

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Universitat Autònoma de Barcelona

**TESI DOCTORAL**

**PROPIETATS ATEROGÈNIQUES DE L'LDL ELECTRONEGATIVA:  
INDUCCIÓ DE L'EXPRESSION DE CITOQUINES, ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES  
ASSOCIADES I UNIÓ A PROTEOGLICANS.**

**Cristina Bancells Bau**

2009

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Universitat Autònoma de Barcelona

**PROPIETATS ATEROGÈNIQUES DE L'LDL ELECTRONEGATIVA:  
INDUCCIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE CITOQUINES, ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES  
ASSOCIADES I UNIÓ A PROTEOGLICANS.**

Memòria presentada per la llicenciada en Bioquímica Cristina Bancells Bau per optar al grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona pel programa de doctorat en Bioquímica i Biologia Molecular.

La present Tesi doctoral ha estat realitzada al Departament de Bioquímica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, dirigida pel Dr. José Luis Sánchez Quesada i la Dra. Sònia Benítez González i com a tutor el Dr. Jordi Ordóñez Llanos.

Els directors de la tesi:

Dr. José Luis Sánchez Quesada  
Departament de Bioquímica  
Institut de Recerca Sant Pau  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Dra. Sònia Benítez González  
Departament de Bioquímica  
Institut de Recerca Sant Pau  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

El tutor:

La doctoranda:

Dr. Jordi Ordóñez Llanos  
Departament de Bioquímica  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Universitat Autònoma de Barcelona

Cristina Bancells Bau  
Departament de Bioquímica  
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, Març 2009

**ÍNDEX**

# ÍNDEX

<b>ÍNDEX</b> .....	<b>7</b>
<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>13</b>
<b>RESUM</b> .....	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>23</b>
1. MALALTIES CARDIOVASCULARS. L'ATEROSCLEROSI.....	25
1.1. Malalties cardiovasculars.....	25
1.2. L'aterosclerosi.....	26
1.3. Evolució de la placa d'ateroma.....	27
2. LA PARET ARTERIAL.....	30
2.1. Capes arterials.....	30
2.2. Proteoglicans .....	31
3. CÈL·LULES I MOLÈCULES IMPLICADES EN LA LESIÓ ATEROSCLERÒTICA.....	33
3.1. Tipus cel·lulars .....	33
3.2. Molècules inflamatòries .....	34
3.2.1. La citoquina IL-6.....	36
3.2.2. La citoquina IL-10.....	36
3.2.3. Les quimioquines MCP-1, IL-8 i GRO.....	37
3.2.4. Els factors de creixement GM-CSF i PDGF.....	38
4. METABOLISME DE LIPOPROTEÏNES I LDL .....	40
4.1. Tipus de lipoproteïnes.....	40
4.2. Transport de colesterol .....	41
4.3. LDL .....	42
5. IMPLICACIÓ DE L'LDL EN L'ATEROSCLEROSI .....	44
5.1. Paradoxa del colesterol .....	44
5.2. Mecanismes de modificació d'LDL .....	45
5.2.1. Oxidació .....	45
5.2.2. Enriquiment amb àcids grassos no esterificats .....	46
5.2.3. Agregació i/o fusió.....	47
5.2.3.1. Modificació d'LDL per la fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	48
5.2.3.2. Modificació d'LDL per la fosfolipasa C i l'esfingomielinasa .....	49
5.2.4. Altres tipus de modificacions d'LDL .....	50
5.3. Propietats aterogèniques de les LDL modificades.....	51
5.3.1. Retenció subendotelial d'LDL .....	51
5.3.2. Acumulació intracel·lular d'LDL.....	54
5.3.2.1. Receptor d'LDL .....	54
5.3.2.2. LRP1 .....	55
5.3.2.3. Receptors <i>scavenger</i> .....	55
5.3.2.4. Acumulació intracel·lular de colesterol.....	56
5.3.3. Inducció de la secreció de molècules inflamatòries.....	57

5.3.4. Altres propietats aterogèniques de les LDL modificades.....	60
<b>6. L'LDL ELECTRONEGATIVA.....</b>	<b>61</b>
6.1. Què és l'LDL electronegativa?.....	61
6.2. Situacions fisiopatològiques amb increment de l'LDL(-).....	61
6.3. Característiques físico-químiques de l'LDL(-).....	63
6.4. Característiques aterogèniques de l'LDL(-).....	64
6.4.1. Unió a receptors cel·lulars.....	64
6.4.2. Citotoxicitat i apoptosi .....	65
6.4.3. Inducció de citoquines.....	65
6.5. Possibles orígens dels components responsables de l'aterogènesi de l'LDL(-).....	66
6.5.1. Oxidació .....	67
6.5.2. Hidròlisi per la fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	68
6.5.3. Hidròlisi per l'esfingomielinasa.....	69
6.5.4. Alteració del catabolisme .....	69
6.6. paper protector de PAF-AH en l'LDL(-) .....	70
<b>HIPÒTESI I OBJECTIUS .....</b>	<b>73</b>
<b>MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>77</b>
<b>1. OBTENCIÓ, MODIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LIPOPROTEÏNES.....</b>	<b>79</b>
1.1. Aïllament d'LDL total.....	79
1.2. Aïllament d'LDL(-).....	81
1.3. Modificació <i>in vitro</i> d'LDL.....	82
1.3.1. Oxidació d'LDL.....	82
1.3.2. Acetilació d'LDL .....	83
1.3.3. Enriquiment d'LDL amb NEFA.....	84
1.3.4. Modificació d'LDL amb PLA <sub>2</sub> .....	84
1.4. Caracterització físico-química de lipoproteïnes .....	85
1.4.1. Determinació de la composició proteica i lipídica .....	85
1.4.1.1. Determinació de subclasses de fosfolípids.....	86
1.4.2. Caracterització electroforètica.....	87
1.4.2.1. Electroforesi en gel d'agarosa .....	87
1.4.2.2. Electroforesi en gel d'acrilamida amb SDS.....	87
1.4.2.3. Electroforesi en gel en gradient d'acrilamida no desnaturalitzant .....	88
1.4.3. Determinació del grau d'oxidació .....	89
1.4.4. Determinació del grau d'agregació .....	91
1.4.5. Determinació de l'estructura secundària de l'apoB: dicroïsme circular .....	92
<b>2. CULTIUS CEL·LULARS .....</b>	<b>93</b>
2.1. Obtenció de cèl·lules .....	93
2.1.1. Obtenció de cèl·lules endotelials venoses .....	93
2.1.2. Obtenció de cèl·lules endotelials arterials.....	94
2.1.3. Obtenció de cèl·lules mononuclears de sang .....	94
2.2. Manteniment dels cultius cel·lulars .....	96
2.2.1. Medis de cultiu .....	96
2.2.2. Determinació de la viabilitat cel·lular.....	97
2.3. Experiments amb cultius cel·lulars .....	98
2.3.1. Tipus d'experiments realitzats.....	98

