

**LDL ELECTRONEGATIVA: CARACTERITZACIÓ
FISICO-QUÍMICA I BIOLÒGICA EN INDIVIDUS
NORMOLIPÈMICS I HIPERCOLESTEROLÈMICS**

SÒNIA BENÍTEZ GONZÁLEZ

JORDI ORDÓÑEZ LLANOS, Professor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, i JOSE LUÍS SÁNCHEZ QUESADA, Doctor en Biologia per la mateixa universitat

CERTIFIQUEN: que la Tesi Doctoral titulada “**LDL electronegativa: Caracterització fisico-química i biològica en individus normolipèmics i hipercolesterolèmics**” realitzada sota la nostra direcció per la Llicenciada SÒNIA BENÍTEZ GONZÁLEZ, reuneix tots els requisits científics i formals per ser presentada i defensada davant el tribunal corresponent.

I per a que consti a tots els efectes, signen el present certificat a Barcelona, 17 de Desembre del 2001.

Dr Jordi Ordóñez Llanos

Dr José Luís Sánchez Quesada

AGRAÏMENTS

Vull expressar el meu agraïment als meus dos directors de tesi. Primerament, al Dr Jordi Ordóñez per tots els medis que ha posat a la meva disposició per a la realització de la tesi i el seu gran ajut durant tot el treball experimental. També per les hores dedicades en la direcció i la profunda revisió de la tesi. Al Dr Jose Luís Sánchez agrair tota la dedicació que ha tingut cap a la meva tesi i el gran suport a nivell experimental.

Voldria també agrair al Dr Francesc González-Sastre, com a cap del Servei de Bioquímica, així com al Dr Francisco Blanco, pel suport que proporcionen al nostre grup d'investigació.

Gràcies també a la Dra Conxita Castellarnau, del Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat de Barcelona, i al Dr Lluís Vila, del grup de *Mediadors de la Inflamació* de l'Institut de Recerca de l'Hospital de St Pau, per la seva gran col·laboració en la part dels estudi amb les cèl·lules endotelials i de la determinació d'hidròxids. Especialment agrair a la Dra Mercedes Camacho i a la Dra Rosa Antón per la seva tasca experimental.

I ara arriba el bloc d'agraïments a tots els companys de laboratori.

Als rutinaires: Rosa Bonet, Rosa Arcelus, Agus i Òscar. Gràcies per la seva simpatia i perdó pel meu ús, de vegades abusiú, del meravellós, i de vegades odiós, aparell Hitachi 911. A Rosa Arcelus moltes gràcies per la seva col·laboració amb el capritxós HPLC i la variable tècnica dels aldehids. També a la Pepi, pel seu gran ajut i bon humor.

Als companys de l'altre costat: Josep, gràcies per l'ajut informàtic a la tesi, Joanca (Sr Calzone), Carme Trocho (un petó a l'Alba), Carme Mayoral, Jesús i es Vicent. La majoria són torturadors de ratolins i agradables companys de menjador, amb els quals he tafanejat, rigut i criticat al·legrement durant els nostres dinars.

Dins del laboratori mereixen menció especial els que m'han hagut d'aguantar de més a prop, és a dir els de la meva zona. L'Edgar és la nova adquisició i especialista en superposició, com encara no em coneix gaire crec que em soporta una mica. Al Jose Luís, apart de com a codirector de tesi i de tenir una paciència sense límits amb mi, pel seu bon rotllo i simpatia. A l'Esther per la confiança i la bona amistat, que espero no perdre mai. Al ex-lipídic Paco, per les nostres llargues i divertides converses, per donar alegria a la meva emocionant vida laboral. Finalment, una menció especial a la, també ex, Lili a la que, per una raó o una altra, tots recordarem.

I fora del laboratori, gràcies a tots els meus amics per fer la meva vida més amena i agradable. Als meus pares pel recolçament i perquè sé que es preocupen molt per mí. També als meus grups metal.lers favorits, per fer-me sentir moltes coses bones amb la seva música.

