35±3.37
1	105.70±13.67	25.16±1.68
1.5	285.5±11.08	27.30±3.48
2	449.78±135.78	25.10±3.23

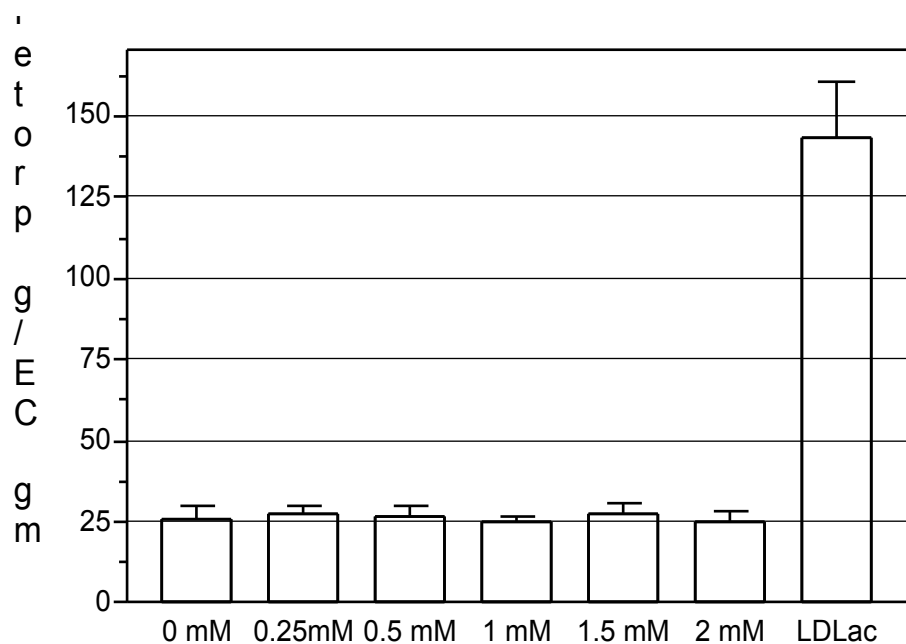


Figura 19. Acumulació de colesterol esterificat (CE) en macròfags induïda per 25 mg/L d'LDL incubada a diferents concentracions d'una barreja fisiològica de NEFA. (LDLac = LDL acetilada)

Com es pot comprovar a la Figura 19, no existeixen diferències en l'acumulació de colesterol esterificat entre les LDL amb diferent contingut en NEFA, coincidint amb altres autors (Aviram 1988). Ni tan sols en el cas en què l'LDL es troba més enriquida en NEFA, a concentracions molt superiors a les fisiològiques, és reconeguda pel SRAII. Els resultats de l'apartat B.1 indiquen que tampoc l'LDL(-) és captada a través d'aquest receptor.

C.2.2 INTERACCIÓ AMB EL rLDL

Es van realitzar estudis de desplaçament de la unió d'LDL nativa marcada amb Dil per part de les diferents LDL-NEFA (n=6). La mitjana de l'activitat específica dels sis experiments va ser de 45.63 ± 10.06 mg Dil/g Dil-LDL. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 20 juntament amb la Taula 13 la qual indica la càrrega en NEFA i els valors de la mitjana de les IC50 dels 6 .

