

INTRODUCCIÓ

1-ESTRUCTURA I METABOLISME DE LES LIPOPROTEÏNES

1.1 INTRODUCCIÓ

Els lípids tenen diferents funcions fisiològiques: estructural, en la formació de membranes, energètica i precursora d'hormones esteroidees, prostaglandines i àcids biliars. Els lípids són apolars i per tant han de ser transportats en circulació solubilitzats en forma de lipoproteïna, que són partícules esfèriques o discoidals, formades per complexes de lípid i proteïna. La fracció proteïca és variable entre les diferents lipoproteïnes circulants, entre 1-60% de la masa total, i està constituïda per diferents apolipoproteïnes, que tenen fonamentalment dues funcions: el transport i la metabolització dels lípids. La part lipídica de les lipoproteïnes consta de lípids apolars (triglicèrids i ésters de colesterol) que formen el nucli hidrofòbic i de lípids amb una relativa polaritat (colesterol lliure i fosfolípids) situats en la superfície juntament amb les apolipoproteïnes. També formen part de les lipoproteïnes, en petites quantitats, diferents enzims i altres molècules lipofíliques, com els carotens, tocoferol, ubiquinol o els flavonoids, els quals tenen importants funcions biològiques.

Les lipoproteïnes presenten una gran heterogeneïtat quant a composició, grandària, funció i altres propietats. S'han classificat clàssicament segons la seva densitat, degut a que s'aïllen per ultracentrifugació en funció de llur densitat hidratada (Havel 1955). D'aquesta manera s'estableix la classificació, de menor a major densitat, en: quilomicrons, lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL), lipoproteïnes de densitat intermitja (IDL), lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), i lipoproteïnes d'alta densitat (HDL). Amb una densitat entre l'LDL i l'HDL es troba la lipoproteïna(a) o Lp(a). Dins d'aquestes lipoproteïnes principals es poden diferenciar subclasses de tamany i densitat variable.

1.2 TIPUS DE LIPOPROTEÏNES

a) Quilomicrons (densitat < 0.96 kg/L): Els quilomicrons són partícules sintetitzades a l'intestí, de gran tamany i alt contingut en triglicèrids. La seva funció és el transport exògen de lípids, ja que transporten els lípids de la dieta fins a la circulació. Els quilomicrons tenen una vida mitja curta, sent hidrolitzats ràpidament per la lipoproteinlipasa (LpL) endotelial. Les apolipoproteïnes que formen part dels quilomicrons són d'origen intestinal com l'apoB-48 o productes de bescanvi circulant com les apoA-I, apoE, apoC-II i apoC-III.

b) VLDL (d= 0.96-1.006 kg/L): L'VLDL es sintetitza al fetge i presenta també un contingut elevat en triglicèrids, però és de menor tamany i major densitat que els quilomicrons. La seva funció és el transport dels triglicèrids des del fetge fins als teixits d'emmagatzematge o ús metabòlic. L'VLDL és també metabolitzada per la LpL. Les apolipoproteïnes principals de l'VLDL són: apoB-100, apoE, apoC-II i apoC-III.

c) IDL (d=1.006-1.019 kg/L): Com a resultat de la metabolització de l'VLDL s'origina l'IDL, la qual conserva l'apoB-100 i l'apoE, lligands pels receptors cel·lulars, però perd en la metabolització la major part de les apoCs, sobretot l'apoC-II. En conseqüència, l'IDL no pot ser degradada per la LpL i s'hidrolitza per la lipasa hepàtica (HL) donant lloc a les partícules d'LDL. L'IDL es troba normalment en baixes concentracions en circulació, però està augmentada en determinades patologies.

d) LDL (d=1.019-1.063 kg/L): A partir de la metabolització de l'VLDL i de l'IDL es forma l'LDL. L'LDL és molt rica en colesterol, ja que transporta aproximadament el 70% del colesterol plasmàtic, des del fetge cap als teixits perifèrics. Les cèl·lules capturen el colesterol transportat per l'LDL a través del receptor d'LDL (rLDL) que reconeix com a lligand l'apoB-100. Quan l'LDL es troba en concentracions excessives o químicament modificada és una lipoproteïna altament aterogènica.

e) Lp(a) (d=1.050-1.100 kg/L): L'Lp(a) és una lipoproteïna de síntesi hepàtica, amb estructura com la de l'LDL però contenint una apolipoproteïna addicional, l'apo(a), que es troba unida a l'apoB-100 mitjançant un pont disulfur produït

extracel.lularment per modificació postsintètica. L'lp(a) és també aterogènica quan les seves concentracions plasmàtiques es troben augmentades.

f) HDL (d=1.063-1.210 kg/L): L'HDL té com a funció mobilitzar el colesterol dels teixits perifèrics cap al fetge, on s'elimina com a sals biliars, portant a terme el transport revers del colesterol. Per tant, l'HDL té un paper protector en l'aterosclerosi. L'HDL es forma com a una partícula discoidal, rica en proteïnes, fosfolípids i colesterol lliure: l'HDL naixent, la qual pot tenir origen hepàtic o formar-se a partir de components de la superfície de quilomicrons i VLDL. Després, l'HDL pateix un procés de maduració, en què estan implicades la HL, la lecitín colesterol aciltransferasa (LCAT) i la proteïna transferidora d'ésters de colesterol (PTEC). L'HDL naixent es va transformant progressivament en HDL3, HDL2 i HDL1. L'HDL conté activitat paraoxonasa, LCAT, PTEC i les apolipoproteïnes apoA-II, apo-E, apo-Cs, apo-D i sobretot l'apoA-I. La interacció entre les diferents lipoproteïnes dóna lloc a un metabolisme complex, el qual es tractar de simplificar esquemàticament a la següent Figura.

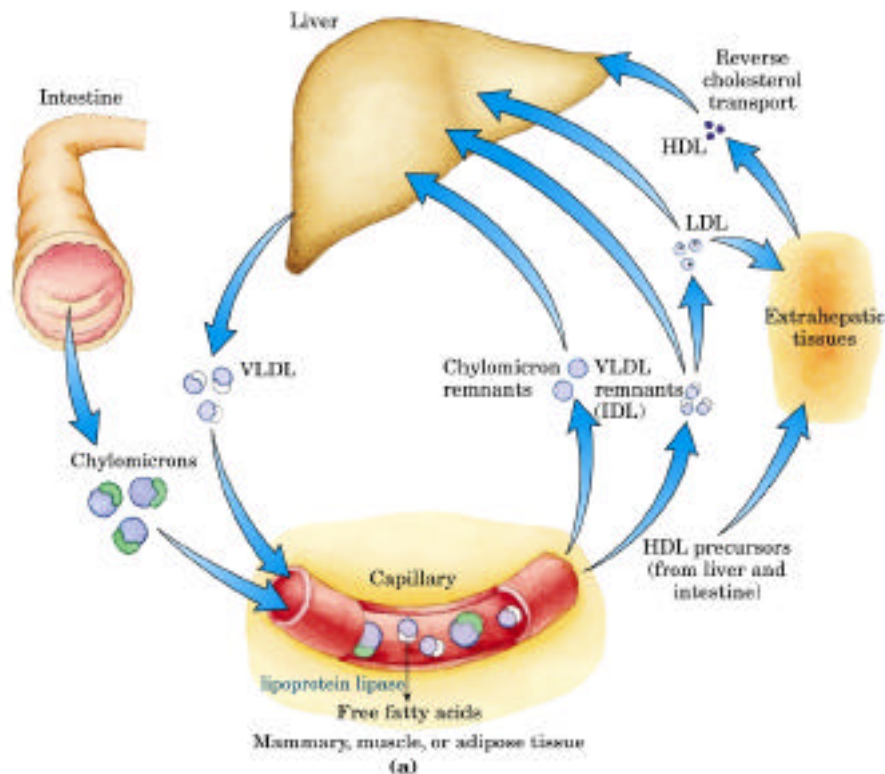


Figura 1. Esquema general del metabolisme de les lipoproteïnes.

2-PATOGENIA DE L'ATEROSCLEROSI

2.1 TEORIES SOBRE L'ORIGEN DE LA LESIÓ ATEROSCLERÒTICA

L'aterosclerosi és un procés multifactorial en què es produeix un engruixament de la capa íntima de la paret arterial amb un consegüent estretament de la llum vascular. La lesió ateroscleròtica pot afavorir la formació de trombus que contribueixen a potenciar l'obturació del vas i com a resultat es pot produir isquèmia a la zona irrigada pel vas oburat. La lesió fonamental del procés ateroscleròtic és la placa ateromatosa en què es troben els següents components (Movat 1959, Haust 1971, Ross 1976, Wolff 1988):

- Cèl.lules sanguínees, bàsicament monòcits-macròfags, però també neutròfils i limfòcits.
- Proliferació de cèl.lules musculars llises (SMC).
- Teixit conjuntiu extracel.lular: teixit elàstic, col.làgen, proteoglicans.
- Ceroid que són complexos de lípids, sobretot colesterol oxidat, amb proteïna.
- Restes necròtics.
- Esporàdicament acúmuls plaquetaris associats a l'endoteli.
- Calci, que de vegades es troba en estadis avançats de la lesió.

En la figura 2, que es presentarà al següent apartat, es troba representada una placa ateromatosa en diferents estats d'evolució en què estan representats tots aquests components.

L'aterosclerosi és un procés complexe en què es troben molts factors implicats, respecte al seu origen han estat hipotetitzades diverses teories.

- Virchow (Virchow 1856) ja postulà que el desenvolupament de la placa ateromatosa podria ser en resposta a una lesió de la paret arterial.
- La hipòtesi trombogènica (Marchand 1904) suggeria que la proliferació de SMC i la deposició de fibrina eren les causants de l'engruixament de l'íntima, restant-li importància a la implicació dels lípids.
- La teoria lipídica (Antischkōw 1913) indicava que la major entrada de lípids cap a la paret arterial en front als mecanismes d'eliminació era responsable de l'acumulació lipídica.

Posteriorment a aquestes teories i, com a conseqüència dels coneixements al llarg del segle, va sorgir la teoria multifactorial.

- La teoria multifactorial apunta que diversos mecanismes patogènics, com els lípids, la hipertensió arterial, factors coagulants, i molts altres, contribueixen a la formació de la placa. Hi han dos vessants respecte a aquesta teoria, en funció del fet causant, suficient i necessari, de l'origen de la lesió. La hipòtesi de la resposta a la lesió, formulada per Ross, Glomset i col.laboradors, defensa que la causa originària del procés ateroscleròtic és una lesió endotelial, amb o sense denudació de l'endoteli, que provoca una pèrdua de la seva funcionalitat. En canvi, la teoria proposada per Williams i Tabas dóna un rol principal a la infiltració i retenció de lipoproteïnes a la íntima com a fet originador de la placa ateroscleròtica.

a) Hipòtesi de la resposta a la lesió proposada per Ross el 1976 i posteriorment actualitzada (Ross 1986, 1993 i 1999, DiCorleto 1993) indica que l'origen de la placa ateromatosa és una lesió endotelial. En les últimes revisions d'aquesta hipòtesi, ja no es considera que la lesió a l'endoteli impliqui necessàriament denudació, sinó que pot ser simplement una pèrdua de funcionalitat induïda per un agent nociu extern com un virus, bacteri, hipertensió, LDL, homocisteïna,

tabaquisme, toxines, etc. A causa d'aquest dany endotelial, es produeix una modificació funcional de l'endoteli, donant lloc a una activació que comporta, com a conseqüència, una resposta inflamatòria. Aquesta activació endotelial pot tenir com a conseqüència un augment de la permeabilitat a les lipoproteïnes aterogèniques (Ross 1990, Nielsen 1992, Nordestgaard 1994), relacionant doncs aquesta teoria amb la hipòtesi de la infiltració lipídica.

b) Hipòtesi de la infiltració i retenció de les lipoproteïnes la qual postula com a fet central iniciador de la lesió la retenció subendotelial de les lipoproteïnes (Williams 1995 i 1998). Hi han diferents estudis que donen suport a aquesta idea, com els de Schwenke i Carew (Schwenke 1989a i b), en què es considera que la clau en l'inici de la lesió és la retenció de les lipoproteïnes, i no necessàriament una major permeabilitat de l'endoteli, malgrat que pot ser un factor que hi contribuïxi. Resumint, aquesta teoria proposa que l'aterogenicitat de les lipoproteïnes amb apoB depèn de quatre factors: la seva concentració plasmàtica, l'influx de les mateixes versus l'eflux en la paret arterial, la modificació de les lipoproteïnes retingudes i la resposta inflamatòria que aquest darrer fet provoca (Pentikainen 2000).

El procés de retenció de les lipoproteïnes es produeix en la matriu extracel·lular del subendoteli (Srinivasan 1986), la qual està formada bàsicament per proteoglicans i col·lagen, on intervindrien una sèrie de molècules, les quals es poden expressar en diferent grau a la paret arterial, com la esfingomielinasa (SMasa), la lipoproteïnlipasa (LpL), però sobretot els proteoglicans (PG) com a principals responsables de la retenció de l'LDL (Linden 1989, Ismail 1994). Com a conseqüència del segrest de lipoproteïnes aterogèniques a l'íntima endotelial, aquestes es modificarien, produïnt-se oxidació (Camejo 1985, Linden 1989) i agregació de la partícula (Camejo 1993, Maor 2000). Aquestes modificacions

comportarien una sèrie d'efectes que serien claus pel desenvolupament de la lesió ateroscleròtica. Existeixen proves "in vivo" que corroboren aquesta hipòtesi. En estudis amb ratolins transgènics que presenten una unió defectiva de l'apoB a PG , presenten menys aterosclerosi (Boren 98a i 98b). A més, induint hipercolesterolèmia el fet més primerenc que es detecta, en dues hores, és la retenció i agregació de les lipoproteïnes (Schwenke 1989b, Nievelstein 1991).

La teoria multifactorial en l'inici de la lesió és la més acceptada actualment, tant si es considera que el fet central que ocasiona l'origen d'aquesta lesió és un dany endotelial o bé la retenció de les lipoproteïnes. Ambdues idees estan íntimament relacionades i el fenomen que es desenvolupa és una resposta immune i inflamatòria.

2.2 EVOLUCIÓ DE LA PLACA ATEROMATOSA

El procés ateroscleròtic és progressiu, s'inicia amb la aparició de l'estria de greix que es pot complicar degut a la producció de de citoquines, factors de creixement i diferents molècules inflamatòries que provoquen migració i creixement cel.lular, mort cel.lular i deposició de matriu extracel.lular. D'aquesta manera, l'estria de greix evoluciona cap a la formació d'una lesió fibrolipídica la qual es pot fisurar i originar un problema trombòtic.

La Figura 2 ofereix una visió global de la lesió ateroscleròtica i es poden observar els diferents estadis de la lesió, així com els principals factors implicats, la funció i origen dels quals es detallarà a l'apartat 3.

- disfunció endotelial
- infiltració de l'LDL a la íntima
- acció de molècules inflamatòries
- retenció i modificació de l'LDL
- proliferació SMC
- formació de cèl.lules espumes
- més proliferació i migració SMC
- secreció de matriu extracel.lular
- gran acumulació lipídica
- creixement i/o trencament de la placa

Figura 2. Esquema de la teoria multifactorial de l'origen de la placa ateromatosa, unificant les dues teories, la de la resposta a la lesió i la de la retenció de les lipoproteïnes. S'indica l'evolució de la formació de la lesió, amb les diferents fases: lesió inicial, estria de greix i lesió avançada. També s'indiquen diferents components implicats en aquest procés (quimioquines, molècules d'adhesió, etc). En vermell s'indica l'efecte de l'LDL electronegativa (LDL(-)) que s'explicarà posteriorment.

L'estria de greix és el primer estadi de la lesió, està bàsicament formada per cèl·lules espumoses, sobretot macròfags i SMC, les quals estan carregades de lípids. Els monòcits circulants són atrets per quimioquines produïdes per l'endoteli i penetren a l'espai subendotelial on es transformen en macròfags, els quals captan descontroladament formes modificades d'LDL, amb major càrrega negativa, a través del receptor scavenger (SR), com s'explicarà posteriorment. Aquest fet comporta l'acumulació intracel·lular de lípids en forma d'ésters de colesterol de forma massiva, originant-se les esmentades cèl·lules espumoses.

L'estria de greix progressa degut a l'expressió de factors quimiotàctics i de creixement produïts per les cèl·lules constituents de la paret arterial: cèl·lules endotelials (EC), cèl·lules musculars llises (SMC), i també macròfags i limfòcits. La secreció d'aquests factors indueix, entre d'altres efectes, la migració i proliferació de les SMC. Les SMC, un cop a l'espai subendotelial, passaran a desenvolupar un fenotip sintètic amb secreció de teixit conjuntiu extracel·lular, com col·lagen i proteoglicans. Aquest fenomen dona lloc a la lesió fibròtica, que si presenta un nucli lipídic es forma la lesió fibrolipídica que és més inestable.