Per finalitzar, vull donar un agraïment molt especial al Jose, per la seva comprensió i la seva manera alegre de veure la vida, per animar-me a seguir en el negoci poc lucratiu de la investigació.

| | |
|--------------|------|
| INDEX | I |
| ABREVIATURES | IX |
| RESUM | XIII |

INTRODUCCIÓ

| | |
|---|----|
| 1- ESTRUCTURA I METABOLISME DE LES LIPOPROTEÏNES | 1 |
| 1.1 Introducció | 3 |
| 1.2 Tipus de lipoproteïnes | 4 |
| 2- PATOGÈNIA DE L'ATEROSCLEROSI | 6 |
| 2.1 Teories sobre l'origen de la lesió ateroscleròtica | 6 |
| 2.2 Evolució de la placa ateromatosa | 9 |
| 3- PAPER DE DIFERENTS MOLÈCULES I FACTORS EN LA LESIÓ | 12 |
| 3.1 Molècules d'adhesió | 14 |
| 3.1.1 Classificació de les molècules d'adhesió | 14 |
| 3.2 Quimioquines | 15 |
| 3.2.1 Proteïna quimioattractant de monòcits (MCP-1) | 16 |
| 3.2.2 Interleuquina 8 (IL-8) | 16 |
| 3.3 Factors de transcripció que regulen gens implicats en l'aterosclerosi | 18 |
| 3.3.1 Factor nuclear kappa B (NF-kB) | 18 |
| 3.3.2 Proteïna activadora (AP-1) | 19 |
| 3.3.3 Receptor de l'activador de proliferació peroxisomal (PPAR) | 19 |
| 4- IMPLICACIÓ DE L'LDL AL PROCÉS ATEROGÈNIC | 20 |
| 4.1 Proves de l'aterogenicitat de l'LDL. Cas de l'hipercolesterolèmia familiar | 20 |
| 4.2 El receptor d'LDL (rLDL) | 22 |
| 4.2.1 Família del rLDL | 22 |
| 4.2.2 Receptor d'LDL | 22 |
| 4.3 Característiques qualitatives de l'LDL. Implicació a l'aterosclerosi de la grandària i densitat de la partícula | 26 |

| | |
|---|----|
| 5- MODIFICACIONS DE L'LDL. PAPER A L'ATEROGÈNESI | 29 |
| 5.1 Paradoxa del colesterol i modificació de l'LDL | 29 |
| 5.2 LDL oxidada | 31 |
| 5.2.1 Oxidació de l'LDL mitjançada per cèl.lules | 31 |
| 5.2.2 Existència "in vivo" d'LDL oxidada | 32 |
| 5.2.3 Procés oxidatiu. Aterogenicitat i heterogeneïtat de l'LDL oxidada | 34 |
| 5.2.3.1 Paper biològic dels fosfolípids oxidats | 35 |
| 5.2.3.2 Propietats aterogèniques de l'LDL oxidada | 36 |
| 5.2.3.3 Factors de transcripció activats per l'LDL oxidada | 39 |
| 5.2.4 Susceptibilitat a l'oxidació de l'LDL | 40 |
| 5.3 Altres modificacions de l'LDL | 42 |
| 5.4 LDL enriquida en àcids grassos no esterificats (NEFA). Relació dels NEFA amb risc cardiovascular. | 44 |
| 5.4.1 Efectes dels àcids grassos lliures | 44 |
| 5.4.2 Condicions en què els NEFA es troben augmentats. Relació amb risc cardiovascular | 47 |
| 5.4.3 Propietats de les lipoproteïnes enriquides en NEFA | 48 |
| 5.5 Unió de les LDL modificades als receptors cel.lulars. Receptor scavenger | 50 |
| 5.5.1 Caracterització dels SR tipus A | 50 |
| 5.5.2 Altres SR | 51 |
| 5.5.3 Funcions del SR | 55 |
| 6- LDL ELECTRONEGATIVA | 56 |
| 6.1 Origen de l'LDL electronegativa | 58 |
| 6.1.1 Origen oxidatiu de l'LDL electronegativa | 58 |
| 6.1.2 Origen no oxidatiu de l'LDL electronegativa | 60 |
| 6.2 Interacció de l'LDL electronegativa amb els receptors cel.lulars | 62 |
| 6.3 Efectes biològics de l'LDL electronegativa | 64 |
| 6.4 Situacions fisiopatològiques amb increment de l'LDL electronegativa | 65 |
| 6.5 Discrepàncies en l'estudi de l'LDL electronegativa | 68 |