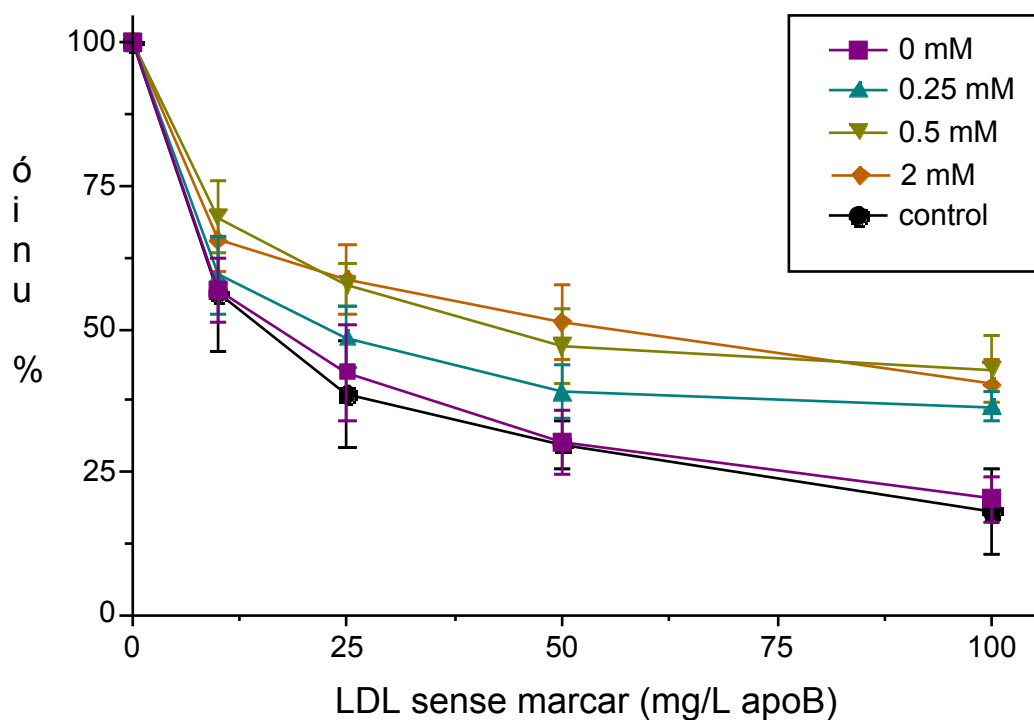


Figura 20. Estudis de desplaçament de DiI-LDL amb concentracions creixents d'LDL-NEFA carregades en diferent grau.

Taula 13. Contingut en NEFA de les LDL-NEFA i valor d'IC50.

NEFA (mM) incubació	mol NEFA/mol apoB	IC50 (mg/L apoB)
0	9.95 ± 2.05	21.33 ± 6.94
0.25	18.90 ± 2.83*	26.67 ± 3.61
0.5	40.33 ± 6.43*	46.83 ± 14.87*
2	639.41 ± 100.09*	61.91 ± 18.48*

* p<0.05 vs concentració inferior

Es va verificar que el comportament del blanc (LDL incubada a 37°C però sense NEFA) en l'afinitat pel receptor és igual al de l'LDL nativa (control), que no ha sofert la incubació ni procediment posterior de centrifugació ni diàlisi.

D'altra banda, es pot extreure dels resultats que les LDL carregades amb NEFA, inclús amb baixes concentracions, del mateix ordre que l'LDL(-), presenten una afinitat disminuïda pel receptor. No obstant això, només es van trobar diferències estadísticament significatives per part de les LDL amb una càrrega superior a 20 mol NEFA/mol apoB, incubades amb 0.5 mM o 2 mM, respecte a les carregades amb un nivell inferior. El fet que l'augment del contingut en NEFA està relacionat amb menor afinitat pel rLDL queda representat en la Figura 21, on estan tots els resultats de contingut en NEFA respecte a la seva IC₅₀, excepte aquells en que la càrrega en NEFA de l'LDL excedia els nivells fisiològics (incubada amb 2mM de NEFA).

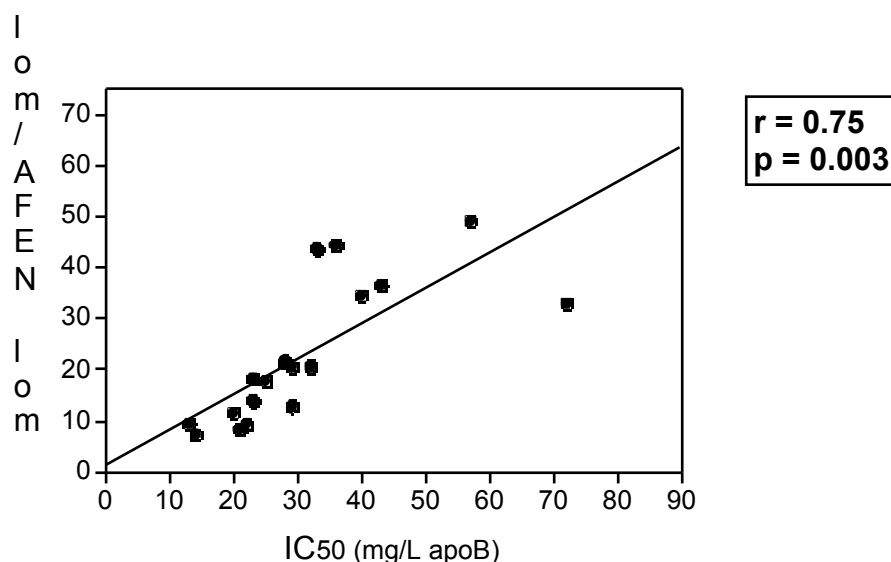


Figura 21. Relació del contingut en NEFA de l'LDL i l'IC₅₀ de totes les mostres amb càrrega de mol NEFA/mol apoB < 50 (n=18).

En el cas de l'LDL(-), que presenta un contingut en NEFA d'uns 20 mol NEFA/mol apoB, segons aquests experiments, la IC₅₀ tindria un valor de 30 mg/L apoB, valor que coincideix amb el trobat pels estudis de desplaçament de l'apartat B.2.3. Per tant, el contingut augmentat en NEFA de l'LDL(-) podria ser, almenys en part, responsable de la disminució en l'afinitat pel rLDL presentada per la partícula.