2.3.2. Procediments previs a la incubació .....	99
2.3.3. Experiments d'expressió de citoquines.....	100
2.3.4. Experiment d'associació d'LDL a les cèl·lules .....	101
<b>3. DETERMINACIÓ DE LA PRODUCCIÓ CEL·LULAR DE CITOQUINES.....</b>	<b>102</b>
3.1. Anàlisi de la secreció de citoquines .....	102
3.1.1. <i>Array</i> de citoquines .....	102
3.1.2. Quantificació de citoquines mitjançant ELISA .....	105
3.2. Anàlisi de l'expressió de citoquines .....	106
3.2.1. Extracció d'RNA.....	106
3.2.2. Transcripció reversa d'RNA.....	107
3.2.3. Anàlisi d'expressió d'RNA per RT-PCR.....	107
<b>4. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES.....</b>	<b>109</b>
4.1. Assaig fluorimètric d'activitats fosfolipolítiques: SMasa, PLC i lisoPLC.....	109
4.1.1. Aïllament de PAF-AH.....	111
4.2. Assaig de l'activitat SMasa amb substrat fluorescent.....	112
4.3. Assaig de l'activitat PAF-AH .....	113
4.4. Assaig de l'activitat PLA <sub>2</sub> .....	113
<b>5. ESTUDIS D'UNIÓ D'LDL A PROTEOGLICANS .....</b>	<b>114</b>
5.1. Obtenció de proteoglicans d'aorta .....	114
5.2. Determinació de la unió d'LDL a Proteoglicans .....	115
5.2.1. Precipitació de complexos d'LDL-GAG.....	115
5.2.2. Incubació d'LDL en placa amb PG immobilitzats .....	115
5.2.3. Cromatografia d'afinitat de PG.....	116
5.3. Cromatografia d'immunoafinitat anti-apoE.....	117
<b>6. MÈTODES ESTADÍSTICS .....</b>	<b>118</b>
<b>PUBLICACIONS .....</b>	<b>119</b>
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>123</b>
<b>BLOC A: EFECTE INFLAMATORI DE L'LDL(-).....</b>	<b>125</b>
1. Efecte sobre cèl·lules endotelials.....	125
2. Efecte sobre cèl·lules mononuclears .....	127
3. Interrelacions entre les citoquines .....	128
4. Possibles mecanismes d'acció .....	130
4.1. Molècules implicades.....	130
4.2. Receptors implicats.....	131
4.3. Vies de senyalització.....	132
5. Rellevància fisiopatològica de l'activitat inflamatòria de l'LDL(-) .....	132
<b>BLOC B. ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES ASSOCIADES A L'LDL(-) I UNIÓ A PROTEOGLICANS.....</b>	<b>135</b>
1. Activitat fosfolipolítica tipus fosfolipasa C .....	135
1.1. Possible origen de l'activitat fosfolipolítica.....	136
2. Unió a proteoglicans .....	139
2.1. Possible causa de la major unió a proteoglicans.....	140
3. Rellevància fisiopatològica de l'activitat fosfolipolítica i la unió a proteoglicans .....	142
3.1. Apoptosi i inflamació .....	143

## Índex

3.2. Agregació, unió a receptors i a proteoglicans .....	143
4. Té un possible paper anti-aterogènic l'LDL(-)?.....	145
4.1. Paper modulador de la IL-10.....	145
4.2. Activitat lisoPLC .....	146
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>153</b>
<b>AGRAÏMENTS .....</b>	<b>175</b>
<b>ANNEX.....</b>	<b>179</b>

## **ABREVIATURES**



**ABREVIATURES**

AP-1	proteïna activadora 1
ACAT	acil-CoA-colesterol acil-tansferasa
Ang	angiogenina
Apo	apolipoproteïna
APS	persulfat amònic
BCA	àcid bicinconínic
BE/TA	bromur d'etidi/taronja d'acridina
BHT	butirat hidroxitoluè
BODIPY	boron-dipirrometà
BSA	albúmina de sèrum boví
CCR2	receptor 2 de quimioquines tipus CC
CE	colesterol esterificat
CETP	proteïna transferidora d'ésters de colesterol
CRP	proteïna C-reactiva
CSF	factor estimulant de colònies
CT	colesterol total
Ct	cicle lliandar, <i>cycle threshold</i>
CV	coeficients de variació
Dil	dioctadecil-indocarbocianina perclorat
DEPC	dietilpirocarbonat
DTNB	5,5'-ditio-bis-(àcid 2-nitrobenzoic)
ECGS	suplement de creixement de cèl·lules endotelials
EDTA	àcid etilendiaminotetracètic
EGF	factor de creixement epidèrmic
E-LDL	LDL modificada enzimàticament
ELISA	assaig immunoabsorbent d'enzim unit
ENA-78	proteïna activadora de neutròfils epitelials 78
ERK1/2	quinasa reguladora de senyal extracel·lular 1 i 2
FGF	factor de creixement de fibroblasts
FPLC	cromatografia líquida ràpida de proteïnes
GAG	glucosaminoglicans
G-CSF	factor estimulant de colònies de granulòcits
GGE	gel en gradient d'acrilamida no desnaturalitzant
GM-CSF	factor estimulant de colònies de granulòcits i monòcits
GRO	oncogen relacionat amb el creixement
HDL	lipoproteïna d'alta densitat
HETE	àcid hidroxieicosatetraenoic
HF	hipercolesterolèmia familiar
HL	lipasa hepàtica
HNE	hidroxinonenal
HODE	àcid hidroxiocetadecadienoic
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució
HUAEC	cèl·lules endotelials d'artèria umbilical humana
HUVEC	cèl·lules endotelials de vena umbilical humana
ICAM-1	molècula d'adhesió intercel·lular 1