La lesió fibròtica és rica en matriu extracel·lular, però no presenta acúmul lipídic perquè les cèl·lules apoptòtiques s'aclareixen per fagocitosis abans de que es buidïn i alliberin els lípids acumulats intracel·lularment. En canvi, a la lesió fibrolipídica es forma un nucli lipídic, a partir de lípids derivats de l'acumulació a les cèl·lules espumoses, ja que els macròfags no s'eliminen i es fan necròtics. Per tant, a la lesió fibrolipídica existeix un nucli lipídic a la part central de la placa, format per ceroid insoluble, que està rodejat de la part fibrosa. Aquest tipus de lesió rica en lípids és més fràgil i es pot trencar per acció del fluxe sanguini o d'altres mecanismes encara no ben coneguts. En trencar-se la placa, es pot taponar l'arteria en què es troba situada o bé la mateixa placa pot arribar a ser trombogènica, al quedar exposades a circulació activitats procoagulants com el tissue factor (TF).

Quan es produeix el fenomen de la coagulació té lloc una acumulació de plaquetes i de fibrina en la llum vascular, fet que pot ocluir el vas i originar trombosi.

3- PAPER DE DIFERENTS MOLÈCULES I FACTORS EN LA LESIÓ

En el procés ateroscleròtic les cèl.lules vasculares presents a la lesió sintetitzen diferents citoquines, factors de creixement i mediadors de la inflamació que contribueixen al desenvolupament del procés ateroscleròtic. Aquests factors involucrats en la progressió de la lesió tenen efectes interrelacionats i poden presentar diferents efectes segons el tipus cel.lular o el microambient sobre el qual actuen. La seva inducció pot ser deguda a diferents estímuls, un dels quals és l'LDL, especialment quan la molècula es troba modificada, com s'explicarà a l'apartat 4, i induïx l'expressió de diferents molècules inflamatòries com la (MCP-1) o les interleuquines 8 i 1 (IL-8 o IL-1). La interacció entre tots aquests factors és encara poc coneguda, sent aquest camp l'objectiu de molts treballs dins de la investigació cardiovascular.

A continuació, i de forma resumida, s'enumeren en forma de taula (Taula 1) els principals factors involucrats al procés ateroscleròtic, indicant a quina família de molècules pertanyen, quines cèl.lules els produeixen i el seu efecte. Entre tots aquests factors, als apartats 3.1 i 3.2 es comentaran amb més detall les molècules d'adhesió i les quimioquines, les quals actuen sinèrgicament tenint com a rol central l'atracció de leucòcits als llocs d'inflamació, que és un fenomen primerenc en l'inici de la lesió ateroscleròtica.

Taula 1. Principals molècules i factors implicats a l'origen i desenvolupament de la lesió ateroscleròtica.

Família de molècules	Molècules	Paper a la lesió	Principals cèl.lules productores
Molècules d'adhesió	VCAM ICAM E / P-Selectina	Adhesió de leucòcits	EC EC EC/plaquetes
Quimioquines	MCP-1 IL-8	Reclutament de monòcits Reclutament de limfòcits i neutròfils	EC, macròfags
Citoquines	IL-1 TNF- IL-6, IL-2, IFN	Inducció i amplificació de resposta inflamatòria	EC, macròfags, SMC
Factors de creixement	M-CSF/ GM-CSF PDGF VEGF bFGF	Creixement monòcits/granulòcits Proliferació SMC i EC Proliferació SMC Proliferació fibroblasts	EC, macròfags, SMC
Factors implicats a coagulació	TF PAI-1	Activador de la coagulació Inhibició de la fibrinolisi	EC, macròfags, SMC EC
Prostaglandines	tromboxà (TX) prostaciclina(PGI ₂)	Contracció SMC i agregació plaquetes Inhibició agregació plaquetària	plaquetes, EC, SMC EC
Factors vasodilatadors	eNO iNO ET (endotelina)	Vasodilatació Vasodilatació Vasoconstricció	EC macròfags EC
Enzims hidrolítics	MMP	Degradació matriu extracel.lular	macròfags

Abreviatures de la Taula 1:

VCAM: molècula d'adhesió de cèl.lules vasculars; ICAM: molècula d'adhesió intercel.lular; MCP-1: proteïna quimiotàctica de monòcits; IL: interleuquina; TNF: factor de necrosi tumoral; IFN: interferó; M i GM-CSF: factor estimulator de colònies de monòcits i granulòcits; PDGF, VEGF, bFGF: factors de creixement de plaquetes, vascular i de fibroblasts, respectivament; TF: factor tissular; PAI: inhibidor de l'activador del plasminogen; TX: tromboxà; PGI₂: prostaciclina; ET: endotelina; eNO i iNO: òxid nítric endotelial i induïble; MMP: metaloproteinases de matriu.

3.1 MOLÈCULES D'ADHESIÓ

La migració i unió de leucòcits a la paret arterial és un event primerenc en l'aterogènesi (Ross 1993). De fet, l'aterosclerosi és un desordre crònic en què hi ha un sobre-reclutament de leucòcits a la íntima endotelial (Ross 1999). L'expressió de molècules d'adhesió a l'endoteli és necessària per a que tingui lloc aquest fenomen, produint-se, com a resultat, una resposta inflamatòria que iniciarà el procés ateroscleròtic

Les cèl.lules endotelials expressen de forma constitutiva PECAM-1 (molècula d'adhesió de les plaquetes amb cèl.lules endotelials) i ICAM-1 (molècula d'adhesió intercel.lular). Però en resposta a diferents estímuls inflamatoris, les cèl.lules endotelials (EC) poden expressar i activar molècules d'adhesió específiques, per definir el tipus de leucòcit reclutat. De manera que el tractament amb determinades citoquines indueix l'expressió de E-selectina i VCAM-1 (molècula d'adhesió de cèl.lules vasculars) i també pot regular els nivells constitutius d'ICAM-1.

3.1.1 CLASSIFICACIÓ DE LES MOLÈCULES D'ADHESIÓ

Les molècules d'adhesió que bàsicament estan implicades en el reclutament de leucòcits a les àrees d'inflamació a l'endoteli es poden dividir en els següents grups (Malik 1996):

a) Selectines. Són membres d'una mateixa família gènica. Tenen un domini lectina-like, depenent de calci, que interacciona amb els carbohidrats de leucòcits i EC. Es poden dividir en: P-selectina (en EC i també en plaquetes activades), L-selectina (en leucòcits) i E-selectina (en EC).

- b) Integrines. Són glicoproteïnes que posseeixen subunitat α i β , es troben en leucòcits i estan implicades en la unió amb molècules d'adhesió de la supefamília de les immunoglobulines. Alguns exemples són la LFA-1 i la VLA-4
- c) Superfamília de les immunoglobulines. S'expressen a EC entre elles es troben: ICAM, VCAM-1 i PECAM-1. La unió pot ser homofíllica, entre dos molècules d'aquesta superfamília, o heterofíllica amb integrines. La ICAM-1 s'uneix a 2-integrines dels leucòcits (CD11/CD18 o LFA-1). LA VCAM-1, en canvi, està implicada en la unió de monòcits i també de limfòcits mitjançant la molècula VLA-4 (very late antigen 4).

3.2 QUIMIOQUINES: MCP-1 I IL-8

L'MCP-1 (proteïna quimioattractant de monòcits) i l'IL-8 (interleuquina 8) són dues quimioquines amb especial implicació en el procés ateroscleròtic. Les quimioquines o citoquines quimiotàctiques constitueixen una família formada per més de trenta petits polipèptids (8-11 kDa) homòlegs, secretats i induïbles per diferents factors. Presenten en comú quatre residus de cisteïna conservats i en funció dels residus que separen les dues primeres cisteïnes es subdivideixen bàsicament en: C-C (subfamília α), C-X-C (subfamília β), i una nova subfamília CX3C. Les quimioquines modulen les reaccions inflamatòries, ja que indueixen la migració dels leucòcits a través de l'endoteli cap als llocs d'inflamació, actuant de forma sinèrgica amb les molècules d'adhesió (Springer 1994). Els receptors de les quimioquines sovint tenen més d'un lligand i les quimioquines en general poden interaccionar amb diferents receptors (Reape 1999).

3.2.1 MCP-1

L'MCP-1 és una quimioquina C-C que s'expressa en EC, monòcits i/o SMC. L'MCP-1 va ser la primera quimioquina que es va considerar implicada en la inflamació mitjançada per leucòcits, sent quimioattractant per monòcits i limfòcits T. El paper de l'MCP-1 en el reclutament de monòcits en la resposta inflamatòria va ser posat de relleu per experiments amb ratolins deficientes en el receptor d'MCP-1, el CCR2, en els quals no es produïa atracció de monòcits (Kuziel 1997, Boring 1997). L'MCP-1 es considera aterogènica promovent l'adhesió a l'endoteli dels leucòcits "in vitro" i "in vivo" (Kuziel 1997). A més l'MCP-1 és abundant en zones riques en macròfags de la lesió ateroscleròtica (Ross 1993, Yla-Herttuala 1991). Hi han dades que indiquen que, apart dels monòcits, també expressen CCR2 les SMC (Hayes 1998) i les EC (Weber 1999), per la qual cosa podria estar implicat en la migració i proliferació d'aquests tipus cel.lulars.

La expressió d'MCP-1 està regulada per diferents factors com el lligand de CD40, IL-1, TNF o LDL oxidada (Rajavashisth 1990, Watson 1997, Frostegard 1997). D'altra banda, també hi han varis factors que regulen l'expressió de CCR2, entre ells les citokines inflamatòries i les lipoproteïnes. La inducció d'MCP-1 sembla ser deguda a l'activació del factor nuclear kappa B, NF-kB (Marumo 1997, Landry 1997), però també s'ha proposat la implicació del receptor de l'activador de proliferació dels peroxisomes, PPAR- (Lee 2000).

3.2.2 IL-8

Pertany a la subfamília de les quimioquines C-X-C, pot ser produïda per EC, macròfags i SMC i presenta activitat quimiotàctica per a neutròfils (Hoch 1996). Les quimioquines IL-8 i GRO són lligands del receptor CXCR1 i CXCR2. Aquestes

quimioquines participen en processos inflamatoris, degut a que actuen com a factors de creixement per EC (Koch 1992), a més són quimioatracients per neutròfils, SMC i limfòcits T (Xu 1995). L'IL-8 és quimioatracient de limfòcits T a una concentració 10 vegades inferior a l'equivalent pel reclutament de neutròfils (Larsen 1989). Els limfòcits T no es troben presents normalment a l'arteria, però quan hi ha formació de placa ateroscleròtica (Jonasson 1986) poden representar al voltant d'un 20% del cap fibrós de la mateixa. Els limfòcits T es creu que desenvolupen un paper regulatori en la patogènesi de l'aterosclerosi, per exemple produint INF (Geng 1992).

L'efecte de l'IL-8 sobre monòcits no és tan conegut. Ha estat proposat que s'indueix expressió de novo d'IL-8 quan es produeix adhesió de monòcits-EC "in vitro" i això podria promoure l'adhesió de monòcits (Schwartz 1994), però existeix controvèrsia en aquest aspecte. D'altra banda hi han dades que indiquen que els macròfags de l'íntima expressen receptor per IL-8 (Chuntharapai 1994). A més, en estudis a l'àrea de lesió "in situ" demostren una abundant expressió d'IL-8 a les cèl.lules espumoses (Wang 1996, Liu 1997).

Entre els estímuls que poden induir l'expressió de IL-8 es troben el dany físic arterial, certes citoquines i formes modificades d'LDL, com l'LDLacetilada o LDLac (Wang 1996), l'LDL mínimament modificada o LDLmm (Schwartz 1994), i l'LDL oxidada o LDLox (Terkeltaub 1994, Brand 1997). El mecanisme a través del qual s'estimula la inducció d'IL-8 és a través dels heterodímers p50/p65 de la família NF- κ B (Muñoz 1996, Brand 1997), però també s'ha descrit la inducció per mitjà de PPAR- (Lee 2000)

A més d'induir quimiotaxi, l'IL-8 també pot tenir efectes sobre l'activació de diferents tipus cel.lulars els quals podrien, a la vegada, desenvolupar activitats pro-aterogèniques oxidant l'LDL o expressant altres mediadors de la inflamació.

3.3 FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ QUE REGULEN GENS IMPLICATS EN L'ATEROCLEROSI.

S'ha descrit que l'expressió de gens que codifiquen per factors que intervenen en el procés ateroscleròtic ve regulada bàsicament pels factors de transcripció NF-kB, AP-1 i PPAR. Aquests factors, en funció de les condicions i l'entorn, poden desenvolupar diferents efectes, alguns de caràcter proaterogènics i altres antiaterogènics.

3.3.1 FACTOR NUCLEAR kB (NF-kB)

L'anomenat NF-kB són complexos dimèrics, formats per combinació de membres de la família Rel/NF-kB que presenten elevada homologia, els quals actuen com a factor de transcripció (Siebenlist 1994). El dímer més abundant és el p50/p65, que indueix molts factors relacionats amb l'aterogènesi que s'indicaran a continuació.

L'activació del NF-kB permet la seva translocació del citoplasma al nucli. Aquest fenomen té lloc a través de la modificació i degradació del inhibidor de NF-kB, que pertany a la família I-kB, el qual es troba unit al factor de transcripció inactivant-lo. El NF-kB regula gens de resposta ràpida, unint-se als seus promotors, els quals estan involucrats majoritàriament en la resposta immune i inflamatòria, com els gens de molècules d'adhesió (E-selectina, VCAM, ICAM) (Baeuerle 1994), citoquines com TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1 (Ylä-Herttuala 1991, Cushing 1990), o d'agents procoagulants com el TF (Drake 1991, Brand 1991). El paper del NF-kB en el procés ateroscleròtic queda patent, a més, pel fet de que es troba present a les cèl.lules vasculars de la lesió i existeix correlació entre la seva presència i el grau de progressió de la lesió (Kaltsmidt 1996).

Hi han diferents senyals activadores de NF-kB entre ells estímuls mitogènics, virus i productes vírics, VEGF, proteoglicans, angiotensina II, trombina, citoquines (IL-1, TNF- α) i formes modificades d'LDL (Calara 1998). L'activació del NF-kB també és sensible a l'estat REDOX (Li 1999, Canty 1999), de manera que l'estrés oxidatiu activa i els antioxidants inhibeixen la traslocació del NF-kB.

3.3.2 PROTEÏNA ACTIVADORA 1 (AP-1)

La proteïna activadora o AP-1 és altre factor de transcripció implicat en la regulació de gens que afecten a la funció endotelial. L'AP-1 està constituïda per un complex homo o heterodimèric de membres de la família jun i fos (Angel 1991). El motiu d'unió AP-1 és recurrent en el promotor de molts gens que afavoreixen la conversió d'EC cap a un estat proinflamatori i procoagulant, com els que codifiquen per molècules d'adhesió i quimioquines: ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, tissue factor, o MCP-1 (Martin 1997, Wang 1999). En alguns casos la inducció via l'AP-1 és independent del NF-kB, però en d'altres AP-1 i NF-kB poden interaccionar sinèrgicament, com en l'expressió de VCAM-1 (Zhu 1999) o MCP-1 (Martin 1997). Això suggereix la implicació de diferents senyals reguladores d'activació de les EC en la inducció de determinats gens.

3.3.3 RECEPTORS DE L'ACTIVADOR DE PROLIFERACIÓ PEROXISOMAL (PPAR)

Els PPAR són receptors nuclears que s'activen per unió d'un lligand, adquirint la funció de factor de transcripció. Els PPAR formen heterodímers amb RXR (receptor de cis-retinoic) per activar-se. Molts gens del metabolisme lipídic estan regulats per PPAR, però també regulen gens que controlen productes de resposta

inflamatòria. S'ha descrit que el PPAR- α s'expressa en cèl.lules endotelials de vena umbilical i d'aorta humana (HUVEC i HAEC) i es pot activar per LDLmm, induint l'expressió d'IL-8 i MCP-1 (Lee 2000). El PPAR- α s'ha trobat a macròfags, on estimula la diferenciació de monòcits i la inducció de CD36 (Nagy 1998, Tontonoz 1998), i també a cèl.lules endotelials, on s'ha descrit que per una banda pot inhibir l'expressió de MCP-1 (Murao 1999, Zhu 1999, Kintscher 2000), i per altra induir ICAM-1 (Chen 1999).