D- EFECTE DE L'LDL(-) SOBRE LES CÈL.LULES ENDOTELIALS

L'endoteli té un paper clau en l'origen i progressió de l'aterosclerosi, degut a que les cèl.lules endotelials produeixen tota una sèrie de factors proinflamatoris implicats en el procés. Com l'LDL(-) s'ha trobat augmentada en situacions amb major risc d'aterosclerosi, com a l'HF o la diabetis, en les quals s'ha descrit un cert grau de disfunció endotelial, es va hipotetitzar que l'LDL(-) podia actuar sobre l'endoteli. Amb aquesta finalitat es va estudiar el possible efecte d'aquesta partícula sobre les cèl.lules endotelials, concretament avaluant la inducció en la síntesi de les quimioquines IL-8 i MCP-1, del factor antifibrinolític PAI-1, de la molècula d'adhesió VCAM-1 i sobre la inducció de toxicitat a HUVEC. Es van realitzar dos blocs d'experiments. En el primer bloc a partir d'LDL(+) i LDL(-) provinents d'individus NL es van determinar les condicions d'assaig per avaluar la inducció de la síntesi d'IL-8, MCP-1 i PAI-1 en cèl.lules HUVEC. També es va estudiar l'acció de possibles inhibidors d'aquest efecte i es va avaluar la citotoxicitat. En el segon bloc, un cop determinades les condicions de l'assaig, es va avaluar l'efecte de les fraccions LDL(+) i LDL(-) aïllades a partir d'individus HF, utilitzant també en paral.lel com a control fraccions provinents d'NL i LDL oxidada, avaluant, a més, la inducció d'VCAM-1.

D.1 EFECTE DE L'NL-LDL(-)

D.1.1 EFECTE SOBRE L'ALLIBERAMENT D'IL-8, MCP-1 I PAI-1

El temps de preincubació amb les diferents LDL es va determinar després de realitzar experiments a diferents temps utilitzant LDL oxidada, on es va observar que l'alliberament de quimioquines és ja detectable a les 4 hores d'incubació, s'incrementa a les 6-8 hores i romà elevat durant 24 hores (comunicació personal Dra Castellarnau). Per aquest motiu es va considerar el criteri de que les condicions

de preincubació fóssin 16-18 hores. Els resultats obtinguts en 6 experiments estan expressats a la Figura 22.