| | |
|--|-----|
| <u>HIPÒTESI I OBJECTIUS</u> | 69 |
| <u>MATERIAL I MÈTODES</u> | 73 |
| 1- AÏLLAMENT DE L'LDL TOTAL I LDL ELECTRONEGATIVA | 75 |
| 1.1 Preparació dels pools de plasma | 75 |
| 1.2 Separació de l'LDL i altres lipoproteïnes | 77 |
| 1.3 Obtenció de subfraccions d'LDL | 79 |
| 1.4 Aïllament de l'LDL electronegativa (LDL(-)) | 81 |
| 2-CARACTERITZACIÓ FÍSICO-QUÍMICA | 84 |
| 2.1 Composició en lípids, apolipoproteïnes i àcid siàlic | 84 |
| 2.2 Mètodes cromatogràfics | 85 |
| 2.2.1 Àcid siàlic | 85 |
| 2.2.2 Contingut en antioxidants | 87 |
| 2.2.3 Contingut en aldehyds | 89 |
| 2.2.4 Contingut en hidròxids | 90 |
| 2.3 Susceptibilitat a l'oxidació | 91 |
| 2.4 Susceptibilitat a l'agregació | 93 |
| 2.5 Caracterització electroforètica | 93 |
| 2.5.1 Electroforesi en gel d'agarosa-acrilamida | 93 |
| 2.5.2 Electroforesi en gel d'agarosa | 94 |
| 2.5.3 Electroforesi en gels d'acrilamida amb SDS | 95 |
| 2.5.4 Electroforesi en gels en gradient d'acrilamida | 96 |
| 3- MODIFICACIÓ IN VITRO DE L'LDL | 98 |
| 3.1 Modificació per oxidació | 98 |
| 3.2 Modificació per acetilació | 99 |
| 3.3 Modificació per incubació amb NEFA | 100 |
| 4- CULTIUS CEL·LULARS | 102 |
| 4.1 Tipus cel·lulars | 102 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.1 Línies cel.lulars | 102 |
| 4.1.2 Cultius primaris de cèl.lules endotelials | 102 |
| 4.2 Condicions de creixement cel.lular | 104 |
| 4.3 Subcultius | 105 |
| 4.4 Determinació de la viabilitat cel.lular | 106 |
| 4.4.1 Determinació de l'LDH | 106 |
| 4.4.2 Determinació de viabilitat a HUVEC | 107 |
| 5- ESTUDIS D'UNIÓ AL rLDL EN FIBROBLASTS | 108 |
| 5.1 Fonaments dels dos tipus d'estudi | 108 |
| 5.1.1 Cinètiques de saturació | 109 |
| 5.1.2 Estudis de desplaçament | 110 |
| 5.2 Procediments previs a l'experiment | 111 |
| 5.2.1 Acondicionament de les cèl.lules | 111 |
| 5.2.2 Marcatge fluorescent de l'LDL | 112 |
| 5.3 Experiments d'unió al receptor | 113 |
| 6- ESTUDIS D'ACUMULACIÓ DE COLESTEROL ESTERIFICATS (CE) EN MACRÒFAGS | 115 |
| 6.1 Incubació de les fraccions d'LDL amb els macròfags | 116 |
| 6.2 Extracció lipídica intracel.lular | 117 |
| 6.3 Cromatografia en capa fina (CCF) | 118 |
| 7- ESTUDIS DE L'EFECTE DE L'LDL(-) SOBRE LES CÈL.LULES ENDOTELIALS | 119 |
| 7.1 Inducció d'IL-8, MCP-1 i PAI-1 | 119 |
| 7.1.1 Incubació de les fraccions d'LDL amb HUVEC | 119 |
| 7.1.2 Determinació d'IL-8, MCP-1 i PAI-1 | 121 |
| 7.1.3 Evaluació del mecanisme de producció de quimioquines | 122 |
| 7.2 Producció de la inducció d'VCAM | 123 |
| 8- MÈTODES ESTADÍSTICS | 124 |