## Abreviatures

IDL	lipoproteïna de densitat intermitja
IFN $\gamma$	interferó gamma
IGF-1	factor de creixement semblant a l'insulina 1
IL	interleuquina
JNK	quinasa N-terminal c-Jun
LDH	lactat deshidrogenasa
LDL	lipoproteïna de baixa densitat
LDL(-)	LDL electronegativa
LDL(+)	LDL electropositiva, LDL nativa
LDLac	LDL acetilada
LDLmm	LDL mínimament modificada
LDL-NEFA	LDL enriquida amb NEFA
LDLox	LDL oxidada
LDL-PLA $_2$	LDL hidrolitzada amb PLA $_2$
LFA-1	antigen associat a funció limfocitària 1
lisoPLC	lisofosfolipasa C
LMB	blau de leucometilè
LOX	receptor d'LDLox tipus lectina
Lp(a)	lipoproteïna a
LPC / <i>LysoPC</i>	lisofosfatidilcolina
LPDS	sèrum deficient en lipoproteïnes
LPL	lipoproteïna lipasa
Lp-PLA $_2$	PLA $_2$ associada a lipoproteïnes
LPS	lipopolisacàrid
LRP1	proteïna relacionada amb el rLDL 1
MAPK	proteïna quinasa activada per mitogens
MCP-1	proteïna quimioattractant de monòcits 1
M-CSF	factor estimulant de colònies de monòcits-macròfags
MDA	malondialdehid
MDC	quimioquina derivada de macròfags
MIG	monoquina induïda per l'interferó gamma
MIP-1 $\delta$	proteïna inflamatòria de macròfags 1 delta
mLDL	LDL mínimament oxidada
MMP	metal·loproteïnasa de la matriu
NEFA	àcids grassos no esterificats
NF $\kappa$ B	factor nuclear kappa B
NL	normolipèmic
nSMase	esfingomielinasa neutra
OSM	oncoestatina M
oxPAPC	1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina oxidada
PAF	factor activador plaquetari
PAF-AH	acetilhidrolasa del factor activador plaquetari
PBS	tampó fosfat salí
PC	fosfatidilcolina
PDGF-B	factor de creixement derivat de plaquetes B
PECAM-1	molècula d'adhesió de plaquetes i cèl·lules endotelials 1
PG	proteoglicans

PG-CS	proteoglicans de condroití sulfat
PG-DS	proteoglicans de dermatà sulfat
PG-HS	proteoglicans d'heparà sulfat
PLA <sub>2</sub>	fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PPAR	receptor activat per proliferadors peroxisòmics
QM	quilomicrons
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
rLDL	receptor d'LDL
ROS	espècies reactives d'oxígen
RT-PCR	reacció en cadena de la polimerasa a temps real
SBF	sèrum boví fetal
SCF	factor de cèl·lules mare
SD	desviació estàndard
SDF-1	factor derivat de cèl·lules de l'estroma
SDS	dodecilsulfat sòdic
SM	esfingomielina
SMasa	esfingomielinasa
SMC	cèl·lules musculars llises
sPLA <sub>2</sub>	fosfolipasa A <sub>2</sub> secretora
SR	receptor <i>scavenger</i>
SREBP	proteïnes d'unió als elements reguladors de l'esterol
sSMasa	esfingomielinasa secretora
TARC	quimioquina regulada i activada del timus
TBARS	substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric
TEMED	tetrametiletildiamida
TG	triglicèrids
TGF	factor transformador del creixement
TGF-β1	factor transformador del creixement-beta
TMB	tetrametilbenzidina
TNF	factor de necrosi tumoral
TPO	trombopoietina
UC	colesterol lliure
VCAM-1	molècula d'adhesió de cèl·lules vasculars 1
VEGF	factor de creixement de l'endoteli vascular
VLA-4	antigen molt tardà 4
VLDL	lipoproteïna de molt baixa densitat

**RESUM**

## RESUM

L'LDL electronegativa (LDL(-)) és una fracció modificada d'LDL present a la circulació. Hi ha varies evidències que suggereixen el seu paper aterogènic ja que es troba augmentada en patologies d'alt risc cardiovascular, com en la hipercolesterolèmia familiar o en la diabetis mellitus. A més, presenta propietats inflamatòries, una major susceptibilitat a l'agregació i afinitat disminuïda pel receptor d'LDL. En la present tesi s'han estudiat algunes propietats aterogèniques d'aquesta partícula modificada, en concret s'han avaluat els següents aspectes:

1) Propietats inflamatòries. L'LDL(-) va induir una major expressió de citoquines (IL-6), quimioquines (IL-8, MCP-1 i GRO) i factors de creixement (GM-CSF) en cèl·lules endotelials de vena i d'artèria, i monòcits i limfòcits. La resposta de les cèl·lules endotelials arterials va ser major a nivell de producció total de citoquines i, a més, també van alliberar PDGF-B. No obstant, els monòcits i limfòcits, en resposta a l'LDL(-) també van expressar la citoquina anti-inflamatòria IL-10 la qual va disminuir la secreció de les altres citoquines pro-inflamatòries, modulant la resposta inflamatòria.