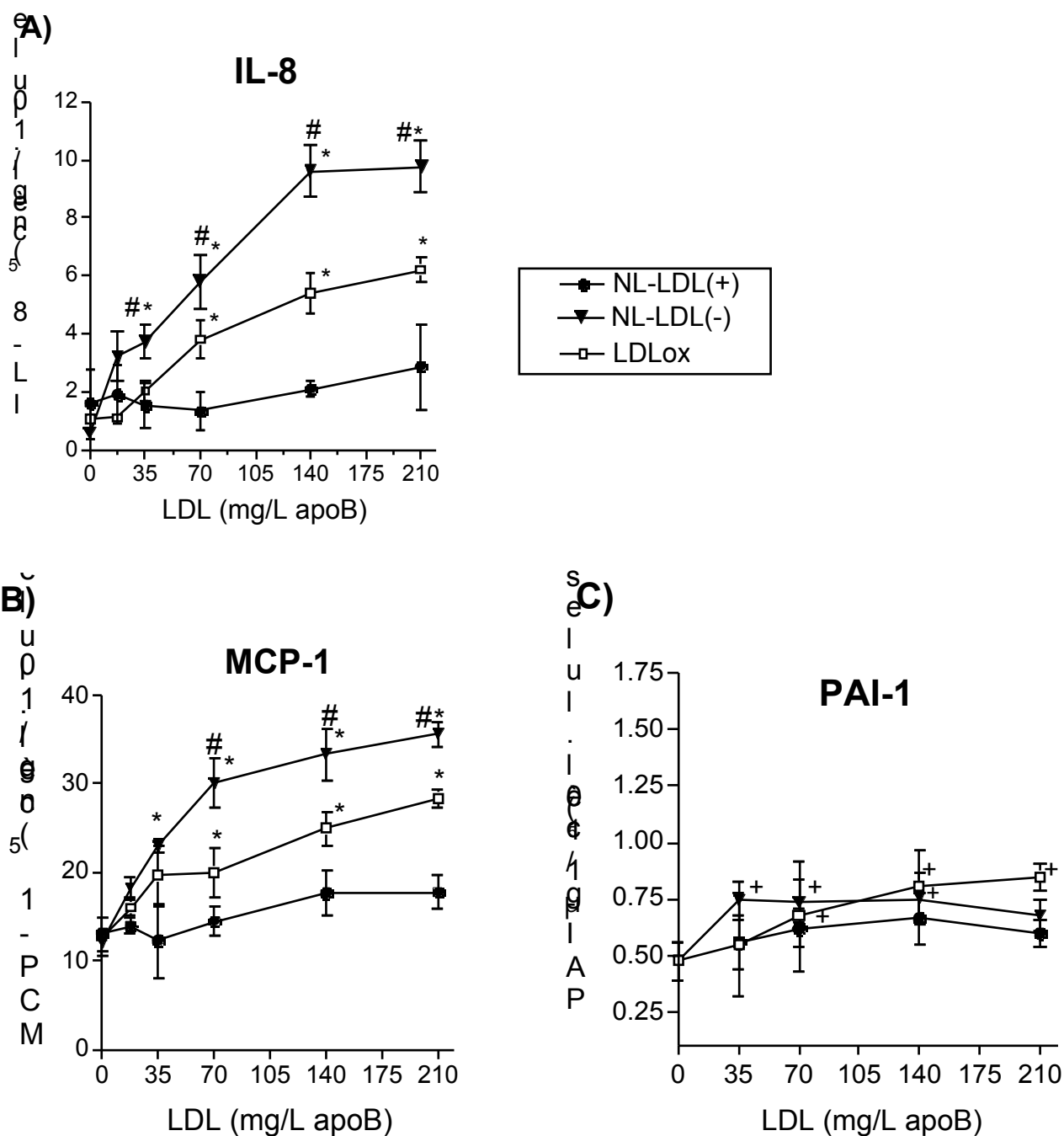


Figura 22. Inducció de la producció d'IL-8 (A), MCP-1 (B) i PAI-1 (C) amb concentracions creixents d'NL-LDL(+), NL-LDL(-) i LDLoxidada.

p<0.05 vs NL-LDL(+), +p<0.05 vs blanc (PAI-1), i # p<0.05 vs LDL oxidada.

La preincubació amb NL-LDL(-) va produir un increment significatiu en la producció i alliberament al medi de cultiu de IL-8 per part de HUVEC (Fig 22a) respecte a l'estimulació induïda per part de les cèl.lules sense tractar (blanc) o incubades amb NL-LDL(+). Aquest efecte va ser concentració-depenent, i les diferències van ser màximes al rang de concentracions 35-210mg/L apoB, arribant a la producció màxima als 140 mg/L apoB. En el cas de l'LDL oxidada, utilitzada com a control que provoca l'alliberament d'IL-8, l'efecte va ser màxim entre 70-210 mg/L. És important indicar que tant en l'alliberament d'IL-8 com d'MCP-1 l'NL-LDL(-) va induir un major efecte que l'LDL oxidada.

Referent als resultats obtinguts en l'alliberament d'MCP-1, s'observa que segueixen el mateix patró que en el cas de l'IL-8 (Fig 22b). La quantitat d'MCP-1 alliberada al medi es va trobar augmentada en HUVEC que havien estat prèviament tractades versus cèl.lules no tractades o preincubades amb NL-LDL(+). Les diferències estadístiques entre LDL oxidada i NL-LDL(-) es produeixen entre les concentracions 70-210 mg/l apoB.

En l'alliberament de PAI-1 es va observar l'existència d'uns nivells incrementats en el medi de HUVEC induït per NL-LDL(-) i LDLox, en referència a les cèl.lules no tractades (Fig 22c). L'efecte d'NL-LDL(-) en l'alliberament de PAI-1 va ser d'un augment de com a màxim 1.5 vegades respecte al blanc, i el de l'LDLox de 1.7 vegades ($p < 0.05$). Tanmateix, en aquest cas no es van observar diferències significatives entre NL-LDL(+), NL-LDL(-) i LDLox.

A més d'LDLox, es va utilitzar TNF- com a control positiu estimulador de la producció de IL-8, MCP-1 i PAI-1 en el medi de cultiu d'HUVEC. Incubant les cèl.lules durant 16-18 hores amb 20 $\mu\text{g/L}$ de TNF- , es van obtenir els següents nivells de producció per $n=6$, IL-8: 36 ± 10 ng/ 10^5 cèl.lules, MCP-1: 95 ± 20 ng/ 10^5 cèl.lules, PAI-1 1.41 ± 0.19 $\mu\text{g}/10^5$ cèl.lules, que representa un 3.5, 2.8 i 1.7

d'increment respectivament respecte a l'NL-LDL(-), i 36, 8 i 3 vegades respecte al blanc.

Es va comprovar que aquesta inducció en l'alliberament de IL-8, MCP-1 i PAI-1 per part d'NL-LDL(-) i LDL oxidada no fos deguda a la presència de lipopolisacàrids per mitjà d'un kit de detecció i avaluant l'efecte de la polimixina B, com s'indica a Material i Mètodes. Emprant ambdues tècniques es va descartar que l'efecte inductor estigués mitjançant per contaminació amb LPS.

D.1.2 INHIBICIÓ DE L'EFECTE DE L'NL-LDL(-) SOBRE LA PRODUCCIÓ DE QUIMIOQUINES

Per discernir el mecanisme o mecanismes implicats en l'acció de l'NL-LDL sobre la producció d'MCP-1 i IL-8 es va assajar l'efecte de diferents compostos per estudiar el seu paper inhibidor. Es van seguir les condicions indicades a Materials i Mètodes:

- BHT (hidroxitoluè butilat), és un captador de radicals lliures .
- NAC (N-acetilcisteïna), amb efecte de captador de radicals lliures i precursor del glutatió, produint un augment de la capacitat antioxidant de les cèl.lules.
- BN-50730, un antagonista del receptor del PAF.
- Actinomicina D, inhibidor de la transcripció.