4-IMPLICACIÓ DE L'LDL EN EL PROCÉS ATEROGÈNIC

4.1 PROVES DE L'ATEROGENICITAT DE L'LDL. HIPERCOLESTEROLÈMIA FAMILIAR (HF)

Com s'ha esmentat a les teories sobre l'origen de la lesió ateromatosa els lípids estan implicats en el procés ateroscleròtic, i fonamentalment es considera que l'LDL desenvolupa el paper principal. Hi han moltes proves en què s'associa el risc cardiovascular i les disfuncions lipídiques. Ja a partir dels anys setanta es començà a veure aquesta relació entre risc a patir malaltia cardiovascular i nivells plasmàtics elevats de triglicèrid i colesterol total a través d'estudis epidemiològics transversals i longitudinals (Dawber 1980, Stokes 1988). Dins de les lipoproteïnes, l'LDL (lipoproteïna de baixa densitat) és la considerada com a la més aterogènica. Aquesta consideració ve donada per l'observació de que a la lesió ateroscleròtica es troben acumulacions lipídiques on predominen diverses formes de colesterol oxidat. Com l'LDL transporta el 70% del colesterol plasmàtic, és evident considerar que l'LDL està fortament implicada en el procés ateroscleròtic. A més, el paper aterogènic de l'LDL està reafirmat per estudis d'intervenció dietètica o farmacològica.

Una clara evidència genètica que corrobora el caràcter aterogènic de l'LDL és el cas de la hipercolesterolèmia familiar monogènica (HF), la qual és una patologia que cursa amb nivells de colesterol molt elevats, aparició de xantomes i altres signes clínics com l'arc corneal prematur i risc cardiovascular augmentat (Müller 1938). Aquests individus presenten incrementats els nivells plasmàtics d'LDL perquè metabolitzen aquesta partícula més lentament (Fredrickson 1967). La causa va ser descoberta als anys 70 per Goldstein i Brown, la qual es deu a una alteració al gen del receptor de l'LDL (rLDL o receptor d'apo B/E). Degut a la falta total o parcial de rLDL funcional, augmenten els valors plasmàtics d'LDL i es produeix una hipercolesterolèmia, amb el consegüent risc ateroescleròtic (Goldstein 1983a, Hobbs 1992). Les mutacions al receptor es poden dividir en grups (Russell 1987) segons a quin nivell afectin al receptor: la síntesi, el transport del reticle endoplasmàtic a l'aparell de Golgi, la unió a l'LDL, la internalització o el reciclatge del receptor.

L'hipercolesterolèmia familiar presenta un patró d'herència autosòmica dominant, podent-se expressar de forma homozigota o heterozigota. En tots dos casos el risc aterogènic és alt, el cas més greu, però, són els homozigots, amb prevalència aproximada de 1/1000000, ja que, al presentar els dos alels del gen de rLDL mutats, no expressen receptors funcionals. Aquests pacients tenen incrementat el valor de colesterol plasmàtic 4-5 vegades sobre els nivells considerats com a desitjables, problemes cardiovasculars greus i baixa esperança de vida, ja que en general presenten infart abans dels 30 anys. Els heterozigots HF, amb prevalença de 1/500, presenten tan sols al voltant de la meitat dels receptors funcionals i, com a conseqüència, tenen el doble de colesterol que un individu normal i alt risc aterogènic (Goldstein 1983a). Els heterozigots de vegades no expressen manifestació clínica fins a edats tardanes i quan ho fan els símptomes són dipòsits lipídics: arc corneal, xantomes (als tendons). Si els pacients no controlen els seus nivells de colesterol poden evolucionar presentant malaltia cardiovascular prematura.

Amb aquesta evidència queda palesa la importància pel metabolisme del colesterol del correcte aclariment plasmàtic de l'LDL, tasca que porta a terme el rLDL.

4.2 EL RECEPTOR D'LDL (rLDL).

4.2.1 FAMÍLIA DEL rLDL

La família del rLDL consisteix en una sèrie de receptors transmembrana glicosilats, els quals es troben a la superfície cel.lular i requereixen calci per a unir els diferents lligands amb què interaccionen. Els lligands que s'uneixen als membres d'aquesta família no comparteixen homologia a la seqüència, però sí presenten dominis bàsics, de càrrega positiva, rics en arginina i lisina, que semblen ser els responsables de la unió degut al potencial electrostàtic negatiu de la superfície dels receptors. Els lligands captats de l'ambient extracel.lular són internalitzats i degradats en els lisosomes pel procés d'endocitosi mitjançada per receptor. Aquests receptors comparteixen motius estructurals i propietats funcionals. Els seus membres més estudiats són rLDL, LRP (proteïna relacionada amb el rLDL), megalina, rVLDL (extrahepàtic) i apoEr2 (Hussain 2001).

4.2.2 EL RECEPTOR D'LDL (rLDL)

El rLDL ha estat àmpliament estudiat, sobretot per l'equip de Goldstein i Brown durant les dècades del 70-80, de manera que es coneix amb detall la seva estructura i fisiologia. El rLDL té la funció de regular els nivells plasmàtics d'LDL, i també d'VLDL (lipoproteïna de molt baixa densitat) i IDL (lipoproteïna de densitat intermitja) (Kita 1982). Per tant, capta i metabolitza lipoproteïnes que contenen apoB100 i apoE, i al mateix temps proporciona colesterol a les cèl.lules. La captació

de l'LDL pel rLDL va ser primer descrita en fibroblasts (Brown 1979). El colesterol obtingut de les lipoproteïnes és necessari per a les cèl.lules per a la síntesi de les membranes, d'hormones esteroidees i de sals biliars.

El rLDL és una cadena peptídica de 839 aminoàcids que es sintetitza al retícul endoplasmàtic rugós en forma de precursor de 120 kDa. Posteriorment, es glicosila a l'aparell de Golgi i, per tant, la proteïna guanya pes molecular (160 kDa). A continuació, el rLDL es transporta cap a la membrana on es situa als pous recoberts de clatrina. En produir-se la unió amb el lligand, els pous s'internalitzen per endocitosi i es formen endosomes on el receptor es dissocia del lligand, degut al pH lleugerament àcid de l'endosoma, i es recicla el receptor que es situa un altre cop a la membrana plasmàtica. Els endosomes es fusionen amb els lisosomes, els quals contenen l'activitat enzimàtica de les hidrolases lisosomals i, com a conseqüència, es produeix la metabolització del lligand internalitzat. A partir de la metabolització de la lipoproteïna s'allibera colesterol, el qual anirà a formar part de les membranes o bé estarà implicat en la regulació de gens, com per exemple la del propi rLDL.

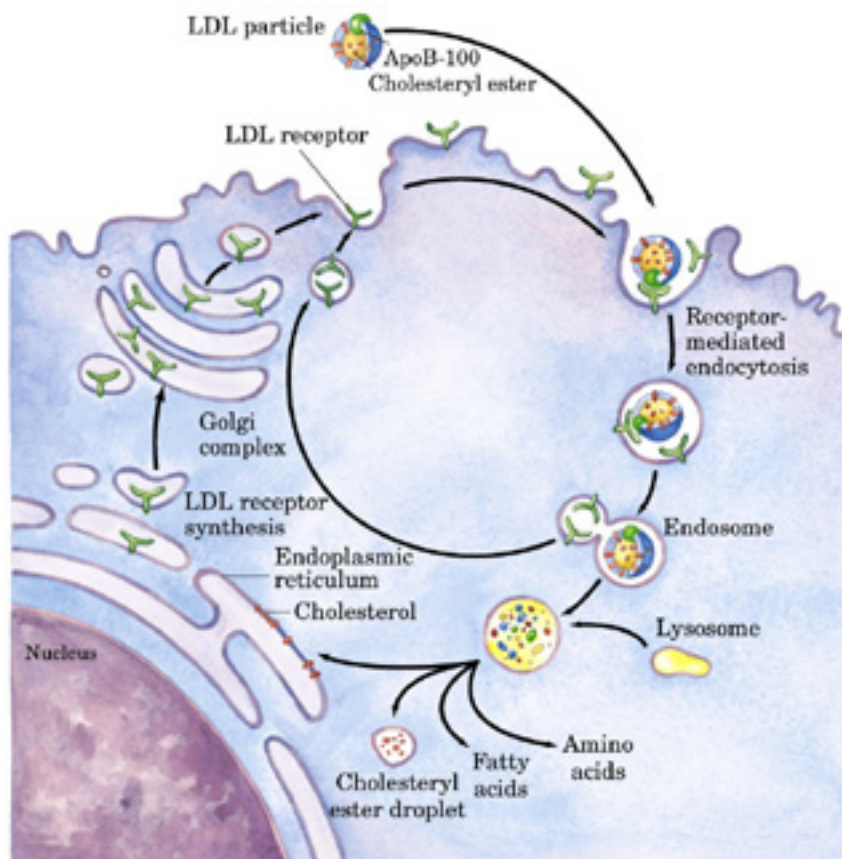


Figura 3. Cicle del receptor d'LDL.

L'estructura del rLDL ha estat molt estudiada, i, per tant, es coneix amb detall. És una glicoproteïna transmembrana d'una sola cadena codificada per 18 exons, els diferents exons originen diferents dominis estructurals i funcionals. Aquesta estructura del rLDL està conservada en diferents espècies animals i en teixits. Està formada per cinc dominis (Goldstein 1985) que són els següents enumerats des de l'extrem N al C-terminal:

1- Domini d'unió a lligand. Està format per 292 aminoàcids (Aa). Consta de set repeticions riques en cisteïnes, sis residus per repetició, les cisteïnes formen ponts disulfur que donen estabilitat als motius funcionals. Cada repetició té uns 40 Aa, aquestes repeticions presenten homologia amb components del sistema del complement C8 i C9. Sembla que les cisteïnes d'aquest domini, degut a la seva càrrega negativa, són les responsables de la unió amb les lisines de l'apoB (Brown 1986), i també uneixen apoE, i per tant VLDL (Hobbs 1986). Per estudis de deleció i mutagènesi dirigida es va determinar que les repeticions 3-7 juntament amb la repetició A del domini EGF (següent domini) són requerides per a la unió òptima d'apoB, i tan sols la repetició 5 per unió de l'apoE (Russell 1989). Les repeticions 1-2 no semblen ser necessàries per a la unió del lligand, però presenten residus acídics molt conservats que estan implicats en la unió de calci (Fass 1997).

2- Domini homòleg al precursor del factor de creixement epidèrmic (EGF). És un domini de 400 Aa, també amb abundància de cisteïnes, que presenta homologia al EGF, que és un motiu comú en moltes proteïnes extracel·lulars, com altres receptors superficials. És un domini glicosilat i els carbohidrats presenten enllaç N-glucosídic. Aquest domini intervé en la dissociació del lligand a pH àcid, i en conseqüència mutacions en aquest domini comporten dificultat del receptor per sortir del endosoma i reciclar-se (Brown 1986, Davis 1987).

3- Domini ric en carbohidrats. Està format per 58 Aa, és el domini extracel.lular més proper a la membrana plasmàtica. Els carbohidrats estan units per enllaç O-glucosídic a serines o treonines. Per deleció d'aquest domini no s'afecta la funcionalitat del receptor (Davis 1986).

4- Domini transmembrana. És un domini de 22 Aa, hidrofòbic, el qual ancora la proteïna en la bicapa lipídica. No és un domini gaire conservat entre espècies.

5- Domini citoplasmàtic. De 50 Aa, és un domini conservat en diferents espècies. És troba a l'extrem C-terminal, al citoplasma, i posseeix una senyal d'internalització. Té paper en l'associació del receptor en dímers/multímers (van Driel 1987), i també en l'ancoratge del receptor als pous de clatrina (Lehrman 1985).

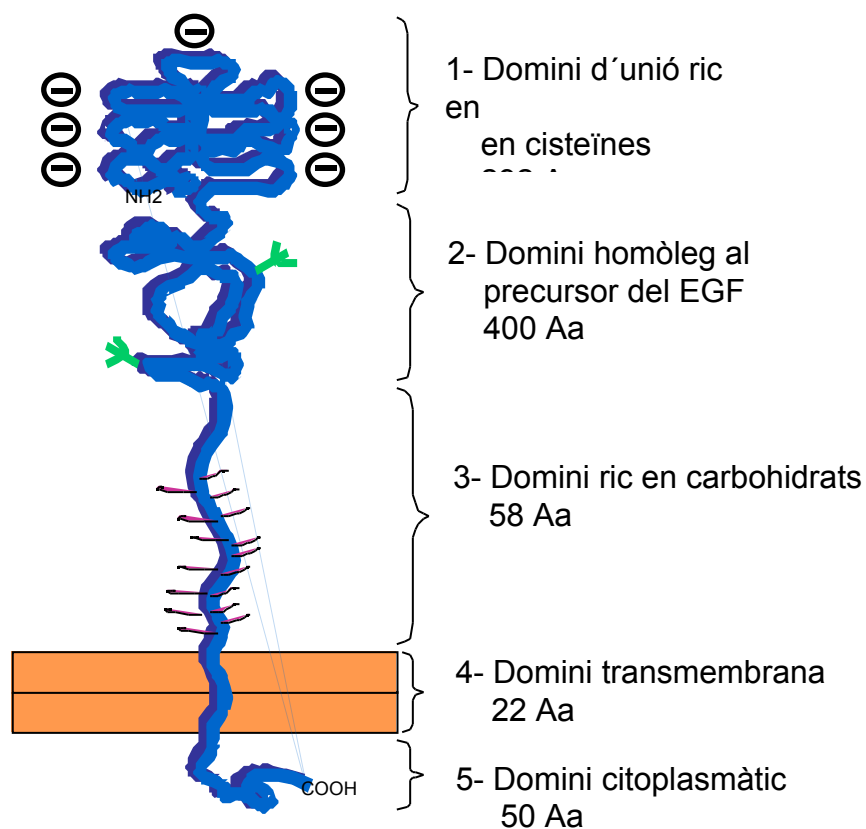


Figura 4. Estructura del receptor d'LDL.

4.3 CARACTERÍSTIQUES QUALITATIVES DE L'LDL. IMPLICACIÓ A L'ATEROSCLEROSI DE LA GRANDÀRIA I DENSITAT DE LA PARTÍCULA

A l'apartat 4.1 s'han aportat evidències del paper de l'LDL en l'aterosclerosi, però l'aterogenicitat de l'LDL no només ve determinada per la seva concentració plasmàtica, sinó també per la modificació de les seves característiques, com per exemple diferències en càrrega, conformació o grandària. Respecte les modificacions que afecten incrementant la càrrega negativa de la partícula es descriuran a l'apartat 5.

El conjunt d'LDL dels individus està constituït per partícules de diferent tamany i densitat (Krauss 1982). En funció del tipus d'LDL que sigui preponderant això pot determinar un major risc aterogènic, com és el cas dels individus en què predominen les LDL petites i de major densitat, fet que es coneix com a fenotip B de subfraccions d'LDL. Aquestes LDL s'originen per determinació genètica i/o per l'existència en els individus d'un perfil lipídic amb nivells elevats de triglicèrids i una LDL amb raó colesterol/proteïna disminuïda i un contingut en triglicèrids augmentat. La grandària de l'LDL pot afectar en diferents aspectes a l'aterogenicitat de la partícula:

a) Susceptibilitat a l'oxidació. Ha estat descrit que l'LDL de petita grandària i major densitat, anomenada de tipus B, presenta una major susceptibilitat a l'oxidació (de Graaf 1991, Tribble 1992, Dejager 1993, Chait 1993). Aquest fenomen pot ser degut a diferents causes, com ara que l'LDL densa conté menor contingut en els antioxidants -tocoferol i ubiquinol-10, i major en àcids grassos poliinsaturats (de Graaf 1991, Tribble 1992, Tribble 1994), característiques que la fan més susceptible a oxidar-se. A més, l' -tocoferol de l'LDL densa és més làbil que el de la lleugera (Tribble 1995). Altre factor que contribueix a la major oxidació de l'LDL densa és el menor contingut en colesterol lliure (de Graaf 1991, Tribble 1992, Dejager 1993,

Tribble 1994). Com s'explicarà posteriorment, el fet de que una LDL sigui més susceptible a oxidar-se implicarà una major aterogenicitat de la partícula.

b) Afinitat pels proteoglicans (PG). Els PG semblen ser els principals responsables de la retenció de l'LDL a l'endoteli i, per tant, estan implicats en l'origen de la lesió. L'adherència de les lipoproteïnes als PG pot estar afectada per les seves característiques fisicoquímiques, ja que, per exemple, l'LDL densa presenta major afinitat pels proteoglicans (Anber 1996, Hurt-Camejo 2000)

c) Unió al receptor. En diferents treballs queda reflectit el fet de que l'afinitat pel receptor d'LDL està correlacionada amb el tamany de la partícula d'LDL; ja que, variacions a la grandària poden afectar a la conformació de l'apoB-100 i en conseqüència, a la unió al receptor (McNamara 1996). Aquestes variacions en la conformació en l'apoB, poden ser subtils canvis locals sense afectar a l'estructura secundària, però que afecten a l'afinitat pel receptor. Diversos autors han descrit que un augment en el contingut en triglicèrids en l'LDL, cas de les partícules típiques del fenotip B, comporta canvis locals en l'apoB que provoquen alteracions a la seva conformació i a la interacció amb el receptor disminuint-la (Kleinman 1987, Aviram 1988, Kinoshita 1990, McKeone 1993). En ser l'LDL densa més susceptible a l'oxidació i l'LDL oxidada tenir l'afinitat disminuïda pel rLDL, es podria hipotetitzar que la causa de la menor afinitat pel receptor de l'LDL densa podria ser deguda a que aquesta partícula circula al plasma en un estat més oxidat que el de l'LDL nativa. Un recent estudi descarta això (Toyota 1999), ja que normalitzant el tamany de la partícula d'LDL també es normalitza l'afinitat pel receptor, mentre que el tractament antioxidant no la millora.