| | |
|---|-----|
| A- CARACTERITZACIÓ FÍSICO-QUÍMICA DE LES FRACCIONS LDL(+) I LDL(-) AÏLLADES D'INDIVIDUS NORMOLIPÈMICS I HIPERCOLESTEROLÈMICS | |
| A.1 Proporció d'LDL(-) determinada per cromatografia | 127 |
| A.2 Distribució de l'LDL(-) en les fraccions de densitat | 131 |
| A.3 Composició d'LDL(+) i LDL(-) | 132 |
| A.3.1 Composició de la fracció HF-LDL(+)bis | 134 |
| A.4 Característiques oxidatives | 135 |
| A.4.1 Contingut en antioxidants i MDA | 136 |
| A.4.2 Susceptibilitat a l'oxidació | 137 |
| A.5 Caracterització electroforètica | 139 |
| A.6 Susceptibilitat a l'agregació | 141 |
| | |
| B- INTERACCIÓ AMB ELS RECEPTORS CEL·LULARS | 143 |
| B.1 Interacció amb el receptor scavenger | 143 |
| B.2 Interacció amb el rLDL | 145 |
| B.2.1 Marcatge de les fraccions amb Dil | 145 |
| B.2.2 Cinètiques de saturació | 147 |
| B.2.3 Estudis de desplaçament | 151 |
| B.2.3.a Desplaçament de Dil-NL-LDL i Dil-HF-LDL per part de les seves respectives fraccions | 151 |
| B.2.3.b Desplaçaments creuats | 154 |

| | |
|--|-----|
| C- ESTUDIS D'INCUBACIÓ DE L'LDL AMB ÀCIDS GRASSOS | |
| "IN VITRO". COMPARACIÓ AMB LDL(-) | 157 |
| C.1 Característiques fisico-químiques | 158 |
| C.2 Interacció amb els receptors cel·lulars | 163 |
| C.2.1 Interacció amb el SR | 163 |
| C.2.2 Interacció amb el rLDL | 164 |
| D- EFECTE DE L'LDL(-) SOBRE LES CÈL·LULES ENDOTELIALS | 167 |
| D.1 Efecte de la NL-LDL(-) | 167 |
| D.1.1 Efecte sobre l'alliberament d'IL-8, MCP-1 i PAI-1 | 167 |
| D.1.2 Inhibició de l'efecte de la NL-LDL(-) sobre la producció de quimioquines | 170 |
| D.1.3 Efecte citotòxic | 172 |
| D.2 Comparació de l'efecte de HF-LDL(-) i NL-LDL(-) | 173 |
| D.2.1 Efecte sobre l'alliberament d'IL-8, MCP-1 i PAI-1 | 173 |
| D.2.2 Efecte sobre la inducció de VCAM. | 175 |
| <u>DISCUSSIÓ</u> | 177 |
| ANTECEDENTS SOBRE L'ESTUDI DE L'LDL ELECTRONEGATIVA | 179 |
| A- CARACTERITZACIÓ FISICO-QUÍMICA DE LDL(+) I LDL(-) | |
| D'INDIVIDUS NORMOLIPÈMICS I HIPERCOLESTEROLÈMICS | 181 |
| A.1 Proporció LDL(-) | 181 |
| A.2 És l'LDL(-) un artefacte o conseqüència de contaminació amb altres lipoproteïnes? | 183 |
| A.3 Densitat i grandària | 184 |