2) Activitat fosfolipolítica tipus fosfolipasa C associada. S'han descrit noves activitats enzimàtiques presents en l'LDL(-) que degraden eficientment fosfolípids amb colina. S'ha relacionat aquesta activitat fosfolipolítica amb la major susceptibilitat a l'agregació de l'LDL(-). Es desconeix l'origen d'aquesta activitat enzimàtica, tot i que s'ha descartat que sigui deguda al contingut augmentat en apo E, apoCIII o PAF-AH, i s'ha suggerit que en podria ser responsable una proteïna encara no identificada o la pròpia apoB-100.

3) Unió a proteoglicans de la matriu extracel·lular. Una subfracció de partícules d'LDL(-) van presentar una major unió a proteoglicans aïllats d'artèria humana. Aquesta subfracció de partícules estaven més agregades i tenien una elevada activitat fosfolipolítica. Fets que es van relacionar i, en conseqüència, es va hipotetitzar que la major activitat fosfolipolítica tipus esfingomielinasa podria provocar l'agregació de les partícules i, al mateix temps, que aquestes s'unissin amb major afinitat als proteoglicans.

En conclusió, l'LDL(-) sembla una partícula potencialment aterogènica degut a que té la capacitat d'induir diferents citoquines en cèl·lules endotelials i mononuclears, i presenta una major agregació i afinitat pels proteoglicans, fent-la propensa a la retenció subendotelial.

## **INTRODUCCIÓ**

# **1. MALALTIES CARDIOVASCULARS. L'ATEROSCLEROSI**

## **1.1. MALALTIES CARDIOVASCULARS**

Les malalties cardiovasculars són les que afecten el cor i els vasos sanguinis que l'irriguen. Segons la Organització Mundial de la Salut són la primera causa de mortalitat al món, representant el 30 % de la mortalitat total mundial (Mackay and Mensah 2004).

Una gran part de les malalties cardiovasculars són conseqüència de l'aterosclerosi, patologia que causa la remodelació i engruiximent de la paret dels vasos sanguinis formant una zona rica en lípids i teixit fibrós, anomenada placa d'ateroma. L'aterosclerosi afecta principalment les artèries de gran i mitjà calibre, i segons les zones que irriguen les artèries afectades podem diferenciar tres tipus generals de malalties cardiovasculars d'origen ateroscleròtic:

- La cardiopatia coronària: patologia dels vasos sanguinis que irriguen el múscul cardíac (artèries coronàries).
- Malalties cerebrovasculares: patologies que afecten els vasos sanguinis que irriguen el cervell (artèries caròtides).
- Arteriopaties perifèriques: malalties dels vasos sanguinis que irriguen els membres superiors i inferiors (aorta, artèries ilíaqües i artèries femorals).

L'aterosclerosi és una malaltia asimptomàtica fins que l'evolució de la placa d'ateroma, que va fent disminuir la llum del vas afectat, porta a la oclusió del vas amb la conseqüent reducció del rec sanguini. Llavors es produeixen els quadres aguts, com l'infart agut de miocardi o els accidents cerebrovasculars, que poden conduir a la mort.

Existeixen molts factors de risc de les malalties cardiovasculars d'origen ateroscleròtic que es classifiquen en factors de risc modificables i no modificables.

- Factors de risc no modificables: l'edat, la genètica i el sexe.

Pel que fa al sexe, les dones presenten, en general, un perfil lipídic més favorable, sembla que degut a les hormones femenines. Tot i que, després de la menopausa, la incidència de malaltia cardiovascular femenina incrementa.

- Factors de risc modificables. Els més importants són les hiperlipèemies, la hipertensió arterial, la diabetis, el tabaquisme, l'obesitat i el sedentarisme.

Concretament, en les hiperlipèmies, es consideren nivells elevats de colesterol plasmàtic a partir de 240 mg/dl (6,2 mM) i de triglicèrids a partir de 200 mg/dl (2,2 mM) (American-Heart-Association; Smith, Allen et al. 2006). Estan associats a l'aterosclerosi els nivells elevats de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) i els nivells baixos de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL).

## **1.2. L'ATEROSCLEROSI**

L'aterosclerosi o arteriosclerosi és un procés patològic multifactorial que es caracteritza per l'acumulació de lípids, l'activació de la resposta inflamatòria i la fibrosis de la capa íntima de la paret arterial. Això provoca un engruiximent de la paret arterial i, com a conseqüència, un estretament de la llum vascular. La pròpia lesió ateroscleròtica pot afavorir la formació de trombes que poden acabar obturant el vas i com a resultat es pot produir isquèmia a la zona irrigada pel vas obturat.

La lesió fonamental del procés ateroscleròtic és la placa d'ateroma que s'origina inicialment per l'acumulació de lípids. L'aterosclerosi és una malaltia inflamatòria, per tant, a la placa ateromatosa s'hi troben les cèl·lules pròpies de la paret arterial juntament amb leucòcits que participen en la resposta inflamatòria que hi té lloc. Concretament, formen part de la placa d'ateroma els següents components: cèl·lules endotelials; cèl·lules musculars llises (SMC) en proliferació; leucòcits, principalment monòcits-macròfags, però també limfòcits i neutròfils; lípids, sobretot colesterol oxidat formant gotes lipídiques; teixit conjuntiu extracel·lular; restes necròtiques i, en ocasions, acumulacions plaquetàries i calci (Movat, Haust et al. 1959; Haust 1971; Ross and Glomset 1976).

L'aterosclerosi és un procés complex en el que s'hi troben molts factors implicats, com els lípids, la hipertensió arterial o els factors coagulants, entre d'altres. Respecte a l'origen concret de la placa d'ateroma, han estat proposades diverses teories. Totes identifiquen un diferent fet causant que ha de ser suficient i necessari per originar la lesió.