Existeixen resultats contradictoris que no mostren relació entre tamany de l'LDL i afinitat pel rLDL (Knight 1986, Swinkels 1988, Yamane 1996). Malgrat això, la majoria dels estudis recolzen que no tan sols l'LDL petita i densa, sinó que també

les subfraccions més lleugeres, presenten menor afinitat pel rLDL que les formes d'LDL de densitat intermitja (Campos 1996, Jaakola 1989, Nigon 1991, Chappel 1991, Swinkels 1990). El grup de Chapman havia presentat resultats oposats (Chapman 1984 i 1985). Tanmateix en un estudi del mateix grup (Nigon 1991) en què es van separar 15 subespècies en funció de la densitat, es va observar més afinitat pel rLDL i més internalització i degradació en les subespècies d'LDL de densitat intermitja en front a les formes més lleugeres i més denses. Aquests resultats es van atribuir a canvis en la conformació de l'apoB-100.

En un estudi (Lund-Katz 1998) es va avaluar l'estructura de l'apo B-100 en LDL de diferent densitat per ressonància magnètica nuclear (RMN) i dicroïsme circular (DC). Es va observar que l'LDL de densitat intermitja presenta major afinitat que les partícules denses i lleugeres, i també menor càrrega negativa. Per RMN es va observar que presenta un augment en les Lys a pK8.9, implicades en la interacció amb el receptor, respecte les de pK10. Per DC no es van detectar canvis en l'estructura secundària, per tant aquest canvi comportaria petites variacions a la conformació de l'apoB que seria més òptima per interaccionar amb el receptor.

El resultat de l'afinitat disminuïda pel receptor d'LDL en formes més lleugeres i denses és que quedaria minvat el seu aclariment de circulació i en romandre més temps a circulació, serien més susceptibles a ser modificades i adquirir propietats aterogèniques.

5- MODIFICACIONS DE L'LDL. PAPER A L'ATEROGÈNESI.

5.1 PARADOXA DEL COLESTEROL I MODIFICACIÓ DE L'LDL.

Apart de l'efecte del tamany de l'LDL en l'aterogenicitat de la partícula, hi ha una estreta relació entre modificacions de l'LDL que augmenten la càrrega negativa i risc ateroescleròtic. Com s'ha mencionat, l'LDL és aclarida pel rLDL, l'expressió del qual està estretament regulada en funció del colesterol intracel.lular (Brown 1985 i 1986, Osborne 1985). Això no concorda amb el fet de que a les lesions ateroescleròtiques hi han presents típicament les cèl.lules espumoses, que són cèl.lules musculars llises o macròfags que han acumulat intracel.lularment colesterol de forma massiva i descontrolada (Aqel 1985, Ross 1986). Aquesta contradicció en principi es va considerar inexplicable, constituint el que es va anomenar la paradoxa del colesterol (Steinberg 1983 i 1989). A més, els HF homozigots, els quals no presenten cap rLDL funcional, presenten nombroses plaques ateromatoses amb abundància de cèl.lules espumoses.

Aquests fets indicaven l'existència d'altra via d'entrada de colesterol, diferent a la del rLDL clàssic, cap a l'interior cel.lular. Es va hipotetitzar que l'aterogenicitat de l'LDL era deguda al fet que es podia modificar (Steinberg 1983 i 1989) i internalitzar-se per una via alternativa. En aquesta altra via l'entrada de colesterol a les cèl.lules es dona de forma incontrolada, acumulant-se intracel.lularment i donant lloc al desenvolupament de cèl.lules espumoses, origen de la lesió ateroescleròtica.

Degut a la hipòtesi de l'existència d'una via alternativa d'aclariment de l'LDL que tindria lloc per catabolitzar LDL modificades, es van començar a realitzar experiments modificant "in vitro" LDL i estudiant la seva interacció amb els receptors cel.lulars per comprovar si eren metabolitzades per la via normal o per una via alternativa.

S'han portat a terme diferents estudis sobre LDL modificada "in vitro" per processos d'acetilació, oxidació o glicació, els quals tenen com a característica comuna produir un increment en la càrrega negativa de les partícules i induir propietats aterogèniques. En aquests tipus d'estudi s'ha comprovat que les LDL modificades no són reconegudes pel rLDL i en canvi són captades per altre receptor anomenat "scavenger receptor" (SR) o receptor escombriaire. D'aquestes modificacions les més factibles a succeir "in vivo" són la glicació, ja que és un procés que es produeix de forma natural en totes les proteïnes, i l'oxidació de l'LDL. En el cas de l'LDL oxidada, a més, està demostrat que indueix la producció de tota una sèrie de factors implicats en el desenvolupament de l'aterosclerosi.

Per tant, l'LDL nativa, en principi, no presenta característiques aterogèniques, però en canvi adquireix un comportament aterogènic quan es modifica per diferents mecanismes que tenen en comú la propietat d'incrementar la càrrega negativa de la partícula, ja que aquest guany en electronegativitat provoca que no sigui reconeguda pel rLDL, però sí pel SR.

El primer estudi de modificació química "in vitro" es va realitzar el 1979 pel grup de Goldstein i Brown, mitjançant l'acetilació de l'LDL (Goldstein 1979). Es va comprovar que l'LDL acetilada no era reconeguda pel rLDL, però tenia la capacitat d'induir l'acúmul intracel·lular d'ésters de colesterol als macròfags. Es proposà que l'entrada de l'LDL acetilada era a través d'un hipotètic receptor scavenger (SR) (Goldstein 1979). La causa d'aquest comportament és que la modificació de l'LDL per acetilació fa que els residus lisina i arginina de l'apoB-100 no quedin accessibles per ser reconeguts per les cisteïnes del rLDL (Mahley 1979). D'altra banda, l'increment de càrrega negativa provoca que l'LDL acetilada presenti afinitat pel SR. Tanmateix l'acetilació de l'LDL no és possible que tingui lloc fisiològicament, i en conseqüència, l'aterogenicitat de l'LDL hauria d'estar causada per modificacions fisico-químiques diferents de l'acetilació. Posteriorment, es va comprovar que la

modificació oxidativa també proporcionava aterogenicitat a l'LDL i que a més era factible d'existir "in vivo".

5.2 LDL OXIDADA

5.2.1 OXIDACIÓ DE L'LDL MITJANÇADA PER CÈL.LULES

Els primers experiments que van indicar la implicació de l'LDL oxidada en el procés ateroscleròtic van ser els de Henriksen i col.laboradors. Aquests autors (Henriksen 1981) van observar que incubant LDL amb cultius de cèl.lules endotelials s'obtenia una LDL que, en incubar-la amb macròfags en cultiu, era captada de forma ràpida mitjançant el SR. Aquesta LDL que era internalitzada pels macròfags havia estat modificada per les cèl.lules endotelials per lipoperoxidació, en conseqüència es va comprovar que l'LDL oxidada (LDLox) també és reconeguda pel SR. Posteriorment, s'ha observat la capacitat d'oxidar l'LDL per part d'altres tipus cel.lulars a més de les cèl.lules endotelials. Hi han diferents mecanismes proposats per tal d'explicar la via que segueixen les cèl.lules de la paret arterial per oxidar l'LDL

- a) Anió superòxid, el qual tindria el seu origen al metabolisme cel.lular i podria ser alliberat extracel.lularment (Heinecke 1986). Diferents autors han hipotetitzat un paper per l'anió superòxid en l'oxidació de l'LDL mitjançada per diversos tipus cel.lulars com cèl.lules musculars llises (SMC), cèl.lules endotelials (EC), fibroblasts i macròfags (Steinbrecher 1988, Cathcart 1989).
- b) Grups tiols de compostos sulfurats, com cisteïna, homocisteïna o glutatió. S'ha proposat que poden tenir un rol en l'oxidació de l'LDL mitjançada per diferents tipus cel.lulars: SMC, EC i macròfags (Heinecke 1987 i 1993, Sparrow 1993).

- c) Acció de la lipooxigenasa cel.lular. La 15-lipooxigenasa s'expressa a la paret arterial i s'indueix a la placa, la seva acció està implicada en l'oxidació de l'LDL, formant hidroperòxids derivats dels àcids linoleic i araquidònic (Sigal 1994). És un enzim intracel.lular, però es podrien transferir els lípids hidroperòxids formats a l'LDL (Parthasarathy 1992). La implicació d'aquest enzim com mecanisme de modificació oxidativa, de vegades ha estat qüestionada, trobant resultats controvertits (Parthasarathy 1994). Però, en general, la majoria dels estudis han corroborat el seu paper aterogènic, administrant hidroperòxids a l'LDL (Cyrus 1999, Steinberg 1999, Harats 2000, Navab 2000b).
- d) Mieloperoxidasa, la qual és una hemoproteïna secretada pels fagòcits, que exerciria la seva acció a través de la formació d'àcid hipoclorós (HClO) (van den Berg 1993, Hazell 1993, Heinecke 1994).
- e) Acció del peroxinitrit format a partir de l'òxid nítric a la paret arterial (Darley Usmar 1992). Això no obstant, s'ha descrit que l'òxid nítric també presenta la capacitat de poder inhibir l'oxidació de l'LDL (Hogg 1993).

En absència de cèl.lules, l'LDL es pot oxidar, presentant característiques similars a l'LDL oxidada mitjançant cèl.lules, en presència de concentracions de l'ordre μM de cations metàl.lics, com el ferro o el coure, (Steinbrecher 1986 i 1987, Parthasaraty 1990).

5.2.2 EXISTÈNCIA "IN VIVO" D'LDL OXIDADA

La modificació oxidativa s'inhibeix en presència d'antioxidants naturals com el tocoferol o químics com l'EDTA o el butirilhidroxitoluè (BHT) (Morel 1984, Steinbrecher 1986). És precisament per això que es considerava que els

antioxidants plasmàtics evitarien que l'LDL s'oxidés. A més, l'LDL oxidada circulant s'eliminarà molt ràpidament pel fetge (van Berkel 1991, de Rijke 1992). Però existeixen certes evidències que apunten el fet de que l'LDL pot trobar-se "in vivo" presentant un cert grau d'oxidació. Per exemple el 1979 (Schuh 1979) es va detectar la presència en circulació d'apoB amb diferents graus de fragmentació, i a més diferents treballs coincideixen en trobar augmentats els valors de lipoperòxids i TBARS (substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric) en diverses patologies (Yagi 1987, Miyazawa 1990, Sanderson 1995).

De totes maneres l'existència d'LDL extensament oxidada a plasma ha estat descartada, però sí s'han trobat dades que indiquen la presència d'LDL oxidada a la paret arterial i, més concretament, associada a lesió ateroscleròtica. La hipòtesi més acceptada és que l'LDL s'oxida a la íntima arterial, un cop travessada la barrera de cèl.lules endotelials, on es troba desprotegida dels antioxidants plasmàtics i pot ser oxidada per les cèl.lules vasculares. És en aquest microentorn on l'LDL s'oxidaria i adquiriria les propietats aterogèniques (Steinberg 1989, Haberland 1992, Witztum 1993).

La idea de que l'LDL oxidada es trobi "in vivo" i preferentment associada a lesió ateromatosa ve recolzada per diferents proves:

a) Proves directes

- En talls de plaques ateroscleròtiques, tant d'animals com humans, s'ha observat reconeixement per anticossos anti-LDLox i anti-MDA-LDL (Haberland 1988, Palinski 1989, Boyd 1989, Holvoet 1995), sent el MDA un aldehyd, producte final de l'oxidació.
- S'ha detectat la presència d'oxisterols mesurats directament a la placa ateroscleròtica (Brown 1999).

- Lipoproteïnes extretes de l'íntima presenten característiques similars a les de l'LDL oxidada "in vitro" (Yla-Herttuala 1989, Palinski 1989).

b) Proves indirectes

- S'han detectat autoanticossos anti-LDLox i anti-MDA-LDL en plasma d'humans (Salonen 1992, Maggi 1994).

- El desenvolupament de l'arteriosclerosi s'ha pogut retardar administrant antioxidants (Kita 1987, Carew 1987).

- S'ha observat una relació inversa entre malaltia cardiovascular i concentració d'antioxidants del plasma en estudis epidemiològics (Gey 1989, Manson 1991, Enstrom 1992).

5.2.3 PROCÉS OXIDATIU. ATEROGENICITAT I HETEROGENEÏTAT DE L'LDL OXIDADA.

El procés de peroxidació lipídica es desenvolupa en forma de cascada, però sense seguir una seqüència ordenada, es poden oxidar tots els components de l'LDL, tant els lípids com la part proteica, i això fa que l'LDL pugui adquirir diferents graus d'oxidació i diferents propietats. Per tant, l'LDL oxidada és un conjunt molècules que presenten una elevada heterogeneïtat, donant com a resultat diversos productes amb característiques diferents.

Entre els productes resultants de l'oxidació de l'LDL es troben els dels àcids grassos com el malondialdehid (MDA), el 4-hidroxinonenal (4-HNE), el hidroxiocadecadienoic (HODE), el hidroxiicosatetraenoic (HETE), però també els productes d'oxidació del colesterol o oxisterols i els fosfolípids fragmentats com la lisofosfatidilcolina. Tots aquests compostos presenten un important paper aterogènic per sí mateix.

L'oxidació de l'LDL s'origina a partir de la peroxidació dels àcids grassos poliinsaturats (sobretot linoleic i araquidònic) per l'acció de radicals lliures. Aquests àcids grassos poden formar part dels fosfolípids o dels ésters de colesterol. La seva peroxidació provoca una reacció en cadena que causa la formació de gran número de lipoperòxids que són productes inestables. A partir de la reducció dels hidroperòxids, es formen els hidròxids com els HODE, provinents de l'oxidació de l'àcid linoleic, o els HETE, derivats de l'araquidònic. Els hidròperoxids també poden originar aldehids de diferent llargada, com el MDA, el HNE o el HHE, quan es produeix fragmentació de la cadena alifàtica. Els cetoaldehids poden reaccionar ràpidament amb proteïnes, com l'apoB. Apart de reaccionar amb productes d'oxidació lipídica, l'apoB també es pot oxidar directament, fets que poden tenir com a efecte final la seva degradació (Fong 1987, Esterbauer 1987).

També es formen diferents productes derivats de l'oxidació del colesterol. El colesterol, tant si està en forma lliure com esterificat, al oxidar-se dona lloc a oxisterols (Brown 1999), sobretot en la posició 7. L'oxisterol format en estats més primerencs és el 7-hidroperoxicolesterol, i el més abundant en estat tardans el 7-cetocolesterol.

5.2.3.1 Paper biològics dels fosfolípids oxidats

Entre els productes resultants de l'oxidació es considera que sobretot els fosfolípids oxidats tenen un paper relevant mitjançant els events que ocorren a la lesió. Segons diferents estudis es considera que prèviament a l'oxidació dels fosfolípids, l'LDL ha d'estar sembrada amb espècies reactives d'oxígen, bàsicament hidroperòxids (Navab 2000a). L'LDL a circulació presenta hidroperòxids, però quan penetra a la íntima se n'enriqueix més, mitjançant l'acció de la lipooxigenasa, fins que arriba a un llindar necessari per a la formació de fosfolípids oxidats (Navab 2000

b). Els fosfolípids oxidats són actius biològicament. A partir d'un fosfolípid majoritari de l'LDL, el PAPC (palmitoil-araquidonil-glicero-fosfocolina), s'originen tres fosfolípids oxidats bioactius (Subbanagounder 2000).

Els fosfolípids oxidats bioactius presenten activitat similar al PAF o factor activador de plaquetes (Korth 1994), trobant-se fragmentats en posició 2 a diferents nivells. El PAF és un fosfolípid proinflamatori i trombogènic que exerceix el seu efecte localment a les lesions ateroscleròtiques. L'LDL oxidada i el PAF presenten efectes proinflamatoris similars, com inducció de IFN- γ i TNF- α , a més s'ha proposat que el receptor del PAF té un paper important mitjançant els efectes de l'LDLox (Frostegard 1997). També s'ha determinat que l'activitat proinflamatòria de les lipoproteïnes mínimament modificades disminueix quan l'activitat de l'enzim que hidrolitza el PAF, la PAF-acetilhidrolasa, és major (Lee 1999).