| | |
|--|-----|
| A.4 Composició | 186 |
| A.5 Fracció HF-LDL(+)bis | 192 |
| A.6 Característiques oxidatives | 193 |
| A.7 Agregació | 197 |
| A.8 Conclusions del bloc A | 198 |
| | |
| B- INTERACCIÓ AMB ELS RECEPTORS CEL.LULARS | 200 |
| B.1 Acumulació de colesterol esterificat en macròfags | 200 |
| B.2 Interacció amb el receptor d'LDL | 202 |
| B.2.1 Experiments de saturació de la unió | 203 |
| B.2.2 Estudis de desplaçament de la unió | 204 |
| B.2.3 Possibles causes de la menor afinitat de l'LDL(-) | 206 |
| B.2.4 Comparació entre HF i NL en afinitat | 211 |
| B.3 Conclusions del bloc B | 213 |
| | |
| C- EFECTE DEL CONTINGUT EN NEFA SOBRE LES CARACTERÍSTIQUES DE L'LDL ELECTRONEGATIVA | 215 |
| C.1 Característiques fisico-químiques | 215 |
| C.2 Interacció amb els receptors cel.lulars | 218 |
| C.3 Conclusions del bloc C | 222 |
| | |
| D- EFECTE DE L'LDL ELECTRONEGATIVA SOBRE LES CÈL.LULES ENDOTELIALS | 223 |
| D.1 Producció de PAI-1 | 224 |
| D.2 Atracció de leucòcits: quimioquines (MCP-1 i IL-8) i molècules d'adhesió (VCAM-1) | 225 |

| | |
|--|-----|
| D.2.1 IL-8 i MCP-1 | 227 |
| D.2.2 Expressió d'VCAM | 232 |
| D.3 Possibles mecanismes que mitjançen l'acció de l'LDL(-) | |
| Ús d'inhibidors | 233 |
| D.4 Factors de transcripció | 238 |
| D.5 Possible relevància fisiopatològica de l'acció de l'LDL(-) | 241 |
| D.6 Conclusions del bloc D | 242 |
| | |
| <u>CONCLUSIONS FINALS</u> | 243 |
| | |
| <u>BIBLIOGRAFIA</u> | 247 |
| | |
| <u>APÈNDIX</u> | 305 |

ABREVIATURES

Aa: aminoàcids.

Abs: absorbància.

ACAT: acilcolesterol aciltransferasa.

Apo: apolipoproteïna.

AP-1: proteïna activadora 1.

APS: amoni persulfat.

ATCC: col.lecció americana de tipus cel.lulars.

B: fracció unida (bound).

BHT: butirat hidroxitoluè.

Bmàx: unió màxima.

CCF: cromatografia en capa fina.

CCR2: receptor 2 de quimioquines tipus CC.

CE: colesterol esterificat.

CG-EM: cromatografia de gasos-espectrometria de masses.

CHD: ciclohexadiona.

CHO: cèl.lules d'ovari de hámster xinès.

CL: colesterol lliure.

CT: colesterol total.

CXCR2: receptor 2 de quimioquines tipus CXC.

Cys: cisteïna.

DC: dicroïsme circular.

Dil: dioctadecil-indocarbocianina perclorat.

Dil-LDL, Dil-NL-LDL o Dil-HF-LDL: LDL marcada amb Dil, de NL o HF.

DMI o IDDM: diabètics del tipus 1 o diabetis mellitus insulino depenent.

DMII o NIDDM: diabètics del tipus 2 o diabetis mellitus no insulino depenent.

DMEM: medi essencial de Dulbbeco modificat.

DMSO: dimetilsulfòxid.

EC: cèl.lules endotelials.

ECGF: factor de creixement de cèl.lules endotelials.

EDTA: àcid etilendiaminotetracètic.

EGF: factor de creixement epidèrmic.

ELISA: assaig immunosorbent amb enzim unit.

ET: endotelina.

F: fracció lliure (free).

bFGF: factor de creixement de fibroblasts bàsic.