Respecte a l'acció de l'actinomicina D es va observar que inhibia l'efecte d'NL-LDL(-) i LDLox tant en la producció d'IL-8 (60-80% d'inhibició) com la de MCP-1 (70-80%), disminuint-la fins a nivells comparables als induïts per l'NL-LDL(+). Aquest fet ens indicaria que la inducció és mitjançant transcripció. Els resultats amb els altres inhibidors queden expressats a la Figura 23.

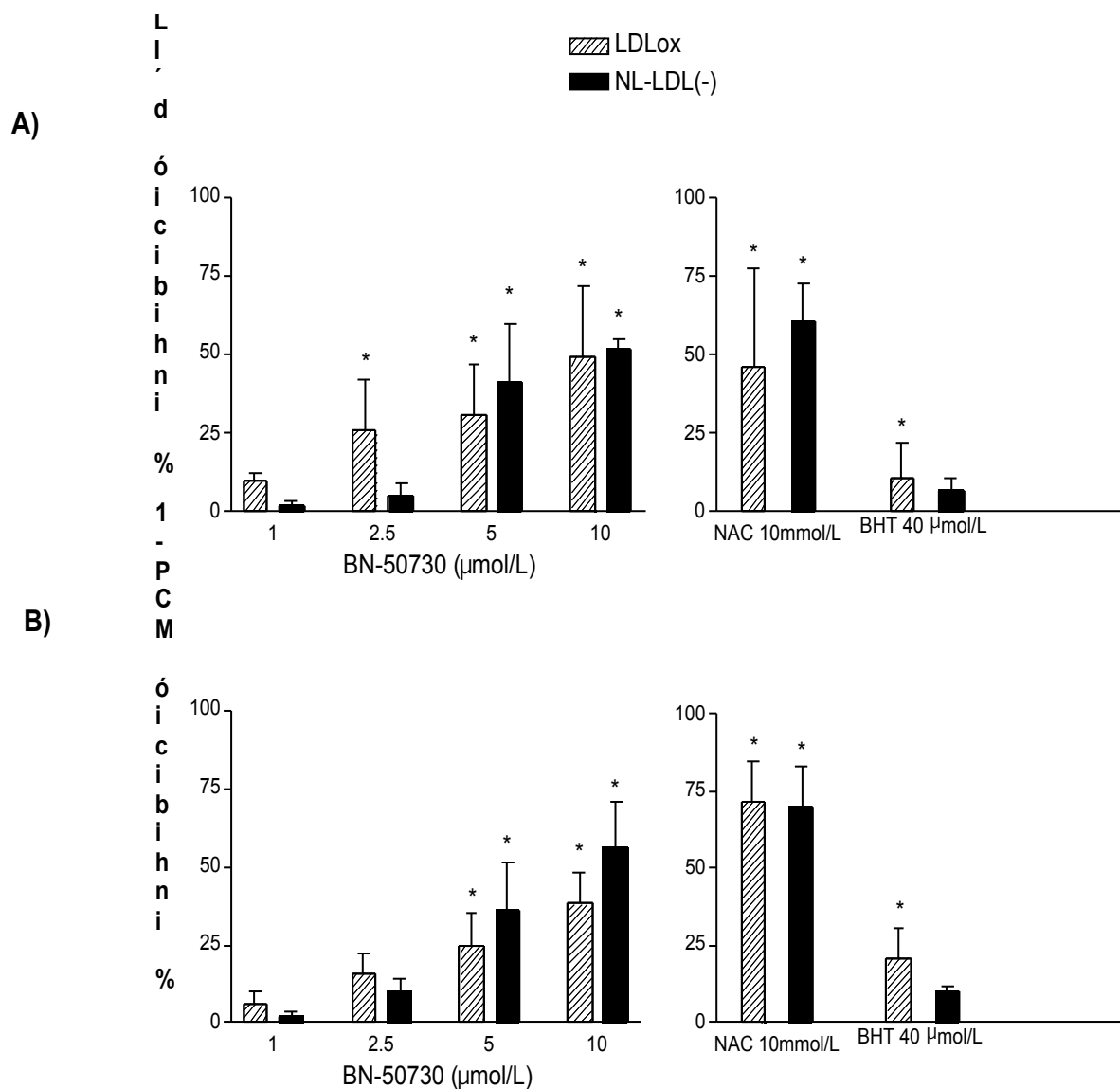


Figura 23. Efecte inhibitori de 10 mmol/L de NAC, 40 μmol/L de BHT i diferents concentracions de BN-50730 (1, 2.5, 5 i 10 μmol/L) sobre la producció d'IL-8 (A) i MCP-1 (B). *p<0.05 vs efecte sense inhibidor.