Un cas en què no està implicat directament el procés oxidatiu, però en el qual té lloc una resposta inflamatòria, és aquell en què intervé la fosfolipasa A2 (PLA2), que és un enzim abundant a les lesions (Romano 1998). La PLA2 genera a partir de l'LDL, àcids grassos i lisofosfatidilcolina, la qual és proinflamatòria (Quinn 1988, Kume 1992 i 1994).

5.2.3.2 Propietats aterogèniques de l'LDL oxidada

Segons el grau d'oxidació, heterogeneïtat de l'LDL oxidada, i del microambient on es trobi l'LDLox pot presentar diferents característiques aterogèniques. Per exemple, depenent de si la molècula està més o menys oxidada s'indueix l'expressió d'un tipus de molècula d'adhesió o un altre (Berliner 1995). Per exemple, la denominada LDLmm, o mínimament modificada, és una partícula que presenta fosfolípids oxidats, els quals indueixen propietats aterogèniques com

l'alliberament de factors inflamatoris, però aquesta no té un grau d'oxidació important. Malgrat que l'LDLmm és una forma oxidada, encara que d'una manera "mínima", conserva la capacitat de ser reconeguda pel rLDL (Berliner 1995) i no és captada pel receptor scavenger, mentre que l'LDL extensament oxidada perd la capacitat per interaccionar amb el rLDL, i sí és reconeguda a través del SR. A més de diferenciar-se en la interacció amb els receptors cel.lulars, l'LDL oxidada es diferencia de l'LDLmm en que promou citotoxicitat, però no induïx expressió de citoquines, tasca que desenvolupa principalment la forma mínimament modificada. Les propietats aterogèniques que l'LDL oxidada i l'LDLmm poden generar s'enumeren a continuació.

a) Interacció amb el rLDL. En el procés d'oxidació, les lisines de l'apoB responsables de la unió al rLDL són modificades, ja que es produeix unió covalent entre els seus grups amino i els productes resultants de l'oxidació com les cetones o els aldehids (Steinbrecher 1987). Com a conseqüència, l'LDL extensament oxidada perd afinitat pel receptor. D'altra banda, sí és reconeguda pel SR, induïnt l'acumulació de colesterol intracel.lular i originant cèl.lules espumoses. A més, s'ha descrit que l'LDLox, reconeguda pel SR, a la seva vegada, a través d'activació del PPAR- induïx més expressió dels SR (SRA i CD36) (Nagy 1998). S'ha descrit, però, que l'LDLox no és tan eficaç com la forma acetilada en induir acumulació de ésters de colesterol. Aquest fet és degut a que els seus components són resistents a la degradació lisosomal, quedant retinguts al lisosoma (Lougheed 1991, Jessup 1992, Brown 2000).

b) Inhibició de les següents molècules:

- L'òxid nítric, que és vasodilatador (Mangin 1983, Yang 1994). D'altra banda estimula la formació de l'endotelina, un potent vasoconstrictor (Boulanger 1992). Com a resultat de aquests dos efectes es produeix vasoconstricció. A més, l'endotelina afavoreix l'agregació plaquetària.

- PDGF en cèl.lules endotelials (Murugensan 1993). En quedar inhibida l'acció del PDGF produït per l'endoteli, s'impedeix la proliferació de les cèl.lules endotelials i en conseqüència queda minvada la reparació endotelial
- c) Afavoreix l'activitat protrombòtica mitjançant l'inducció de l'expressió de les següents molècules:
- TF produït per cèl.lules endotelials (Drake 1991, Weis 1991). El TF és un cofactor del factor VIIa de la cascada de coagulació, tenint per tant efecte procoagulant. El TF està present a la placa ateroscleròtica
 - PAI-1 que és una molècula que inhibeix la fibrinolisi (Latron 1991).
 - L'LDL oxidada també indueix l'agregació plaquetària (Pedreño 1994).
- d) L'LDL extensament oxidada presenta toxicitat per a les cèl.lules de la paret arterial, sobretot cap a les endotelials produint pèrdua de la integritat de l'endoteli vascular. Probablement la causa de la toxicitat és la presència d'oxisterols en l'LDL oxidada (Hessler 1983, Peng 1985, Sevanian 1995).
- e) Estimula la producció de molècules proinflamàtòries per part de cèl.lules vasculares, les quals faciliten el desenvolupament de la lesió. Entre elles es troben citoquines com la interleuquina 1 (Ku 1992) i IL-6; factors de creixement com EGF, PDGF, M-CSF, CSF (Rajavashisth 1990, Liao 1991), VEGF (Ramos 1998, Inoue 1997 i 2001); molècules d'adhesió VCAM-1, ICAM-1 (Kim 1994, Kume 1992, Weber 1998). També poden estimular l'expressió de proteïnes reactives i metaloproteases (Galis 1994). Molts d'aquests factors estan interrelacionats ja que, per exemple, l'IL-1 induïda per l'LDL oxidada a la seva vegada indueix l'expressió d'altres, com molècules d'adhesió.
- f) Inducció de la producció de quimioquines, les quals són importants per al reclutaments de leucòcits al lloc d'inflamació.

- f.1) Inducció d'MCP-1. Sembla que l'LDL mínimament modificada estimula l'expressió d'MCP-1 en EC i per tant indueix l'atracció de monòcits i transmigració quimiotàctica a través de l'endoteli (Berliner 1990, Cushing 1990, Navab 1991, Liao 1991, Shi 2000, Lee 2000). Aquest efecte seria provocat pels fosfolípids oxidats presents a l'LDLmm (Navab 2000 b, Subbanagounder 2000). Respecte a inducció en l'expressió del receptor de MCP-1, el CCR2, per part de l'LDL oxidada hi han resultats contradictoris, alguns indiquen disminució (Han 1998) o augment (Weber 1999).
- f.2) Inducció d'IL-8. L'LDL oxidada pot induir producció d'IL-8 per part de cèl.lules endotelials (Claise 1996, Lee 2000) i de monòcits, podent ser aquesta última la causa de la colocalització a lesió d'LDL oxidada, macròfags i limfòcits T (Terkeltaub 1994). El grau d'inducció d'IL-8 per part de l'LDLox depèn del seu nivell d'oxidació i s'han proposat que constituents seus com oxisterols o fosfolipasa A2 poden ser els responsables de la inducció d'IL-8 (Terkeltaub 1994).

5.2.3.3 Factors de transcripció activats per l'LDL oxidada

Les proves demostren que l'LDL oxidada provoca la inducció d'una sèrie de factors implicats en la lesió, la qual pot estar mitjançada per diferents factors de transcripció. S'ha descrit que l'LDL oxidada activa NF-kB només en cèl.lules endotelials (Calara 1998), les quals, si no es troben estimulades, presenten poca expressió del NF-kB. S'ha proposat que l'efecte de l'LDL oxidada és el de degradar el I κ B (Li 1999). Tanmateix, sembla que l'LDL oxidada no activa aquest factor de transcripció en altres línies cel.lulars, és més pot inhibir l'activació d'NF-kB induïda per LPS en SMC i macròfags (Ares 1995, Brand 1997). En un estudi en què s'incubaven SMC amb lisofosfatidilcolina (abundant en LDL oxidada) es va comprovar que s'activava AP-1, però no NF-kB (Ares 1995).

D'altra banda, l'LDL mínimament oxidada té la capacitat d'activar PPAR- en cèl.lules endotelials d'aorta (Lee 2000). L'LDL oxidada també pot activar PPAR- , i s'ha descrit que, mitjançant l'activació d'aquest factor de transcripció, pot induir l'expressió del SR CD36 (Nagy 1998) i del factor de creixement de cèl.lules vascular VEGF (Inoue 2001). De fet, ha estat comprovat que alguns hidroperòxids típics de l'LDL oxidada com el 9-HODE i 13-HODE són lligands de PPAR- .

5.2.4 SUSCEPTIBILITAT A L'OXIDACIÓ DE L'LDL

Les propietats aterogèniques anteriorment esmentades posen en relleu el paper que pot tenir l'LDL oxidada en el desenvolupament de la lesió. Per tant, respecte al rol de l'LDL en la formació de la lesió, es considera que el risc aterogènic no ve determinat només pels nivells absoluts d'LDL sinó que una LDL més susceptible a oxidar-se serà potencialment més aterogènica.

La susceptibilitat a oxidació es pot avaluar "in vitro" induint l'oxidació de l'LDL amb coure i valorant la formació de diens conjugats (Esterbauer 1989). Els diens conjugats són el primer estadi de l'oxidació en què es produeix una reestructuració dels dobles enllaços dels àcids grassos.

El fet que una LDL tingui més tendència a patir oxidació ve determinat per les condicions pro i antioxidants de l'ambient, però també hi haurà dependència de les característiques de la pròpia partícula lipoproteica (Esterbauer 1993, Tribble 1995).

Algunes de les característiques que fan que l'LDL sigui més susceptible a patir oxidació són, resumidament, les següents:

- a) Elevat quocient àcids grassos poliinsaturats/monoinsaturats (Thomas 1994, Kleinveld 1993)
- b) Contingut disminuït en colesterol lliure (de Graaf 1991). S'ha suggerit que el paper del colesterol és el de actuar com a antioxidant (Smith 1991) i també el de donar rigidesa a la membrana, reduint l'accessibilitat dels agents oxidants (Li 1992, Tribble 1995).
- c) Baix contingut en antioxidants com α -tocoferol, ubiquinol-10, carotenoids. (Thomas 1994, Tribble 1994). El α -tocoferol és l'antioxidant majoritari de l'LDL, sis o set molècules per partícula. Els antioxidants tenen la funció d'inhibir les primeres etapes de l'oxidació de l'LDL, de forma que les etapes més avançades en la cascada del procés oxidatiu no s'inicien fins que s'han consumit els antioxidants (Esterbauer 1991).
- d) LDL de petita grandària i densa, pròpia de l'anomenat fenotip B de les partícules (de Graaf 1991, Tribble 1992). Com ha estat esmentat a l'apartat 4.3, la grandària de l'LDL afecta a diferents nivells a les seves propietats, una d'elles la susceptibilitat a oxidar-se.
- e) Canvis conformacionals en l'estructura de l'LDL. Per estudis "in vitro" s'ha comprovat que modificant l'LDL per incubació amb molècules que varien l'estabilitat de l'apoB-100, la conformació queda afectada i fa variar la susceptibilitat a l'oxidació (Brunelli 2000, Abuja 1999).

Apart de les característiques de l'LDL, també influirà a la seva susceptibilitat a l'oxidació, l'activitat antiinflamatòria de l'HDL. L'HDL en situacions normals conté apolipoproteïnes i enzims que preveuen la formació i inactiven els fosfolípids oxidats (Navab 2000 a i b). En algunes situacions, com en la reacció de fase aguda, l'HDL pot desenvolupar un paper proinflamatori (Navab 1996), disminuint aquestes activitats enzimàtiques protectores de l'oxidació de l'LDL.

5.3 ALTRES MODIFICACIONS DE L'LDL

Com s'ha mencionat, l'acetilació no és una modificació gaire factible d'ocórrer "in vivo", però els estudis d'acetilació van servir per identificar el SR. D'altra banda, l'oxidació de l'LDL ha estat la forma modificada més estudiada, tenint, a més, proves de la seva existència "in vivo". Però apart de l'oxidació hi ha altres modificacions que poden afectar a l'LDL i que serien candidates a succeir "in vivo", en paret arterial i/o circulació, però no es té la certesa de que tinguin un paper rellevant en el procés ateroscleròtic. Algunes d'aquestes modificacions tenen en comú la capacitat d'incrementar la càrrega negativa de l'LDL. Entre aquests mecanismes de modificació es troben:

- a) LDL desialitzada. Un dels carbohidrats que formen part de l'LDL és l'àcid siàlic. L'LDL desialitzada té la capacitat de produir acúmul d'ésters de colesterol a les cèl.lules de paret arterial (Orehov 1991). Els malalts cardiovasculars semblen presentar un major percentatge de la forma desialitzada (Tertov 1993, Ruelland 1993), així com també els diabètics (Sobenin 1993). Però en front a tots aquests resultats que podrien indicar la implicació de pèrdua de siàlic amb el procés ateroscleròtic, n'hi han d'altres contradictoris (Chappey 1995b i 1998).
- b) Glicació no enzimàtica de l'LDL. Aquesta modificació és sobretot important en diabètics. En el procés de glicació es forma una base de Schiff en els residus de lisina de l'apo B, en conseqüència queda emmascarada la càrrega positiva i l'LDL perd afinitat pel rLDL, però en canvi és reconeguda pel SR (Witztum 1982, Steinbrecher 1984, Lopes-Virella 1988). Hi han treballs en que es troba relació entre els processos d'oxidació i glicació en l'LDL (Hunt 1990, Lyons 1991), trobant que les dues modificacions es potencien i que comporten un increment en la càrrega negativa de la partícula.
- c) Agregació de l'LDL. Els autoagregats poden induir l'acúmul d'ésters de colesterol als macròfags (Khoo 1988) però l'entrada a la cèl.lula sembla ser per fagocitosi

mitjançada pel rLDL i no via el SR. D'altra banda, l'LDL agregada no presenta les característiques aterogèniques de l'LDL oxidada, és més, el fet d'estar agregada la fa més resistent a l'oxidació (Hermann 1992). Més recentment i en relació amb la teoria de la retenció lipídica, s'ha proposat que l'LDL un cop retinguda a la íntima pot ser modificada per enzims hidrilitics i prooxidants que originarien un canvis en l'estructura de la partícula, els quals comportarien l'agregació i/o fusió de l'LDL (Oorni 2000, Hevonoja 2000). Aquesta formació d'agregats estaria relacionada amb la formació de gotes lipídiques i vesícules trobades "in vivo".

- d) Formació de complexos entre l'LDL i els proteoglicans de la paret arterial, pels quals presenta afinitat. Aquests complexos insolubles són internalitzats pels macròfags per fagocitosi (Yla-Herttuala 1986, Hurt 1987)
- e) Enriquiment en àcids grassos no esterificats (NEFA). Hi ha consens en el fet de que les lipoproteïnes enriquides en àcids grassos lliures tenen alterada la mobilitat electroforètica, presentant una major electronegativitat (Shafir 1958, Herbst 1955). En aquest tema s'aprofundirà més a l'apartat següent.
- f) N'hi han d'altres modificacions proposades que podrien provocar l'entrada d'LDL al macròfag produint acumulació intracel.lular de colesterol com són els complexos amb autoanticossos, la dimerització de l'LDL per acció de l'elastasa o la formació de complexos amb fibronectina. També s'han realitzat estudis "in vitro" de modificació amb hipoclorit que provoquen inducció d'activació i agregació plaquetària (Volf 2000). O estudis amb LDL sotmesa a modificacions enzimàtiques, candidates a tenir lloc "in vivo" a l'ambient de la lesió, que a més provoquen la inducció de MCP-1 en cèl.lules endotelials (Klouche 1998 i 1999).

5.4 LDL ENRIQUIDA EN ÀCIDS GRASSOS NO ESTERIFICATS (NEFA). RELACIÓ DELS NEFA AMB RISC CARDIOVASCULAR

5.4.1 EFECTES DELS ÀCIDS GRASSOS LLIURES.

Els àcids grassos lliures o àcids grassos no esterificats (NEFA) viatgen a circulació units a l'albumina, sobretot en determinades circumstàncies, però una part pot estar unida a altres proteïnes, com les lipoproteïnes. La funció dels àcids grassos és com a font d'energia per als mamífers i són essencials per a mantenir l'homeostasi fisiològica.

En determinades situacions, el nivell de NEFA es pot trobar augmentat en circulació, de manera que la capacitat d'unió per part de l'albumina queda excedida i els NEFA es poden unir a altres molècules (Shafrir 1958, Chung 1995). Quan els nivells de NEFA estan augmentats, presenten una sèrie d'efectes deleteris que fan que es puguin considerar un factor de risc per malaltia coronària i altres patologies (Frayn 1996, Carlsson 2000). Un problema per utilitzar els NEFA com a marcador de risc cardiovascular és que les concentracions plasmàtiques de NEFA són baixes i a més varien en un mateix individu amb el temps i les condicions (Frayn 1996).

Entre els efectes que produeixen els NEFA quan es troben incrementats al plasma es troben els següents:

a) Efecte sobre el metabolisme.