FL: fosfolípids.

FPLC: cromatografia líquida ràpida de proteïna (fast protein liquid chromatography).

GGE: gel en gradient no desnaturalitzant.

GM-CSF: factor estimulant de colònies de granulòcits i monòcits.

GS/GSH: glutatió/glutatió reduït.

HAEC: cèl.lules endotelials d'aorta humana.

Hcy: homocisteïna.

HDL: lipoproteïna d'alta densitat.

HETE: àcid hidroxieicosatetraenoic.

HEPES: àcid N-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfònic.

7^{hy}Ch: beta-hidroxicolesterol.

HF: hipercolesterolèmia familiar.

HHE: hidroxihexanal.

HL: hepaàtic lipasa.

HNE: hidroxinonenal.

HODE: àcid hidroxiocadecadienoic.

HPLC: cromatografia líquida d'alta resolució.

HSL: lipasa sensible a hormones.

HTA: hipertensió arterial.

HTG: hipertrigliceridèmia.

HTA: hipertensió arterial.

HUVEC: cèl.lules endotelials de vena umbilical humana.

ICAM-1: molècula d'adhesió intercel.lular.

IC₅₀: concentració inhibidora del 50% de la unió total.

IDL: lipoproteïna de densitat intermitja.

IFN: interferó.

IκB: inhibidor del factor nuclear kappa B.

IL: interleuquina.

K_D: constant d'afinitat.

K_i: constant d'inhibició.

L: lligand.

LDH: lactat deshidrogenasa.

LDL: lipoproteïna de baixa densitat.

LDL(+), NL-LDL(+) o HF-LDL(+): lipoproteïna de baixa densitat electropositiva, de NL o d'HF.

LDL(-), NL-LDL(-) o HF-LDL(-) : lipoproteïna de baixa densitat electronegativa, de NL o d'HF.

LDLac: LDL acetilada.

cLDL: colesterol d'LDL.

LDL_{mm}: LDL mínimament modificada.

LDL_{ox}: LDL oxidada.

rLDL: receptor de la lipoproteïna de baixa densitat.
LCAT: lecitín colesterol aciltransferasa.
LOX: receptor d'LDLox del tipus lectina.
Lp(a): lipoproteïna a.
LPDS: sèrum deficient en lipoproteïnes.
LpL: lipoproteïn lipasa.
LPS: lipopolisacàrid.
LRP: proteïna relacionada amb el rLDL.
m/z: relació massa/càrrega
MCP-1: proteïna quimiotàctica de monòcits.
M-CSF: factor estimulant de colònies de monòcits.
MDA: malondialdehid.
ME: metil éster.
MMP: metaloproteinasa de matriu.
MTT: dimetiltiazoldifeniltetrazoli.
NAC: N-acetilcisteïna.
NANA: àcid N-acetilneuramínic.
NEFA: àcids grassos no esterificats.
NF-kB: factor nuclear kappa B.
NL: normolipèmics.
NO: òxid nítric.
eNO: òxid nítric endotelial.
iNO: òxid nítric induïble.
NOS: òxid nítric sintasa.
PAF: factor activador plaquetari.
rPAF: receptor del PAF.
PAF-AH: PAF acetilhidrolasa.
PAGE: gel en gradient de poliacrilamida.
PAPC: palmitoil-araquidonil-glicerofosfocolina.
PAI: inhibidor de l'activador del plasminogen.
PBS: tampó salí fosfat.
PDGF: factor de creixement derivat de plaquetes.
PECAM: molècula d'adhesió de plaquetes i cèl.lules endotelials.
PLA2: fosfolipasa A 2.
PM: pes molecular.
PMA: forbol 12-miristat 13-acetat.
PG: proteoglicans.
PGI2: prostaciclina.
PPAR: receptor de l'activador de proliferació peroxisomal.