Els resultats que es poden observar són resumidament aquests:

- Per part del NAC un 60% d'inhibició de l'efecte induït per 140 mg/L apoB d'NL-LDL(-) i LDLox, i més d'un 70% de l'induït pel TNF- .
- El BHT presenta poc efecte inhibitori en l'alliberament de MCP-1 i IL-8, només estadísticament significatiu en el cas de l'efecte de l'LDLox.
- El pretractament de les cèl.lules amb el antagonista del PAF té acció inhibidora dels efectes d'NL-LDL(-) i LDLox de manera concentració-depenent. Amb 10 μM s'assoleix una inhibició del 50% aproximadament.

D.1.3 EFECTE CITOTÒXIC DE L'NL-LDL(-)

No es va observar un efecte tòxic en HUVEC induït per NL-LDL(+) ni tampoc per NL-LDL(-) a concentracions d'apoB superiors a 210 mg/L i durant un temps d'incubació de 24 i 48 hores. Tanmateix, l'LDLox en concentracions de 210 mg/L va provocar canvis morfològics, com desenganxament cel.lular, a les 24 hores d'incubació. L'efecte de l'LDLox a les 48 hores ja va ser més agressiu, observant-se una toxicitat significativa. Aquests resultats es mostren a la Figura 24, juntament amb l'efecte de 7 -hidroxicolesterol 50 μ M (7 -hyCh). El 7 -hyCh va provocar un dany cel.lular de manera dependent de concentració i temps, ja que a concentracions més elevades (100 μ M) es potencia molt la seva acció citotòxica produint desenganxament cel.lular i una alta toxicitat.

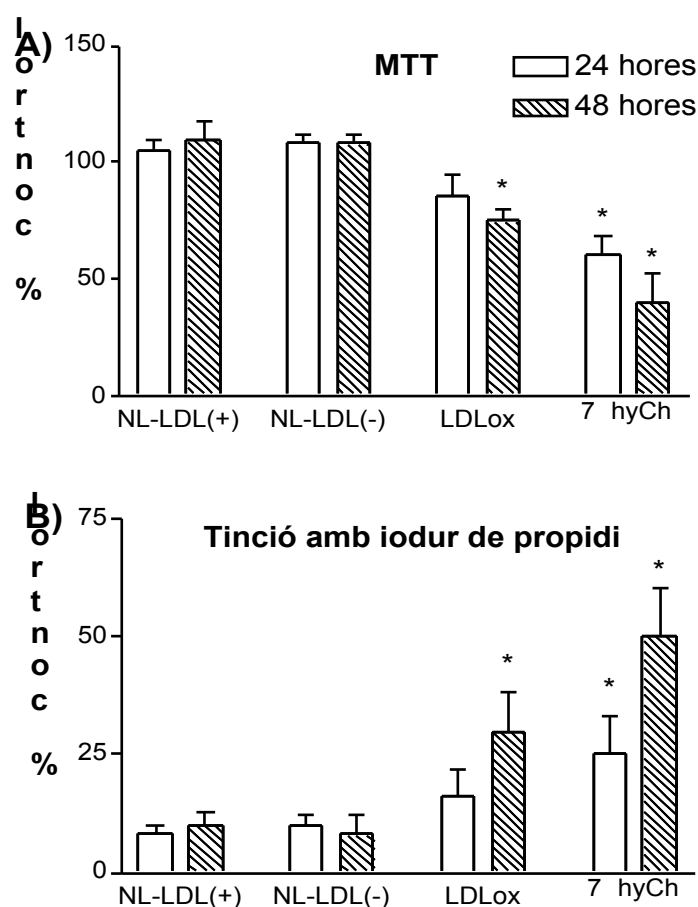


Figura 24. Valoració de citotoxicitat a HUVEC A) mitjançant el test del MTT (% viabilitat) i B) per la tinció de nuclis amb iodur de propidi (% mortalitat). *p<0.05 vs efecte control.

D.2 COMPARACIÓ DE L'EFECTE DE L'HF-LDL(-) I L'NL-LDL(-)

D.2.1 EFECTE SOBRE L'ALLIBERAMENT DE IL-8, MCP-1 I PAI-1

Posteriorment a l'observació de l'efecte proinflamatori de l'NL-LDL(-) es va voler comprovar si l'HF-LDL(-) també el reproduïa. Com als estudis previs amb NL ja s'havien establert les condicions d'assaig, en les fraccions d'HF es va utilitzar un temps fixe de incubació: 24 hores i una concentració fixa d'LDL: 100 mg/L apoB. Els resultats mitjans obtinguts de 7 experiments es presenten a la Figura 25.