- Efecte sobre el metabolisme lipídic. El paper aterogènic de l'augment de NEFA podria ser degut, en part, a que els àcids grassos són el substracte per la síntesi hepàtica de triglicèrids i estimulen la secreció d'apoB, de manera que es trobaria incrementada la síntesi de VLDL-TG. Aquest efecte es produeix en el cas de

resistència a insulina (Reaven 1988), sobretot amplificat en situació postprandial (Ginsberg 1991), originant-se una lipèmia postprandial molt augmentada. Degut a la resistència a insulina, no es produeixen uns efectes que, en estat postprandial normal, tindrien lloc per acció de la insulina: no s'inhibeix la secreció hepàtica de VLDL, ni es facilita la captació de NEFA per part dels teixits, ni s'inhibeix la lipòlisi al teixit adipós. Tot això provocaria un increment en els nivells de NEFA que causaria un augment del número de partícules de VLDL secretades pel fetge, fet que alhora comporta una major producció d'LDL, sense augment del colesterol d'LDL, produint-se per tant un estat de hiperapoB. A més, al ser l'VLDL rica en triglicèrids, l'LDL resultant presentarà petit tamany i major densitat, fet que, per les característiques ja esmentades (apartat 4.3), és més aterogènica.

S'ha descrit que els NEFA duen a terme la regulació de gens que codifiquen per proteïnes del metabolisme lipídic (Ailhaud 1993), però no es coneix si aquest fet podria ser en part responsable dels efectes provocats pels NEFA.

- Efecte sobre el metabolisme de la glucosa. Existeix una relació inversa entre ús de carbohidrats i de greixos com a font energètica. Per tant, un increment de NEFA causa una davallada en la utilització de glucosa.

b) Efectes a nivell cel.lular i sobre les lipoproteïnes

- Alteren la permeabilitat (Katz 1981) i la fluïdesa de membranes cel.lulars (Zavodnik 1992, Holman 1995, Lund 1999)
- Efecte citotòxic i de disfunció cel.lular. Els NEFA poden presentar un efecte citotòxic, s'ha descrit que poden produir dany a l'endoteli (Zilversmit 1973, Wenzel 1978, Chung 1998) i lisi cel.lular (Richieri 1990). Altres efectes que provoquen en cèl.lules endotelials són inhibició de la vasodilatació (Steinberg 1997), però d'altra banda activació de l'endoteli (Henning 1996). També poden produir altres danys sobre les funcions cel.lulars com acció hemolítica o inhibició de les cèl.lules blanques sanguínees (Hostmark 1995).

- Els NEFA també tenen efecte sobre la unió als receptors cel.lulars, com indiquen diferents estudis en què la incubació de cèl.lules amb NEFA produeix les següents conseqüències:

Efecte sobre el rLDL. Alguns estudis han descrit que la incubació de cèl.lules amb NEFA provoca una activació del rLDL (Rumsey 1995, Bucci 1998). Segons Bucci (Bucci 1998), l'augment de l'activitat és degut a un increment en el número de receptors del rLDL, i aquest efecte depèn del número de dobles enllaços de l'àcid gras: a més dobles enllaços, el receptor presenta major activitat. Altre estudi (Bihain 1989) descriu que incubant amb diferents àcids grassos es desplaça la unió de l'LDL al receptor en fibroblasts, aquest efecte és diferent segons el tipus d'àcid gras.

Efecte sobre la formació de cèl.lules espumoses (SR). La incubació amb NEFA provoca l'acumulació d'ésters de colesterol en macròfags, això sembla relacionat amb un increment en l'activitat de l'ACAT (Rumsey 1995). A més, nivells elevats de NEFA estan involucrats en la formació de cèl.lules espumoses en SMC d'arteria humana (Laughton 1988).

- Respecte a l'efecte sobre les lipoproteïnes, s'ha descrit que l'existència de NEFA a l'entorn de les lipoproteïnes pot provocar llur agregació i fusió (Musliner 1987).

c) Efectes sobre funcions fisiològiques que comporten risc a patir patologies.

- Efecte sobre la funció miocàrdica. Aquesta funció sembla estar afectada per acció dels NEFA (Oliver 1994) i s'ha proposat que podria estar implicat un mecanisme d'increment del calci intracel.lular (Huang 1992).
- Efecte protrombòtic. S'han associat nivells plasmàtics elevats de NEFA amb efectes protrombòtics, ja que s'unirien a les lipoproteïnes i, com a conseqüència, guanyarien càrrega negativa i s'activaria la coagulació (Mitropoulos 1992). També s'ha proposat que afectin a la fibrinolisi, inhibint el trencament de fibrina.
- Efecte sobre el transport d'hormones sexuals i tiroidees. Un elevat nivell de NEFA pot desplaçar a amdos tipus d'hormones, que són transportades per l'albumina.

Com a conseqüència, augmentaria llur proporció lliure a plasma, que és la forma activa biològicament. Aquest fet podria ser responsable, en part, de càncers sensibles a hormones (Frayn 1996).

5.4.2 CONDICIONS EN QUÈ AUGMENTEN ELS NEFA. RELACIÓ AMB RISC CARDIOVASCULAR

L'increment de NEFA en circulació, com ha estat anteriorment esmentat, pot produir efectes tòxics. De fet, varis estudis indiquen que els NEFA, quan es troben en circulació a una concentració elevada, poden tenir un paper important en l'etiologia i en el desenvolupament de la placa ateromatosa (Laughton 1988, Reinilä 1980 i 1981). Uns autors (Henning 1985) proposen un efecte directe dels NEFA en la formació de la placa ateroscleròtica, de manera que afectarien a l'entrada a través de l'endoteli de lipoproteïnes riques en colesterol cap a l'íntima. El rol aterogènic dels NEFA es correlacionaria amb el fet que, en diferents patologies en què existeix un risc cardiovascular incrementat, el nivell plasmàtic dels NEFA es troba augmentat.

En subjectes normolipèmics l'albumina és suficient per aclarir els àcids grassos lliures alliberats al catabolisme de les lipoproteïnes riques en triglicèrids (TGRLP). En els casos en què aquesta capacitat queda excedida, i, per tant, augmenta la raó NEFA/albumina, hi ha associat un major risc a patir malaltia cardiovascular (Pickard 1983, Carlsson 2000). Aquest fet és típic de les situacions d'hipoalbuminèmia.

Existeixen altres circumstàncies en què es produeix un augment en els nivells plasmàtics de NEFA. En situacions que cursen amb resistència a insulina, com NIDDM (Fraze 1985, Skowronski 1991, Paolisso 1995, Charles 1997), però també

hipertensió, obesitat o sedentarisme, es dona un increment en la concentració de NEFA que queda sobretot de manifest en estat postprandial, com s'ha comentat a l'apartat anterior. També quan es produeix estrès (exercici, cirurgia) augmenten les catecolamines, que fan que s'activi la lipasa sensible a hormones (HSL) i s'alliberin NEFA (Jones 1980). Altres situacions en què els NEFA es troben incrementats són: en el tabaquisme (Kershbaum 1961) o en diverses patologies, com la síndrome nefròtica en què baixa la concentració d'albumina (Joven 1990, Braschi 1997) o la pancreatitis (Domschke 1992).

En totes aquestes situacions es produeix un excés de NEFA al plasma els quals no poden ser transportats tots per l'albumina. Malgrat que l'albumina té tres llocs d'alta afinitat pels NEFA, es va determinar per RMN que cada molècula d'albumina uneix tan sols 1 molècula de NEFA (Cistola 1991). Quan es produeix un excés de NEFA, la part dels que no poden ser transportats per l'albumina s'uneixen a la fracció lipoproteica (Chung 1995, Braschi 1996) Aquesta modificació de les lipoproteïnes, l'enriquiment en NEFA, genera una sèrie d'efectes que s'esmenten a continuació.

5.4.3 PROPIETATS DE LES LIPOPROTEÏNES ENRIQUIDES EN NEFA.

El fet de que una lipoproteïna estigui enriquida en NEFA l'afecta de manera que presenta unes propietats diferents a les de la forma nativa:

a) La unió de NEFA augmenta la càrrega negativa de les lipoproteïnes. En estudis amb LDL enriquides amb NEFA "in vitro" s'ha observat una major mobilitat electroforètica que en les LDL control (Chung 1995, Shafrir 1958). També s'ha observat aquest efecte en sèrums postheparínics de hipertriglicèridèmics (Chung 1995), en els quals es produeix un enriquiment en NEFA per part de les seves

lipoproteïnes. A més també està descrit que en incrementar-se el contingut en NEFA de l'LDL augmenta l'electronegativitat de la partícula (Braschi 1997).

b) Efecte sobre les cèl.lules: unió als receptors cel.lulars i efecte citotòxic. Els NEFA tenen major efecte citotòxic directes sobre macròfags peritoneals de ratolí i d'inducció d'acumulació de triglicèrids a la línia monocítica, quan estan units a les lipoproteïnes que quan ho estan a l'albumina (Chung 1995). Respecte a la interacció de l'LDL-NEFA i els macròfags hi han autors que no troben una major degradació d'aquesta molècula per part dels macròfags (Aviram 1988). En contra d'aquests resultats, hi existeix altre estudi (Hayashi 1987) en què es proposa que a major contingut en NEFA de l'LDL aquesta presenta major degradació pels macròfags.

c) A més d'afectar a la fluidesa de les membranes cel.lulars, els NEFA també poden alterar la fluidesa de les lipoproteïnes, com queda reflexat en un treball (Foucher 1996) el qual indica que les lipoproteïnes carregades amb NEFA presenten major fluidesa. L'augment de la fluidesa es produeix en major o menor grau depenent de la cadena acil de l'àcid gras, produint un major efecte els de cadena mitja i els insaturats (Foucher 1996).

d) Modulació d'activitats enzimàtiques. S'ha observat que en pacients de síndrome nefròtica, en què el nivell de NEFA és elevat, augmenta l'activitat PTEC. S'ha proposat que aquest efecte estigui associat a la presència de lipoproteïnes enriquides en NEFA (Braschi 1997), en incrementar la seva càrrega negativa augmentaria la interacció, de tipus electrostàtica, amb la superfície de les lipoproteïnes. D'altra banda, s'ha proposat que els NEFA poden modular l'activitat PTEC en part alterant la fluidesa de la superfície de les lipoproteïnes (Foucher 1996).

e) Efecte sobre l'oxidació de les lipoproteïnes. Els NEFA semblen ser possibles candidats a disminuir la susceptibilitat a l'oxidació de l'LDL. Segons Viens (Viens

1996) l'LDL incubada amb diferents àcids grassos per separat presenta més resistència a l'oxidació. Aquest efecte sembla degut a l'enriquiment en àcids grassos de l'LDL, ja que al afegir albúmina disminueixen els NEFA i augmenta la susceptibilitat a oxidació. Existeix dependència del grau d'insaturació de l'àcid gras amb el que es preincuba l'LDL, de manera que el linoleic és menys efectiu que l'oleic com a preventor de l'oxidació de l'LDL. S'ha proposat que els NEFA podrien afectar a l'oxidació de l'LDL alterant la seva càrrega superficial i això potser afectaria a la seva interacció amb cations divalents com el coure en avaluar la susceptibilitat a oxidació.

f) Efecte sobre l'agregació de l'LDL. Hi han dades que indiquen que l'LDL carregada amb NEFA provoca la formació d'agregats de l'LDL (Hakala 1999). Aquest fet estaria relacionat amb la resistència a l'oxidació en el cas d'LDL enriquida en NEFA, ja que l'LDL agregada és més resistent a oxidar-se (Herman 1992).

5.5 UNIO DE LES LDL MODIFICADES ALS RECEPTORS CEL·LULARS. RECEPTORS "SCAVENGER" (SR)

5.5.1 CARACTERITZACIÓ DELS SR TIPUS A (SRA)

Una característica comuna en les LDL modificades és que la càrrega positiva de l'apoB queda emmascarada, i és per aquest motiu pel qual perden afinitat pel rLDL. En canvi, la modificació de l'LDL provoca que sigui captada pels anomenats receptors scavenger (SR) que són un conjunt de receptors cel·lulars capaços de reconèixer un ample rang de lligands que presenten la característica comuna de ser electronegatius. En la lesió ateroscleròtica, els SR capten de forma incontrolada l'LDL modificada, potenciant l'acumulació massiva d'ésters de colesterol al citoplasma de les cèl·lules, promovent d'aquesta manera la seva transformació en cèl·lules espumoses (Goldstein 1979b, Brown 1983 i 1990) i provocant el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica.

Els SR s'expressen principalment a macròfags (Brown 1983) però també a altres tipus cel·lulars com cèl·lules musculars llises. El 1988 es va purificar un receptor de macròfag fent servir LDL acetilada com a lligand (Kodama 1988) i es van aïllar els cDNAs que codificaven dues formes del receptor d'LDL acetilada, van ser clonats i seqüenciats (Kodama 1990, Rohrer 1990). Aquests primers SR clonats eren d'origen boví, però posteriorment també s'han trobat aquests dos tipus de SR en altres espècies. Aquests dos tipus de SR s'han anomenat scavenger receptor A (SRAI i SRAII), que es consideren els SR clàssics. El SRAI és un trímer en què cada monòmer, de 77 kDa, consta de sis dominis: citoplasmàtic (I), transmembrana (II), espaciador (III), domini en hèlix (IV), domini amb similitud al col·lagen (V) i domini ric en cisteïnes (VI). Tant el SRAI com el SRAII poden unir LDL modificada i són els dominis IV i V els responsables de la unió. Tanmateix hi existeixen algunes divergències entre aquests dos receptors, per exemple respecte a l'estructura, el SRAII no presenta el domini ric en cisteïnes a l'extrem C-terminal. A més, l'expressió del SRAI augmenta gradualment durant la diferenciació dels monòcits, al contrari que el tipus AII en què es dispara l'expressió durant el procés de la diferenciació. També hi han algunes diferències quant a afinitat pels lligands i en l'expressió en diferents tipus cel·lulars, com en els macròfags P388D1, en què és predominant el SRAII. En la Figura 5 que es presenta al final del següent apartat, es poden observar les diferències estructurals entre SRAI i SRAII, juntament amb l'estructura d'altres SR diferents que s'expliquen amb més detall a 5.5.2.

5.5.2 ALTRES RECEPTORS SCAVENGERS

La presència d'altres receptors específics, tant per l'LDL acetilada com per l'oxidada, va ser suggerida pels resultats obtinguts en una sèrie d'estudis de desplaçament creuat de la unió amb aquestes formes modificades d'LDL (Sparrow 1989, Arai 1989). Els SRA tenen una especificitat molt semblant, fet que va fer

pensar que hi podrien haver altres receptors amb la capacitat d'unir diferencialment LDL oxidada i acetilada. En efecte, en els últims anys s'han descobert nous membres de la família del SR, la qual és heterogènia tant quant a estructura com a funció. Entre aquests receptors, diferents del SRA, hi han alguns que presenten la capacitat d'unir LDL oxidada o acetilada específicament, malgrat que en altres receptors no està tan clara l'especificitat, i a més poden unir lipoproteïnes en forma nativa (Terpstra 2000).

a) Altres membres SRA. La família dels SRA a més d'incloure els tipus I i II, també engloba el SRAIII, que és producte del mateix gen, però que ha sofert un splicing alternatiu, i el receptor MARCO. El SRAIII no s'expressa a membrana. El MARCO és un receptor de macròfags amb estructura similar al col.lagen. La seva estructura és similar al SRAI, amb el domini ric en Cys, però presentant algunes diferències. La seva expressió està restringida a certs teixits. Entre els seus lligands hi han bacteris i LDL acetilada, no es coneix del cert si té capacitat d'unió en front LDL oxidada.

b) SR tipus B (SRB). són membres de la superfamília CD36, incloent el mateix CD36 i el SRBI. El CD36 humà és una glicoproteïna transmembrana de 78-88 kDa, identificada per primer cop el 1976. El CD36 capta LDL oxidada (Endemann 1993) per la part lipídica, però altres indiquen que també pot unir LDL acetilada (Acton 1994). S'expressa en diferents tipus cel.lulars com plaquetes, monòcits i macròfags. També s'ha determinat que les SMC poden presentar un fenotip macròfag-like i expressar SRA, o bé CD36 que té activada la seva expressió per PPAR (Matsumoto 2000). Actualment han sorgit diverses evidències del rol del CD36 en l'aterosclerosi. S'ha trobat en un estudi immunohistoquímic, elevada l'expressió del CD36 en macròfags carregats de lípids en lesió d'aorta humana (Nakata 1999). En estudis amb ratolins deficients en apoE, s'ha trobat una menor àrea de lesió quan a més eren deficients pel CD36 (Febbraio 2000). En el cas de deficiència en poblacions humanes (individus Nak-) s'ha trobat que baixa la captació de l'LDL_{ox} en

un 40% (Podrez 2000). D'altra banda, el CD36 estimulat amb LDLox està implicat en l'expressió de citoquines inflamatòries com IL-1 i TNF- α , via l'activació del factor NF-kB (Janabi 2000). Altres funcions del CD36, apart de com SR, serien les de: eliminació de cèl.lules apoptòtiques, activitat angiostàtica i paper en el metabolisme lipídic com a transportador d'àcids grassos de cadena llarga a través de membranes. L'expressió del CD36 està regulada en resposta a diferents estímuls, entre ells citoquines proaterogèniques i LDLox, la regulació s'exerceix via el PPAR- α .