- **Hipòtesi de la resposta a la lesió.** Proposada per Ross el 1976 i posteriorment actualitzada (Ross and Glomset 1976; Ross 1993; Ross 1999; Newby 2000) explica que l'origen de la placa ateromatosa és degut a una lesió de l'endoteli que provoca una pèrdua de la seva funcionalitat. L'inductor de la lesió és un agent nociu extern com un virus, bacteri, hipertensió, LDL, homocisteïna, tabaquisme, toxines, etc. Aquest dany en l'endoteli fa que es modifiqui la funció endotelial activant-se així la resposta inflamatòria i augmentant la permeabilitat endotelial.



- **Hipòtesi oxidativa.** Aquesta hipòtesi es basa en les modificacions oxidatives de l'LDL que acabaran induint la formació de les cèl·lules espumoses. Creuen que el paper de les lipoxigenases és clau en l'iniciació o en la participació en el procés oxidatiu. (Steinberg, Parthasarathy et al. 1989; Podrez, Schmitt et al. 1999; Steinberg 1999).
- **Hipòtesi de la resposta a la retenció.** Williams i Tabas proposen que el fet central iniciador de la lesió és la retenció subendotelial de les lipoproteïnes (Williams and Tabas 1995; Williams and Tabas 1998). Aquesta hipòtesi sosté que l'aterogènicitat de les lipoproteïnes que contenen apolipoproteïna (apo) B depèn de quatre factors: l'increment de la seva concentració plasmàtica, l'augment de la retenció de les partícules a la íntima, la disminució de l'eflux de les lipoproteïnes des de la íntima i la modificació de les lipoproteïnes retingudes.

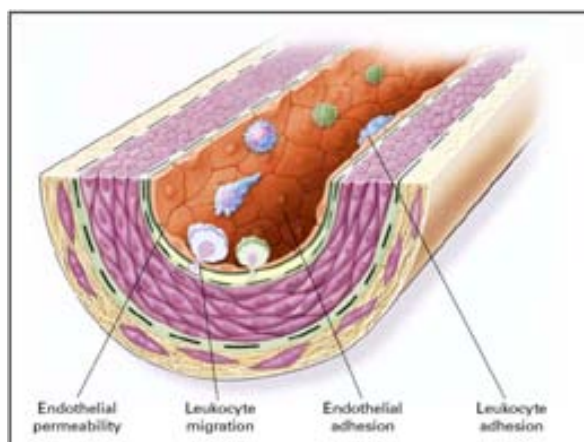
Actualment s'accepta que tots aquests mecanismes poden tenir un paper en el desenvolupament de l'aterosclerosi. La disfunció endotelial pot ser provocada per lipoproteïnes oxidades que han quedat retingudes en l'espai subendotelial i, alhora, aquesta disfunció pot ser afavorida en una zona d'acumulació de lípids. D'aquesta manera, és difícil identificar quin és el fet determinant que inicia el procés ateroscleròtic.

### **1.3. EVOLUCIÓ DE LA PLACA D'ATEROMA**

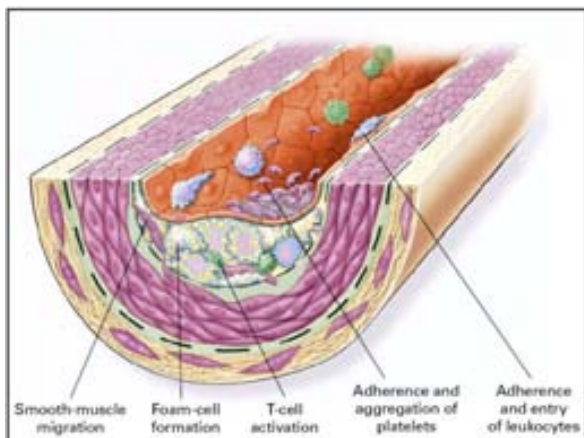
La formació de la placa d'ateroma és progressiva i es coneix que evoluciona passant per diferents estats ateroscleròtics. Un dels primers processos que hi tenen lloc és la retenció de les lipoproteïnes modificades, que es produeix en la matriu extracel·lular del subendoteli (Srinivasan, Vijayagopal et al. 1986) principalment per la unió de les lipoproteïnes als proteoglicans (PG). Com a conseqüència del segrest de lipoproteïnes a la íntima endotelial, aquestes es poden modificar, produint-se oxidació (Linden, Bondjers et al. 1989) i agregació de les partícules (Maor, Hayek et al. 2000; Oorni, Pentikainen et al. 2000). Aquestes modificacions poden comportar una sèrie d'efectes que són claus pel desenvolupament de la lesió ateroscleròtica, com l'activació de la resposta inflamatòria. Així doncs, les cèl·lules endotelials passen a expressar factors quimiotàctics i de creixement que atreuen els leucòcits circulants. Principalment, són atrets els monòcits que penetraran a l'espai subendotelial on es diferencien en macròfags. Aquests poden captar descontroladament formes modificades d'LDL que s'han acumulat a la íntima transformant-se en cèl·lules espumoses. Aquest primer estadi de la lesió es coneix com a l'estria de greix, la qual pot progressar cap a formes de lesió més complexes.

L'evolució al següent estadi es deu a la continua expressió de factors quimiotàctics i de creixement produïts per les cèl·lules constituents de la paret arterial, i també per macròfags i limfòcits. L'alliberament d'aquests factors provoca la migració i proliferació de les SMC que augmenten la secreció de components de la matriu extracel·lular. Això comportaria la formació de la lesió fibròtica. En aquest punt, la lesió ateroscleròtica és molt fràgil i es pot trencar la placa induint la trombogènesi i afavorint l'acumulació de plaquetes i fibrina a la llum del vas. Com a conseqüència es pot taponar l'artèria dificultant o impedit el rec sanguini. A la Figura 1 s'observa un esquema d'aquest procés.