Els resultats mostrats a la Figura 25a i 25b es presenten restant el blanc, el qual es considera que són les cèl.lules sense incubar amb cap LDL o molècula inductora, és a dir, la producció basal en cèl.lules no estimulades. Quant al PAI-1, no es van observar una inducció diferenciada per part de l'LDL(-) respecte l'LDL(+), ni tampoc per la forma oxidada o la IL-1. En canvi, respecte a la inducció de quimioquines, es va obtenir que l'LDL(-), tant d'individus NL com d'HF, induïa una major producció de les quimioquines estudiades, aproximadament del doble. Comparant amb el blanc de cèl.lules no estimulades, la inducció per part de l'LDL(-) va ser de sis vegades més en el cas de la IL-8 i del doble en MCP-1

Respecte l'LDL oxidada es va observar un augment de 10 i 2 vegades, respectivament, en la inducció de IL-8 i MCP-1 comparant amb cèl.lules no estimulades. En aquests experiments, l'efecte de l'LDL(-) no va ser tan marcat com al bloc anterior (D.1.1), de manera que no produeix més inducció que la forma oxidada. Aquesta circumstància pot ser deguda a la variabilitat en el grau d'oxidació de l'LDL oxidada "in vitro", el qual únicament es va avaluar mitjançant electroforesi en agarosa, o a diferències metodològiques, explicades a l'apartat de mètodes, en la realització dels experiments.

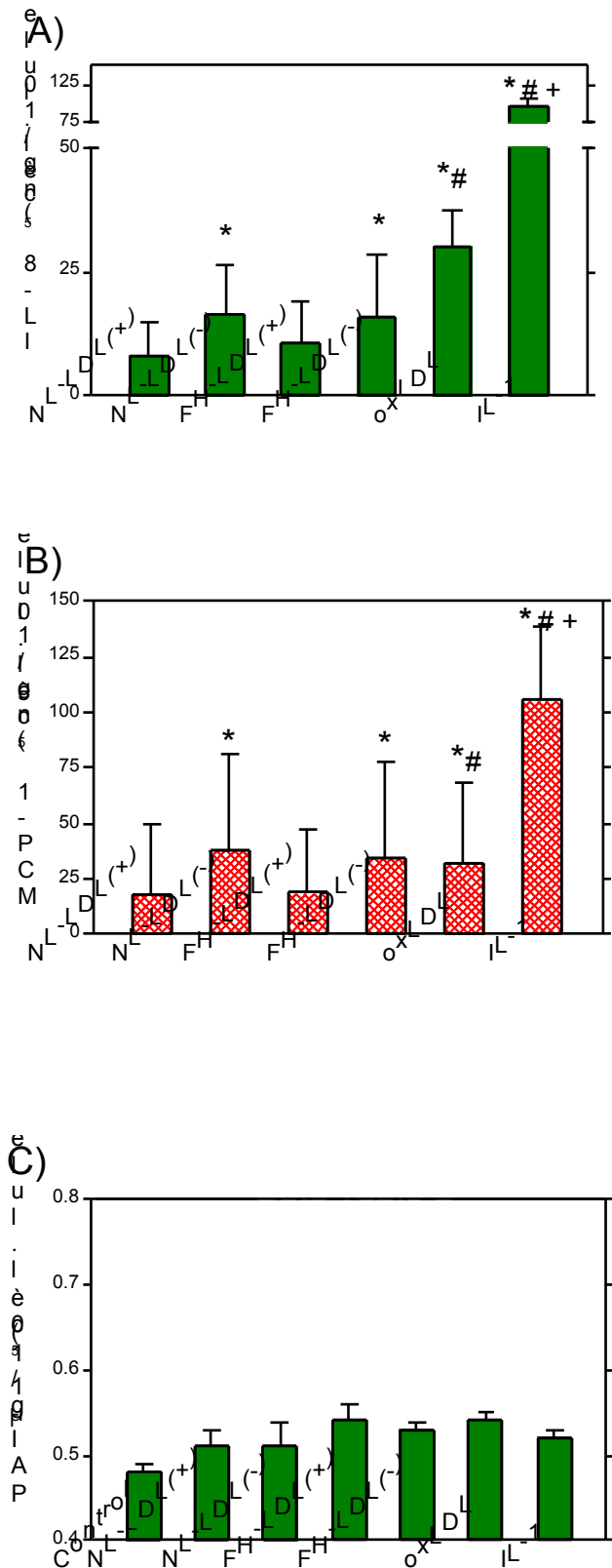


Figura 25. Producció de IL-8 (A), MCP-1 (B) i PAI-1 (C) en HUVEC induïda per 100 mg/L apoB d'LDL(+) i LDL(-) d'NL i HF, LDL oxidada i IL-1.* p<0.05 vs LDL(+), # p<0.05 vs LDL(-) i + p<0.05 vs LDLox .

D'altra banda, l'IL-1 es va utilitzar com a control positiu. La IL-1, al igual que el TNF- α fet servir en els estudis d'NL, va induir de forma eficient la producció de IL-8 i MCP-1, observant-se un increment de 30 i 3.5 vegades respectivament en front a la producció basal en cèl.lules no estimulades.