El SRBI té una distribució tissular i una expressió cel.lular diferent del CD36, malgrat que estructuralment són força semblants. El SRBI a més d'unir LDL modificada també capta lipoproteïnes natives amb elevada afinitat: LDL, HDL i VLDL (Acton 1994 i 1996, Calvo 1998). El CLA-1 és l'equivalent al SRB-I en humans (Calvo 1993). El SRBII és una isoforma del mateix gen que difereix del SRBI en la cua citoplasmàtica terminal (Webb 1998).

c) SR tipus C (SRC). EL SRC només s'ha trobat en Drosophila. Quan s'expressa en cèl.lules d'ovari de hamster xinès (CHO), intervé en la captació i degradació d'LDL acetilada.

d) SR tipus D (SRD). Hi pertany la macrosialina que és l'homòleg en ratolí del CD68 humà, és una proteïna molt glicosilada que uneix i internalitza LDL oxidada (Ramprasad 1995), la interacció no està mitjançada per la part carbohidratada (van Velzen 1997, van der Kooij 1997). És una proteïna intracel.lular que està associada a lisosoma i només un petit percentatge es troba a membrana, malgrat que la seva expressió es pot estimular amb ésters de forbol (Ramprasad 1996).

e) SR tipus E (SRE). Es va clonar inicialment a partir d'EC d'aorta bovina (Sawamura 1997) i s'ha descobert que presenta homologia amb l'humà. L'estructura és diferent de la d'altres SR, del tipus receptor d'LDLox amb un domini

tipus lectina (LOX). La seva expressió en EC es troba regulada per diversos factors, també s'ha comprovat la seva expressió en macròfags (Yoshida 1998). Sembla no reconèixer LDL acetilada (Kume 1998, Moriwaki 1998).

f) SR tipus F (SRF). Hi pertany l'anomenat SREC, que es va clonar a partir d'HUVEC (Adachi 1997). La seva estructura és de cua citoplasmàtica molt llarga amb llocs de fosforilació, i el domini extracel.lular conté cinc repeticions EGF-like. Té la capacitat d'interaccionar amb LDL acetilada i parcialment amb LDLox .

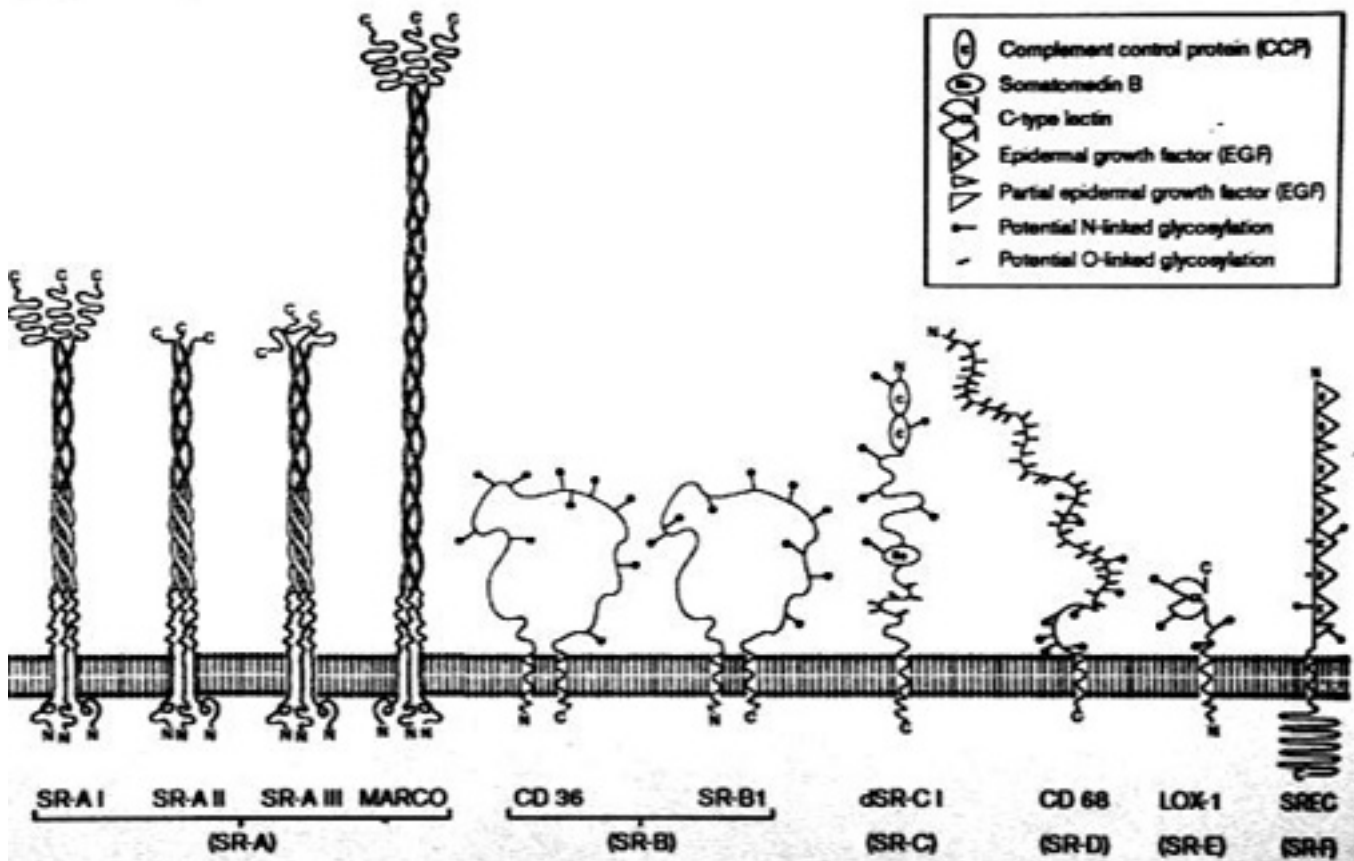


Figura 5. Diferents classes de receptors scavengers.

Tanmateix no es coneix clarament la relevància "in vivo" a l'ambient de les lesions d'aquests receptors scavenger diferents del SRA I i II capaços de reconèixer LDL modificades. No es pot afirmar que els SR només contribueixin al desenvolupament de la lesió, ja que segons la situació i la localització poden tenir un

rol protector o deleteri. Algunes de les funcions proposades pels SR són les que es comenten a continuació.

5.5.3 FUNCIONS DEL SR.

Està ben establert el paper dels SR en la formació de la lesió ateroscleròtica, degut a la seva capacitat per reconèixer i captar LDL modificades sense regulació, i per tant d'induir una acumulació intracel·lular d'ésters de colesterol. D'aquesta manera, els SR són els responsables de la formació de les cèl·lules espumoses implicades en l'origen de la lesió o estria de greix. Tanmateix, es pot considerar que els SR també poden presentar efectes protectors, com ara els següents:

- a) Capacitat d'interaccionar amb LDL modificades, és una funció que també es pot interpretar com a una manera d'eliminar lipoproteïnes aterogèniques, les quals si no fossin captades tindrien efectes ateroscleròtics.
- b) Efecte sobre el flux revers de colesterol. Apart d'interaccionar amb formes d'LDL modificades, els SR també poden presentar afinitat per lipoproteïnes natives, com el SRBI. Com el SRBI reconeix HDL (Acton 1996), la seva acció podria contrarestar l'efecte protector de l'HDL. Però per altra banda, l'expressió hepàtica del SRBI també podria representar un efecte positiu, accelerant l'eflux revers de colesterol i afavorint la seva eliminació en forma de sals biliars (Ji 1997, Kozarsky 1997).
- c) Aclariment de cèl·lules apoptòtiques o danyades (Sambrano 1995). En el reconeixement estaria implicada la fosfatidilserina (Connor 1994) que, en aquests casos, queda exposada a la part externa de la membrana cel·lular. S'han descrit com a responsables d'aquesta funció els SRA, però també el CD36 i el SRBI (CLA-1)
- d) Funció de defensa, en front a infeccions bacterianes. Estan implicats fonamentalment els SRA, els lipopolisacàrids (LPS) podrien ser els responsables de la unió (Wright 1990). Pels SRB no s'ha demostrat que uneixin directament endotoxines o patògens immunogènics.

e) Adhesió cel.lular. Per aquesta funció es facilitaria el reclutament de cèl.lules en condicions patològiques a les àrees d'inflamació o lesió. El CD36 s'ha trobat implicat en aquests processos d'adhesió cel.lular (Li 1993).

6 LDL ELECTRONEGATIVA

6.1 ORIGEN DE L'LDL ELECTRONEGATIVA

Varis autors han separat, fent ús de cromatografia de bescanvi aniònic, una fracció minoritària de l'LDL en circulació que presenta una major càrrega negativa, la qual s'ha denominat LDL electronegativa. Tanmateix, hi ha molts resultats contradictoris que fan difícil conèixer quin és realment l'origen i les característiques fisico-químiques d'aquesta LDL electronegativa i la seva rellevància fisiopatològica. Algunes proves semblen apuntar cap a un origen lipoperoxidatiu per explicar la càrrega negativa de la partícula. En canvi altres autors ho descarten, postulant altres explicacions que justifiquin la seva electronegativitat, com ara diferències en la composició lipídica o en el contingut d'apoproteïnes, o bé un contingut en àcid siàlic diferent. Seguidament es contrastaran aquestes dues teories, ressaltant les característiques fisico-químiques de la partícula, mentre que la caracterització biològica, centrada en la interacció amb els receptors cel.lulars serà comentada al següent apartat.

NOTA: Segons els autors, s'ha anomenat a aquesta partícula LDL-, LDL(-), minor LDL, modified LDL, i LDLB. En aquesta introducció rebrà el nom general d'LDL electronegativa, mentre que en els apartats de resultats i discussió, en fer referència als resultats obtinguts al nostre grup, s'utilitzarà el terme LDL(-).

6.1.1 ORIGEN OXIDATIU DE L'LDL ELECTRONEGATIVA

Els treballs de diferents grups defensen la postura de que l'LDL electronegativa presenta una sèrie de característiques que concorden amb les de l'LDL oxidada, i per tant la partícula pot tenir un origen oxidatiu. El 1988 es va descriure l'existència d'aquesta fracció circulant d'LDL electronegativa per primera vegada (Avogaro 1988), la qual va ser aïllada per cromatografia de bescanvi aniònic. Posteriorment es va millorar el mètode adaptant-lo a un sistema HPLC (Cazzolato 1991, Avogaro 1991). Els autors van descriure que el percentatge d'LDL electronegativa en individus normolipèmics era com a mitjana de 3.9%, oscil·lant entre 0.5 i 9.8%. Respecte a la seva composició, la partícula presenta augmentat el valor de proteïna i colesterol lliure, i minvat el de fosfolípids i colesterol esterificat. Algunes de les proves fisico-químiques que els feia pensar en el caràcter oxidatiu de l'LDL electronegativa són: descens als nivells d'antioxidants, concretament el valor de α -tocoferol disminuït a la meitat, augment de tres vegades en el valor de TBARS (test de substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric) que és un marcador de lipoperoxidació, major mobilitat electroforètica en gels d'agarosa i presència d'agregats en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE). Però aquestes no són totalment les propietats de l'LDL oxidada "in vitro", aquestes diferències les expliquen pel fet que la modificació a circulació és més suau que la obtinguda per incubació amb cations divalents "in vitro", i per tant, es tractaria d'una forma mínimament oxidada.

Altres autors (Shimano 1991) també van aïllar una fracció molt minoritària (1%) amb major càrrega negativa; el mètode d'aïllament va ser el de cromatografia atmosfèrica de bescanvi aniònic. La diferència en la proporció d'LDL electronegativa, respecte als treballs anteriors, la van atribuir al tipus de gradient salí utilitzat. Aquesta LDL electronegativa presentava major mobilitat electroforètica, densitat i contingut en proteïna. En contraposició al grup d'Avogaro, no van trobar presència d'agregats ni diferències en el contingut de TBARS (només lleugerament

augmentat). D'altra banda, van obtenir que l'LDL electronegativa era més susceptible a l'oxidació "in vitro", però no pel mètode de la monitorització de la formació de diens conjugats, sinó per l'addició de coure i mesura de l'activitat ACAT.

Posteriorment, en un altre estudi (Hodis 1994) es va descriure que l'LDL electronegativa de micos hipercolesterolèmics *Cynomolgus* presentava un exagerat contingut en colesterol oxidat, aproximadament un 50% del colesterol total, fet al qual van atribuir el poder citotòxic que van trobar que produïa en cultius de cèl·lules endotelials. En un treball posterior (Sevanian 1995) es va confirmar l'enriquiment de l'LDL electronegativa en colesterol oxidat en humans, el qual representava al voltant d'un 30% del total. A més del colesterol oxidat, que és citotòxic per a les cèl·lules endotelials, van descriure que l'LDL electronegativa també contenia, en menor grau, lipoperòxids i productes derivats.

En un article en el qual es comparen l'LDL electronegativa i l'LDL desialitzada (Tertov 1995) es va obtenir que l'LDL electronegativa presentava un menor contingut en siàlic, sobretot en malalts cardiovasculars, i a la vegada l'LDL desialitzada tenia una elevada proporció d'LDL electronegativa. Els autors hipotetitzaren que l'LDL electronegativa i la desialitzada eren una mateixa forma, presentant algunes característiques oxidatives. Respecte aquestes conclusions hi existeixen algunes dades discordants, com ara resultats que apunten que la pèrdua d'àcid siàlic comporta pèrdua de càrrega negativa en l'LDL (Camejo 1985).

Altres autors (Holvoet 1995) van descriure la presència a plasma d'una LDL electronegativa que presentava una major mobilitat electroforètica, major reconeixement per anticossos antiMDA-LDL i contingut incrementat de TBARS, però sense fragmentació de l'apoB.

En un altre treball (Sevanian 1996) es va recolzar un cop més l'origen oxidatiu de l'LDL electronegativa i la relació d'aquesta amb les subfraccions de major densitat de l'LDL. L'LDL electronegativa aïllada per aquests autors contenia més lipoperòxids i menys vitamina E. També van observar que existia correlació entre el percentatge d'LDL i una major susceptibilitat a l'oxidació, fet que van comprovar afegint concentracions creixents d'LDL electronegativa, tant en un pool com a les mostres individuals. La hipòtesi proposada és que la forma electronegativa correspon a una LDL amb més temps de residència plasmàtica, i que, per tant, ha estat més exposada a ser modificada oxidativament.

El mateix grup d'autors (Sevanian 1997) corroborà posteriorment que l'LDL electronegativa presenta una major oxidació, detectant, mitjançant un mètode quimioluminiscent de gran sensibilitat, un enriquiment de sis vegades més en hidroperòxids. Aquests autors tornen a descriure un major contingut en colesterol oxidat en l'LDL electronegativa, però en aquest treball l'enriquiment no és tan gran (5%) com el de treballs anteriors (50% i 30%) (Hodis 1994, Sevanian 1995). A més, van descriure una major mobilitat electroforètica, menor reactivitat en front al TNBS (àcid trinitrobenzosulfònic) que reacciona amb lisines no modificades i una petita pèrdua en àcids grassos poliinsaturats respecte a l'LDL nativa. També van descriure una diferent composició aminoacídica, probablement per modificació de l'apoB (o oxidació) i una disminució en els aminoàcids sensibles a oxidació

Treballs més recents (Greilberger 1999) també han descrit evidències de caràcter oxidatiu en aquesta partícula, concretament van descriure que està enriquida en hidroperòxids, que presentava l'apoB modificada per productes propis de lipoperoxidació com el MDA i el HNE, i valors disminuïts de tocoferol.

Finalment, en un treball encara més recent (Parasassi 2001) es realitzen estudis per determinar si l'LDL electronegativa està alterada estructuralment. Per

dicroïsmes circulars s'ha descrit que la partícula presenta pèrdua de l'estructura secundària. D'altra banda, es van realitzar estudis de polaritat dels lípids i fluorescència del triptòfan. Es va concloure que l'apoB de l'LDL electronegativa presentava una conformació alterada, suggerint un desplegament i enfonsament a zones més hidrofòbiques, afavorit per una desorganització dels lípids. Alguns d'aquests canvis en l'apoB els van equiparar amb els de la forma oxidada "in vitro" (pèrdua d'estructura secundària, menor empaquetament lipídic), malgrat que, comparativament, l'apoB de l'LDL electronegativa presenta canvis més marcats.