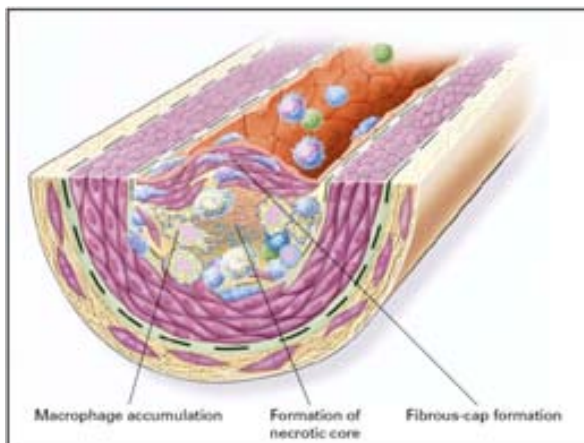
Figura 1. Progressió de la lesió ateroscleròtica. Figura adaptada de: (Ross 1999).



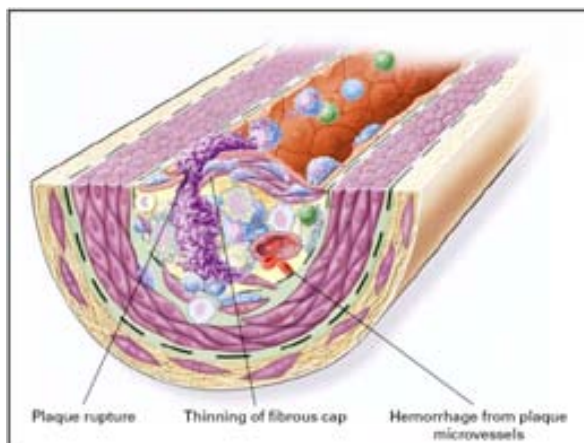
**1. LESIÓ INICIAL:** Alteració de l'endoteli i infiltració d'LDL. Increment en l'expressió de molècules d'adhesió que afavoreix la unió de leucòcits i la seva migració a l'íntima arterial. Acumulació de lípids i macròfags en l'íntima arterial. Canvis microscòpics sense lesió en el teixit.



**2. ESTRIA DE GREIX:** Retenció i modificació de les LDL en l'espai subendotelial. Acumulació de cèl·lules escumoses derivades de la captació de LDL modificades pels macròfags i SMC. Les plaques evolucionen incrementant l'acumulació de lípid extracel·lular i s'inicia la migració de les SMC i l'adhesió plaquetària. Microscòpicament s'evidencia el desordre i la lesió tissular que progressa massivament en l'íntima.



**3. LESIÓ AVANÇADA:** Continua l'acumulació de cèl·lules espumoses i es va formant un nucli lipídic necròtic. Augmenta la proliferació i migració de les SMC que incrementen la secreció de matriu extracel·lular. Aquesta acumulació de matriu extracel·lular porta a la formació de la coberta fibrosa entorn el nucli lipídic. Aquestes plaques acostumen a ser asimptomàtiques.



**4. RUPTURA DE LA PLACA:** L'activitat de determinats enzims com les metal·loproteïnases, secretades pels macròfags activats, contribueix a la ruptura de la coberta fibrosa i a la formació del trombe. S'obstrueix parcial o completament la llum del vas, donant lloc a manifestacions clíniques agudes. La reorganització del trombe per teixit connectiu i posteriors dipòsits de calci evolucionarà augmentant la oclusió del vas amb l'aparició de manifestacions isquèmiques.

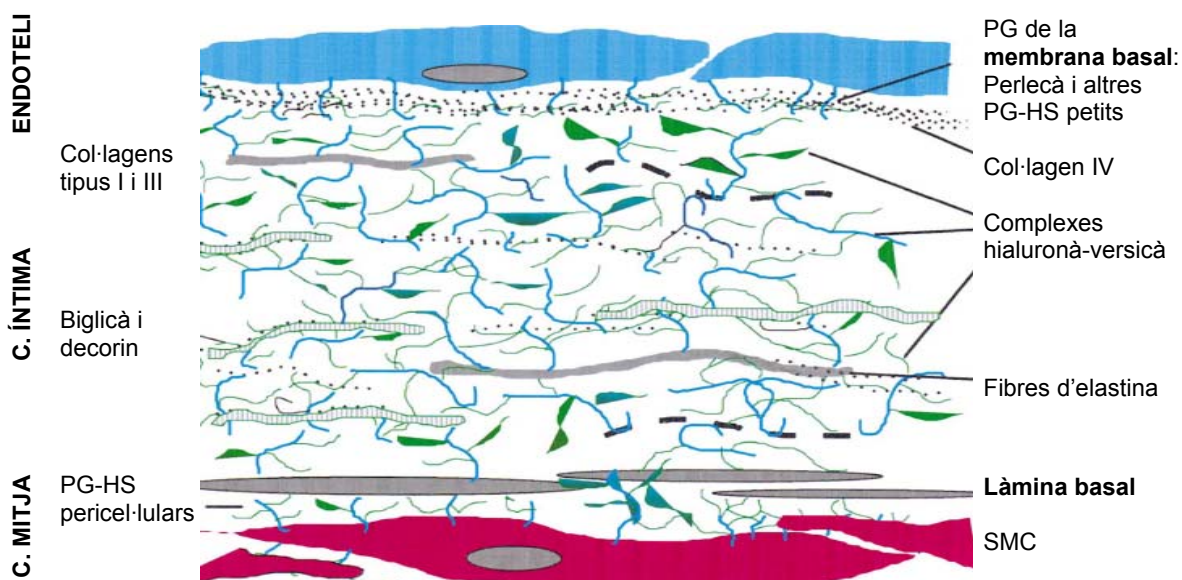
## 2. LA PARET ARTERIAL

### 2.1. CAPES ARTERIALS

La paret de les artèries està formada per tres capes histològiques diferents: l'íntima, la capa mitja i l'adventícia. La llum de l'artèria i l'íntima estan separades per una monocapa de cèl·lules endotelials. Les cèl·lules endotelials juguen un paper essencial en l'homeostasi de la circulació i dels vasos sanguinis secretant agents que regulen la relaxació i contracció de les artèries. Les cèl·lules endotelials estan ancorades a la membrana basal que està constituïda principalment de col·lagen tipus IV, de laminina i del PG heparà sulfat (PG-HS). Els PG-HS juguen un paper important en l'ensamblatge i estructuració de la membrana basal i alhora són una barrera física per les cèl·lules i les lipoproteïnes.