D.2.2 EFECTE SOBRE LA INDUCCIÓ DE VCAM-1

Un cop comprovat que l'LDL(-) indueix la producció de IL-8 i MCP-1, tant si la mostra procedeix d'individus NL o HF, es va voler avaluar si també induïa l'expressió d'altres molècules implicades al procés inflamatori, com la molècula d'adhesió VCAM-1, la qual desenvolupa un paper central en l'adhesió de monòcits a l'endoteli. La seva producció es va determinar a partir d'extractes de membranes d'HUVEC, prèviament incubades amb les diferents fraccions, per mitjà de western-blot. A la Figura 26 es mostra un assaig representatiu amb mostres d'NL i d'HF, sense diferir els resultats segons el tipus d'individu. S'observa que l'LDL oxidada va induir de forma concentració-depenent l'expressió a membrana de VCAM. També es va trobar inducció amb IL-1, la qual es va utilitzar com a control d'inducció. Tanmateix, no es va produir estimulació amb LDL(-) ni amb LDL(+) independentment que fóssin d'NL (A) o HF (B) a les concentracions entre 70-210 mg/L apoB. Es van provar concentracions més altes amb NL-LDL(+), fins a 800 mg/L apoB (A), obtenint-se una lleu inducció de VCAM.

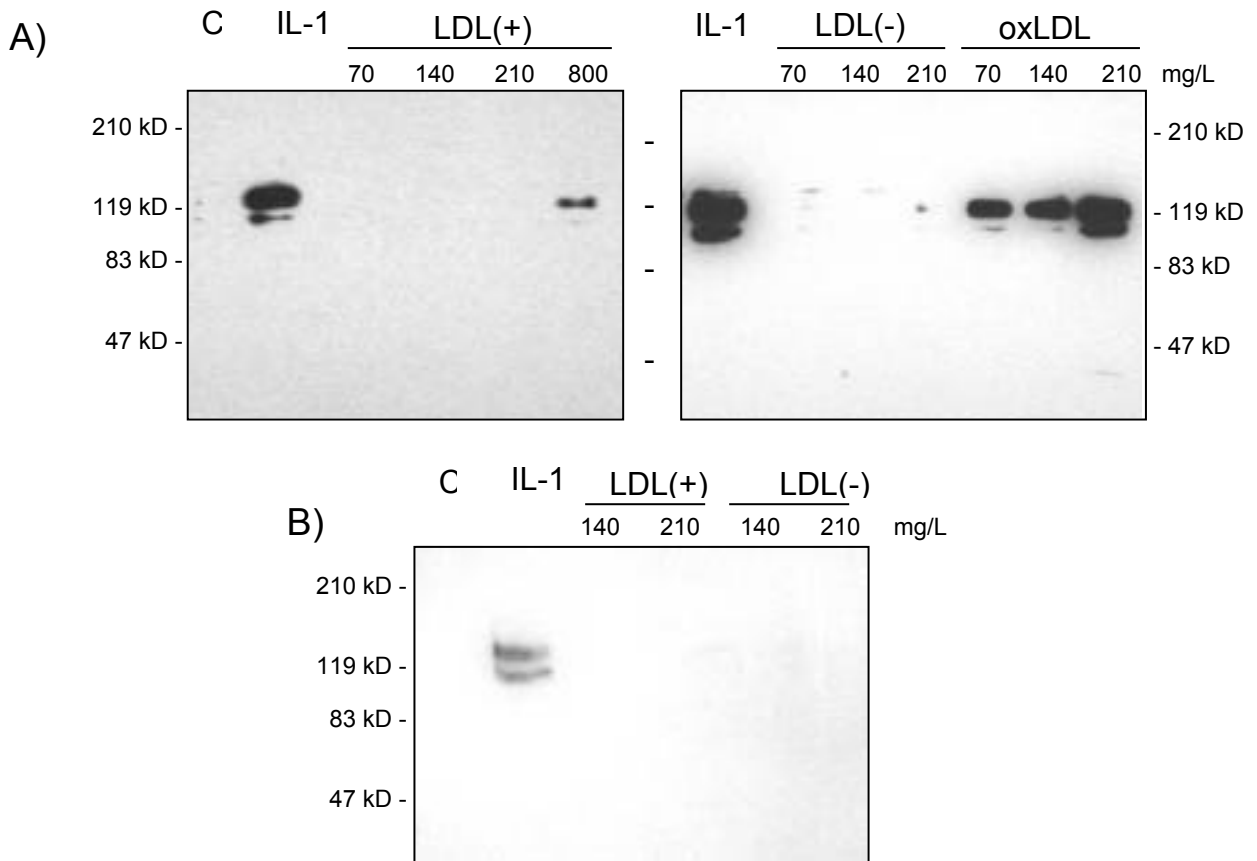


Figura 26. Western blot de VCAM de les fraccions d'NL (A) i d'HF (B). C: control.