6.1.2 ORIGEN NO OXIDATIU DE L'LDL ELECTRONEGATIVA

En contraposició a l'origen oxidatiu de l'LDL electronegativa hi han altres treballs en què els resultats no coincideixen amb el fet de que aquesta partícula estigui oxidada. Entre aquests treballs, es troba el de Védie (Védie 1991), que va separar l'LDL electronegativa per mitjà d'un mètode de cromatografia de bescanvi aniònic amb la novetat d'estar adaptat a un sistema FPLC, aquest és també el mètode que segueix el nostre grup per l'aïllament d'LDL electronegativa. El percentatge trobat va correspondre entre 5-10% de l'LDL total. Aquest grup, en un treball posterior (Chappey 1995a), van aïllar per aquest mètode deu subfraccions en funció de la seva càrrega negativa. Els seus resultats semblaven descartar una procedència oxidativa per l'LDL electronegativa, ja que no van trobar enriquiment en lipoperòxids o TBARS, ni menor contingut de vitamina E, ni tampoc que l'LDL electronegativa presentés reactivitat incrementada en front al TNBS, ni agregació de l'apoB. Sí es descriu un enriquiment en triglicèrids, colesterol lliure i les apoproteïnes apoCIII i apoE.

El treball de Demuth (Demuth 1996) recolza el fet de que l'LDL electronegativa, no presenta característiques pròpies de forma oxidada. Els resultats que els fa deduir això són el no trobar diferències entre l'LDL electronegativa i LDL

nativa quant a la formació de diens conjugats, valor de TBARS, contingut d'antioxidants, presència d'agregats d'apoB i composició lipídica. Tanmateix van descriure que la forma electronegativa presenta incrementat el contingut en apoCIII, apoE i àcid siàlic, atribuint a aquests components la càrrega negativa de la partícula.

Un estudi posterior (Nyysönen 1996) no va trobar indicacions de que l'LDL electronegativa fos una partícula oxidada. Tan sols van obtenir correlació positiva entre LDL electronegativa i la raó glutatió oxidat/glutatió reduït, el colesterol d'LDL i els àcids grassos poliinsaturats, i negativa amb els nivells de β -carotè plasmàtic. D'altra banda, aquesta fracció contenia menys fosfolípids i més colesterol lliure i triglicèrids.

En un altre estudi posterior del mateix grup (Vedie 1998) s'observà que la mobilitat electroforètica i el percentatge d'LDL electronegativa està relacionat amb risc ateroescleròtic. La proporció d'aquesta partícula no estava relacionada amb la susceptibilitat a l'oxidació de l'LDL total, però sí es correlacionà amb el contingut d'àcid siàlic.

El grup de Sevanian, el qual en articles previs defensava que l'LDL electronegativa presentava característiques pròpies de la forma oxidada, en un altre treball va descriure que pacients en hemodiàlisi presentaven un percentatge d'LDL electronegativa incrementat, sense trobar proves de que la seva formació estigués relacionada amb un procés lipoperoxidatiu (Ziouzenkova 1999). Aquest increment d'LDL electronegativa també s'obtenia reproduint el procés d'hemodiàlisi per un model "ex vivo" i incubant LDL amb hemoglobina. L'estudi indicava que l'LDL s'unia amb l'hemoglobina, i com a conseqüència es modificava l'apoB i es formaven ditirosines. Es va considerar que aquesta unió amb l'hemoglobina generava l'augment en l'LDL electronegativa, sense donar una explicació sobre el seu origen, però la modificació oxidativa sembla descartada, ja que no es va observar increment en els nivells d'MDA en la partícula, ni major reconeixement per anticossos antiMDA-LDL.

Altres treballs realitzats al nostre propi grup també suggereixen que en la generació de l'LDL electronegativa no estan implicats els processos oxidatius (Sánchez-Quesada 1996 i 1999), almenys en els individus objectiu d'estudi dels esmentats treballs, que són diabètics tipus 1 i hipercolesterolèmics familiars, els quals presenten una proporció anormalment elevada d'LDL electronegativa, com es comentarà amb més detall a l'apartat 6.4.

Resumint, els diferents resultats obtinguts no indiquen que existeixin proves clares que apuntin cap a un origen oxidatiu de l'LDL(-), però tampoc es coneixen totalment els altres possibles factors implicats en la seva generació. Les discrepàncies existents quan a l'origen oxidatiu o d'altre tipus entre els diferents treballs poden ser degudes a divergències metodològiques que es comentaran posteriorment.

6.2 INTERACCIÓ DE L'LDL ELECTRONEGATIVA AMB ELS RECEPTORS CEL·LULARS

Així com existien discrepàncies sobre el possible origen de l'LDL(-), oxidatiu o no, també n'hi ha a l'hora de determinar el seu comportament amb els receptors cel·lulars. Existeixen diferents estudis sobre la interacció de l'LDL electronegativa amb els receptors cel·lulars. La finalitat seria discernir si la diferència en càrrega i altres característiques de l'LDL electronegativa poden interferir amb el reconeixement pel rLDL, i per tant influir en el seu aclariment de circulació. Per altra banda, el fet de que l'LDL electronegativa presenti un lleuger increment en càrrega negativa, podria implicar el seu reconeixement pel receptor scavenger.

En els primers treballs realitzats (Avogaro 1988, Avogaro 1991) es va descriure que l'LDL(-) presentava pèrdua parcial de l'afinitat pel receptor d'LDL, però no era reconeguda pel receptor "scavenger" expressat en macròfags. Aquestes

dades referents a l'afinitat pels receptors semblen correspondre amb les d'una LDL mínimament oxidada. Com també havien observat indicis de característiques fisico-químiques pròpies d'LDL oxidada, els autors proposaren que l'LDL electronegativa era una forma lleugerament oxidada present a la circulació.

Contràriament, altres autors, de manera similar a com ocorre amb les característiques fisico-químiques, obtenen resultats diferents. Alguns (Shimano 1991) no van trobar diferències en l'afinitat pel rLDL ni en la captació per macròfags per part de l'LDL electronegativa, mentres que altres (Chappey 1995a i Demuth 1996) van descriure que aquesta fracció més electronegativa de l'LDL tenia una afinitat lleugerament major pel receptor d'LDL. Aquest increment d'afinitat el justifiquen per l'enriquiment en apoproteïna E (apo E), la qual és un lligand del rLDL.

D'altra banda, dos estudis descriuen que l'LDL electronegativa induïx l'acumulació d'ésters de colesterol. Els resultats d'uns (Tertov 1995), de que l'LDL electronegativa induïa acumulació de colesterol esterificat en SMC, estaven en contra del que els mateixos autors havien trobat anteriorment (Cazzolato 1991) de que l'LDL electronegativa no era reconeguda pel SR de macròfags. Aquests autors també observaren que la forma desialitzada d'LDL té capacitat d'augmentar el contingut d'ésters de colesterol intracel·lular, per aquesta i altres coincidències arriben a la conclusió de l'LDL electronegativa podria ser una forma desialitzada. L'altre estudi (Holvoet 1995) també indicava que l'LDL electronegativa és reconeguda pel SR i en conseqüència podia generar cèl·lules espumoses.

6.3 EFECTES BIOLÒGICS DE L'LDL ELECTRONEGATIVA

Malgrat les diferències entre els treballs en la interacció amb els receptors i les característiques oxidatives, en un dels aspectes en què no es troben discordàncies entre els grups és en el poder citotòxic de l'LDL electronegativa cap a cultius de cèl.lules endotelials.

Respecte a aquest tema, és important un treball (Hodis 1994) en què l'LDL electronegativa, aïllada provenia de micos *Cynomolgus*, induïa citotoxicitat cap a cèl.lules endotelials d'aorta de conill. Aquest efecte es va atribuir al elevat contingut en colesterol oxidat de la partícula, que, segons aquests autors, va correspondre al 50% del colesterol total, valorat per cromatografia de gasos, respecte al 10% en la forma nativa. Aquest contingut tan elevat en oxisterols en l'LDL electronegativa és poc factible de trobar-se "in vivo", i en cap altre treball, ni tan sols del mateix grup, s'ha ratificat aquest resultat.

Un altre estudi (Sevanian 1995) va confirmar que l'LDL electronegativa era citotòxica per a les cèl.lules endotelials, fet que s'explicava pel seu enriquiment en colesterol oxidat, d'un 30%, ja que els productes d'oxidació del colesterol provoquen disfunció a la membrana cel.lular i alteren el transport iònic afectant a la bomba de Na-K, de manera que augmenten el flux de calci, que és citotòxic, i també modifica el flux de sodi i potasi.

També un treball de Demuth (Demuth 1996) coincideix en que l'LDL(-) és altament citotòxica per cèl.lules endotelials HUVEC en cultiu. Malgrat aquest poder citotòxic, aquests autors no troben que l'LDL electronegativa presenti característiques pròpies d'una forma oxidada. Per tant, això descarta que la citotoxicitat produïda per l'LDL electronegativa sigui deguda a oxidació de la partícula.

6.4 SITUACIONS FISIOPATOLÒGIQUES AMB INCREMENT DE L'LDL ELECTRONEGATIVA.

S'ha descrit que el percentatge d'LDL electronegativa es troba augmentat en diferents situacions, algunes d'elles patològiques amb risc cardiovascular associat, entre les quals estan: la malaltia renal, l'exercici físic, la diabetes (DM) o la hipercolesterolemia familiar (HF). Seria d'interés discernir quina podria ser la causa de l'electronegativitat en aquests diferents casos per descobrir l'origen i natura de l'LDL electronegativa. També aquest coneixement podria permetre tractar de normalitzar el percentatge d'LDL electronegativa en aquests casos en què es troba incrementat.

En malalts renals sotmesos a diàlisi, els quals presenten major risc ateroscleròtic, tenen augmentat el percentatge d'LDL electronegativa (Ziouzenkova 99 i 2000), sembla que una de les causes és el procés d'hemodiàlisi (Ziouzenkova 1999).

En el cas de l'exercici aeròbic agut s'ha descrit un augment en LDL electronegativa i també un increment en la susceptibilitat a l'oxidació (Sánchez-Quesada 1995). A més, en aquesta situació l'administració prèvia d'àcid ascòrbic inhibia ambdós efectes (Sánchez-Quesada 1998). Aquests resultats semblaven suggerir que l'origen de l'LDL electronegativa en l'exercici agut era oxidatiu. En contrast amb això, avaluant l'efecte de l'exercici a llarg plaç es va observar una resistència a l'oxidació incrementada (Sánchez-Quesada 1997) i un percentatge d'LDL electronegativa similar al del grup control. Aprofundint en aquest tema, resultats més recents indiquen que l'augment d'LDL electronegativa després de l'exercici intens no és degut a l'efecte de l'estrés oxidatiu sobre l'LDL, sinó a un augment en el seu contingut en NEFA (Benítez 2002).

En la diabetis, l'arteriosclerosi és la principal causa de mortalitat (Pyorala 1987). Els pacients diabètics presenten un percentatge elevat d'LDL glicada (Klein 1995). La glicació de l'LDL "in vitro" comporta una major càrrega negativa, i com l'LDL de pacients diabètics, tant de tipus I com de tipus II, presenten un percentatge anormalment elevat d'LDL electronegativa (Moro 1998 i 1999, Sánchez-Quesada 1996 i 2001), la causa d'aquesta electronegativitat podria ser atribuïda a la glicació.

En els diabètics tipus 1 (DMI) es va comprovar que la glicació que presenta l'LDL es correlacionava amb la proporció augmentada d'LDL electronegativa d'aquests individus i que podria ser la causa del seu origen (Sánchez- Quesada 1996). Però no succeeix el mateix en els DMII en què en l'augment d'LDL(-) semblen estar implicats altres mecanismes com l'oxidació, ja que la seva LDL total és més susceptible a oxidar-se i aquesta característica juntament amb l'elevat percentatge d'LDL electronegativa no es modifiquen pel tractament amb insulina que sí provoca una normalització del perfil glicèmic i una disminució de l'LDL glicada (Sánchez- Quesada 2001).

Els individus afectats d'hipercolesterolèmia familiar (HF) són una part fonamental d'estudi en la present tesi doctoral. És interessant el cas d'aquesta patologia, ja que es troba associada a un major risc cardiovascular i una elevada proporció d'LDL(-). Aquests pacients es caracteritzen per tenir disminuïda o anul·lada la captació de l'LDL pel rLDL, fet que és degut a diferents mutacions en el gen del rLDL. En qualsevol cas, com l'aclariment de l'LDL és deficient, els nivells plasmàtics d'LDL augmenten i també es prolonga el seu temps de residència a circulació i, en romandre més temps al plasma, està més exposada a modificacions i això podria comportar la formació d'LDL electronegativa. Respecte a quin tipus de modificació pot afectar a la partícula d'LDL per tal d'incrementar la seva electronegativitat no és un tema que estigui clar.

Dades trobades pel nostre grup (Sánchez-Quesada 1999) indiquen que els HF presenten un elevat percentatge d'LDL electronegativa en front els normolipèmics (NL), però no suggereixen que la partícula estigui més oxidada o sigui més susceptible a oxidar-se que la d'NL. I a més, després d'un tractament de sis mesos amb simvastatina es va produir una gran disminució en la proporció d'LDL(-) sense modificar-se la susceptibilitat a l'oxidació.

Referent a la possibilitat de que l'origen de l'LDL electronegativa elevada en els individus HF sigui l'oxidació o una partícula d'LDL més susceptible a l'oxidació, existeixen diferents resultats. Alguns autors suggereixen que en la hipercolesterèmia familiar l'LDL és més susceptible a l'oxidació (Napoli 1995, Lavy 1991) i presenta algunes característiques pròpies de la forma oxidada com fragmentació de l'apoB, elevat nivell basal de lipoperòxids i disminuït de vitamina E o baixa activitat de la PAF-AH (Napoli 1995). També hi han dades de major susceptibilitat a l'oxidació en pacients amb apolipoproteïna B defectiva (Stalenhoef 1994). Contràriament, altres estudis indiquen que l'LDL d'HF és més resistent a l'oxidació (Raal 1995). De fet, l'LDL d'HF no tindria perquè ser més oxidable, ja que en ells predominen les partícules lleugeres i de major grandària, i el que està descrit és que són les formes denses les més susceptibles a l'oxidació (de Graaf 1991).

Referent al tamany de la partícula, en els individus HF predominen les LDL enriquides en colesterol i de major grandària i menor densitat, i desenvolupen aterosclerosi de forma precoç (Raal 1999). Això podria ser contradictori amb el fet de que l'LDL petita i densa és la població de partícules considerada més aterogènica. Però també hi han proves d'associació entre partícules lleugeres d'LDL i risc ateroscлерòtic en primats (Rudel 1985 i 1986) i en humans (Campos 1995). Independentment del seu tamany, al fet que l'LDL sigui més o menys aterogènica hi contribuiran segurament diferents aspectes de la partícula, i, a més de la composició, hi ha una forta dependència d'altres variables.

6.4 DISCREPÀNCIES EN L'ESTUDI DE L'LDL ELECTRONEGATIVA

Si es consideren globalment els estudis dels diferents grups sobre LDL electronegativa, en tots ells es ratifica l'existència d'una forma d'LDL en circulació que presenta una càrrega més negativa en individus normolipèmics, però respecte a les seves característiques i origen es troba que els resultats són força contradictoris. En els únics punts en què no hi ha discrepància és en la càrrega electronegativa de la partícula, en la seva citotoxicitat cap a cèl·lules endotelials en cultiu i en la seva major densitat.

És difícil trobar una explicació coherent amb els diversos resultats obtinguts. El més probable és que es donin diferències metodològiques al moment d'aïllar l'LDL electronegativa. El percentatge de la fracció ve afectat pel tipus de gradient salí i la força iònica utilitzada per a l'elució, el que faria que en tots els treballs no es separés la mateixa fracció i això comportés característiques diferents. També influirà la concentració d'EDTA utilitzada en el tampó, concretament 10 μ M per part dels grups que troben proves de que l'LDL electronegativa és una partícula oxidada, en front de 1 mM en l'altre cas. També pot influir molt als resultats el tipus de sistema cromatogràfic, és a dir HPLC, que té components metàl·lics que podrien provocar oxidació de la partícula, o bé FPLC que no en té. De totes maneres, els resultats trobats són massa dispersos per ser justificats únicament per aquests motius. A part de la metodologia, hem de considerar que l'LDL electronegativa és una partícula que presenta heterogeneïtat entre individus i en conseqüència en funció de la població triada inicialment, l'LDL electronegativa aïllada presentarà diferents característiques.

En conclusió, l'LDL electronegativa és una partícula de la qual no es coneixen bé les seves propietats, origen i implicació en el procés ateroscleròtic, havent en aquests aspectes diferents resultats, i sent per tant un interessant motiu d'estudi amb l'objectiu d'aclarir aquests interrogants.