PTEC: proteïna transferidora d'èsters de colesterol.
PUFA: àcids grassos poliinsaturats.
Rf: recorregut de les bandes.
RMN: ressonància magnètica nuclear.
SBF: sèrum boví fetal.
SDS: dodecilsulfat sòdic
E-selectina: selectina endotelial.
L-selectina: selectina leucocitària
P-selectina: selectina plaquetària.
SMasa: esfingomielinasa.
SMC: cèl.lules musculars llises.
SR: receptor escombriaire (scavenger).
SRA, SRB, SRC... : receptor escombriaire del tipus A, B, C....
SREC: receptor escombriaire de cèl.lules endotelials.
TBARS: substàncies reactives amb l'àcid tiobarbitúric.
TBS: tampó tris salí.
THF: tetrahidrofurà.
TG: triglicèrids.
TGRLP: lipoproteïnes riques en triglicèrids.
TEMED: tetrametiletilediamina.
TF: factor tissular.
TMS: trimetilsililèter.
TNBS: àcid trinitrobenzensulfònic.
TNF: factor de necrosi tumoral.
TX: tromboxà.
UA: unitats d'absorbància.
VCAM: molècula d'adhesió de cèl.lules vasculars.
VEGF: factor de creixement vascular.
VLA-4: antígen molt tardà 4.
VLDL: lipoproteïna de molt baixa densitat.
rVLDL: receptor de l'VLDL.
WB: western blot.
WHHL: conills Watanabe amb hiperlipèmia heredable.

RESUM

L'LDL electronegativa (LDL(-)) és una fracció modificada de l'LDL total present en circulació. Vàries evidències indiquen que l'LDL(-) pot presentar característiques aterogèniques, ja que se suggereix que podria estar mínimament oxidada. En la present tesi s'han estudiat les propietats de l'LDL(-) procedent d'individus normolipèmics (NL) i hipercolesterolèmics (HF). Es van avaluar els següents aspectes:

1) Característiques fisico-químiques. La proporció d'LDL(-) en HF va ser major, aproximadament el doble, que en NL. No es van trobar evidències de que l'LDL electronegativa fos una forma oxidada, si no que la seva càrrega negativa es pot generar pel seu major contingut en àcid siàlic, en àcids grassos lliures (NEFA) i en apoliproteïnes E i CIII. D'altra banda, s'observà heterogeneïtat de l'LDL(-) quant al seu origen, ja que, entre l'LDL(-) de NL i HF es van observar diferències en grandària, densitat, i composició.

2) Interacció amb els receptors celulars. L'LDL(-) presentà menor afinitat pel receptor de LDL (rLDL) en fibroblasts que la forma nativa. Tanmateix, no va ser reconeguda pel receptor scavenger, ja que no va induir la formació de ésters de colesterol en macròfags. Això implicaria un major temps de permanència en circulació de la partícula i, per tant, la possibilitat d'estar sotmesa a modificacions. A més, aquest fet deu estar relacionat amb l'elevada proporció d'LDL(-) en pacients HF.

3) Contingut en NEFA de l'LDL. L'LDL enriquida en NEFA "in vitro" a nivells similars als de l'LDL(-) reproduí en gran part les propietats d'aquesta partícula, incloent una major càrrega negativa, canvis en la susceptibilitat a l'oxidació i una menor afinitat pel rLDL.

4) Potencial inflamatori de la partícula. L'LDL(-) d'ambdós tipus de subjecte presentà propietats inflamatòries, ja que, a concentracions fisiològiques, va induir, sense producció de citotoxicitat, l'expressió de les quimioquines MCP-1 i IL-8 per part de cèl·lules endotelials. Aquesta inducció es podria atribuir a un major contingut en NEFA i/o en fosfolípids fragmentats per part de l'LDL(-). No obstant això, no va produir un augment significatiu en PAI-1 ni VCAM respecte a la fracció nativa.

En conclusió, l'LDL(-) és una partícula potencialment aterogènica degut a que presenta una densitat alterada, una menor afinitat pel rLDL i té la capacitat d'induir MCP-1 i IL8 en cèl·lules endotelials.