L'íntima està constituïda per dues capes: la capa interna i l'externa. La capa interna, o capa rica en PG, està formada també per col·lagen, hialuronan i glicoproteïnes com fibronectina i laminina (Figura 2). També s'hi troben algunes cèl·lules aïllades, com SMC amb fenotip sintetitzador, macròfags o mastòcits. La capa externa de l'íntima, o capa musculoelàstica, conté SMC de fenotip contràctil, col·lagen i fibres d'elastina.

Figura 2. Esquema de la matriu extracel·lular de la capa íntima i mitja arterial amb els principals PG. Figura adaptada de: (Camejo, Hurt-Camejo et al. 1998).



La capa mitja de la paret arterial es troba separada de l'íntima per una làmina elàstica interna formada per SMC orientades en diagonal, col·lagen, fibres elàstiques petites i PG. Les SMC de la capa mitja presenten el fenotip contractil i estan unides per les dues bandes mitjançant teixit elàstic que dona força elàstica a l'artèria i en determina el seu estat de contracció.

La capa més externa de la paret arterial, l'adventícia, està separada de la capa mitja per la làmina elàstica externa. La capa externa conté principalment fibroblasts, SMC i mastòcits envoltats per feixos de col·lagen i PG. També conté capil·lars sanguinis que aporten sang a part de la capa mitja i vasos limfàtics que s'originen en aquesta capa.

## **2.2. PROTEOGLICANS**

Els PG són un grup divers i complex de macromolècules que estan presents en tots els teixits. Són els principals constituents de la matriu extracel·lular junt amb el col·lagen i, en el cas de les artèries, formen una xarxa tridimensional que omple al voltant d'un 60 % de l'íntima arterial (Camejo, Hurt-Camejo et al. 1998).

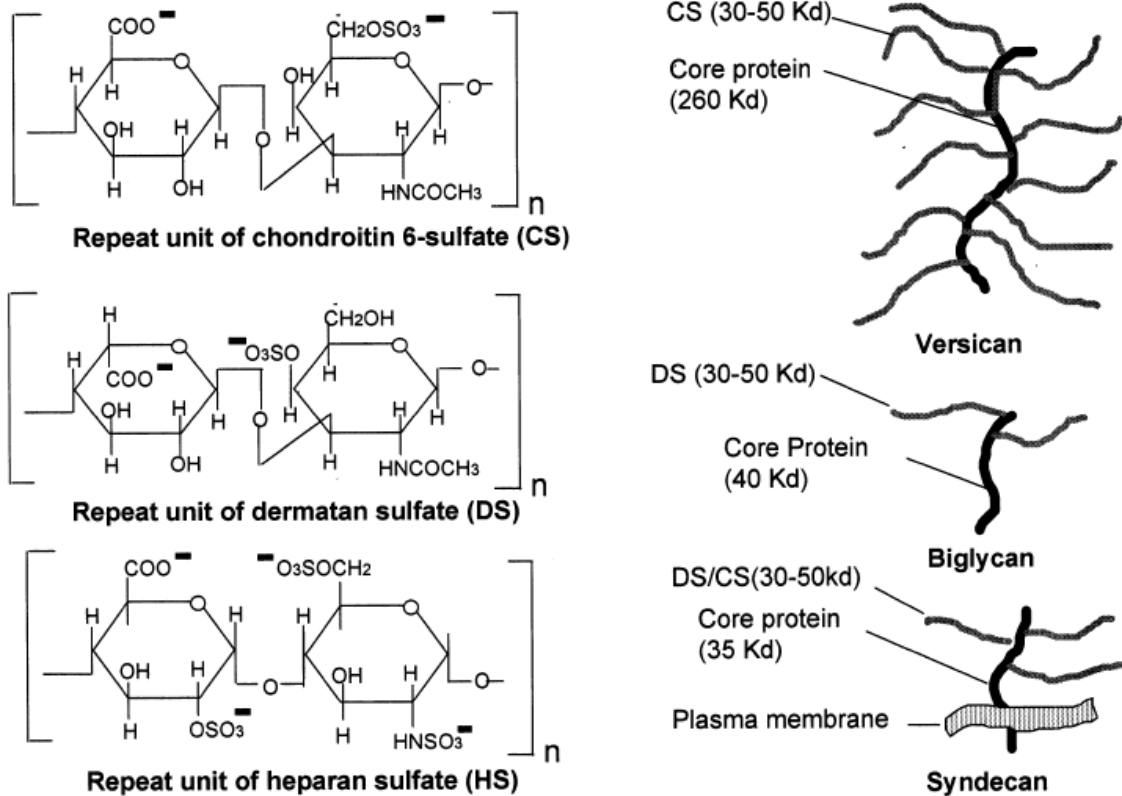
Els PG estan formats per una proteïna nucli que té unida una o més cadenes de glucosaminoglicans (GAG), els quals són repeticions de dissacàrids polianiónics units de forma lineal (Wight 1989) (Figura 3). Els GAG i els residus de serina de la proteïna nucli s'uneixen covalentment a través d'un enllaç o-glicosídic. Normalment, un tipus de GAG predomina en cada proteïna nucli, donant lloc a quatre principals famílies: PG de condroití sulfat (PG-CS), PG de dermatà sulfat (PG-DS), PG d'heparà sulfat (PG-HS) i PG de queratà sulfat.

Els PG més abundants de l'íntima arterial són els PG-CS, que es troben presents a l'espai intersticial de la matriu extracel·lular, omplint aquest espai que no està ocupat per cèl·lules o components fibrosos (Galis, Alavi et al. 1992). El principal PG-CS és el versicà, de gran mida. El segon tipus de PG més abundant és el PG-DS, grup constituït per PG petits com la decorin o el biglicà que també es troben formant part de la matriu extracel·lular de l'íntima, però preferentment situats pròxims a les fibres de col·lagen (Wight 1989; Williams 2001) (Figura 2). Per últim, trobem els PG-HS, més minoritaris i ancorats a la membrana plasmàtica de les cèl·lules, formant part de la membrana basal arterial, envoltant les cèl·lules endotelials, o associats a fibres elàstiques i envoltant les SMC (Wight 1989; Bernfield, Kokenyesi et al. 1992) (Figura 2). El principal PG-HS és el perlecà de gran mida, però també hi ha PG-HS petits, com el sindecà i el glicicà, que es localitzen a la membrana basal (Figura 2).

Introducció

La principal font de PG de l'íntima arterial són les SMC, però també en secreten petites quantitats quan estan activats les cèl·lules endotelials (Wight 1989), macròfags diferenciats (Edwards, Xu et al. 1995), limfòcits (Kolset and Gallagher 1990) i mastòcits (Kovanen 1993).

Figura 3. Estructura dels GAG dels diferents tipus de PG presents en la paret vascular (Camejo, Hurt-Camejo et al. 1998).



### **3. CÈL·LULES I MOLÈCULES IMPLICADES EN LA LESIÓ ATEROSCLERÒTICA**

L'aterosclerosi és un procés progressiu i complex en què s'hi troben molts factors implicats. A continuació es descriuran les principals cèl·lules que participen en el procés i les molècules inflammatòries involucrades.

#### **3.1. TIPUS CEL·LULARS**

En la lesió ateroscleròtica hi participen tant cèl·lules constituents de la paret arterial, cèl·lules endotelials i SMC, com cèl·lules presents en la circulació sanguínia, leucòcits i plaquetes.

Les **cèl·lules endotelials** formen l'endoteli vascular que actua com a primera barrera de la paret arterial, protegint l'íntima endotelial. L'endoteli és una barrera permeable i selectiva a través del qual s'intercanvien molècules amb el plasma. Es tracta d'un teixit dinàmic que respon a diferents estímuls, com a substàncies que modulen el seu to, estructura i funció vascular, i influeixen en el creixement i/o apoptosi cel·lular. Concretament, en resposta a una lesió, l'endoteli activa la resposta inflammatòria alliberant citoquines, quimioquines, factors de creixement i expressant molècules d'adhesió específiques per atreure els leucòcits cap a la paret vascular.

Els **leucòcits**, principalment les cèl·lules mononuclears, monòcits i limfòcits, i en menys importància neutròfils, són reclutats a l'endoteli com a resposta als factors quimiotàctics que reconeixen mitjançant diferents receptors. Per tant, migren cap a l'endoteli on s'uneixen per mitjà de molècules d'adhesió i, a continuació, penetren a l'íntima arterial per transmigració. Un cop allà, els monòcits es diferencien en macròfags que poden captar colesterol present a la lesió de manera descontrolada i convertir-se en cèl·lules espumoses. Alhora, els limfòcits i monòcits-macròfags presents a l'íntima arterial alliberen més mediadors proinflamatoris que potencien la resposta inflammatòria. A part de les citoquines, quimioquines i factors de creixement, també produeixen factors de coagulació i enzims proteolítics.

Les **SMC** són el tipus cel·lular majoritari de la paret vascular sana, representant el 90-95 % del component cel·lular, percentatge que decau fins a un 50 % en les plaques ateroscleròtiques avançades (Ip, Fuster et al. 1990; Wissler and Vesselinovitch 1990). Durant l'aterogènesi, en resposta a factors quimiotàctics i de creixement, les SMC poden migrar de la capa mitja arterial cap a l'íntima on proliferaran, incrementant d'aquesta manera l'acumulació de cèl·lules a la zona lesionada. Les SMC, generalment de fenotip

contràctil en la paret vascular sana, en resposta a factors activadors, canviaran cap a un fenotip secretor de col·lagen, PG i altres components de la matriu extracel·lular. Les SMC també es poden convertir en cèl·lules espumoses o produir mediadors de la inflamació.

Les **plaquetes** presents a la circulació sanguínia també poden adherir-se a la lesió ateroscleròtica contribuint a la seva evolució amb l'alliberació de nous factors de creixement i provocant la formació d'un trombe que pot taponar la llum vascular.

### **3.2. MOLÈCULES INFLAMATÒRIES**

L'aterogènesis es caracteritza per l'expressió i secreció de molècules mediadores de la inflamació. Les cèl·lules vasculars induïdes per diferents estímuls, un dels quals és l'LDL modificada com s'explicarà al següent apartat, secreten diferents tipus de molècules inflamatòries i en gran quantitat. Els efectes de les diferents molècules estan interrelacionats ja que els receptors de les molècules inflamatòries sovint tenen més d'un lligand i, alhora, algunes molècules poden reconèixer diferents receptors (Reape and Groot 1999). En conseqüència, les molècules inflamatòries poden induir diferents accions segons el tipus cel·lular o el microambient sobre el qual actuen, provocant efectes sinèrgics o en cadena que complicaran la resposta inflamatòria i provocaran la progressió de la lesió ateroscleròtica.

Un tipus molt important de molècules inflamatòries són les anomenades **citoquines**. Les citoquines són proteïnes de baix pes molecular que regulen diverses funcions cel·lulars com la migració, diferenciació i proliferació. Entre elles hi trobem citoquines pro-inflamatòries, com el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-8, la proteïna quimioattractant de monòcits (MCP-1) o l'oncogen relacionat amb el creixement (GRO) i anti-inflamatòries, com la IL-10, IL-4 o el factor transformador del creixement beta (TGF- $\beta$ ).

Concretament, les citoquines amb efectes quimioattractants s'anomenen **quimioquines**. La seva seqüència peptídica presenta quatre residus de cisteïna conservats i en funció dels residus que separen les dues primeres cisteïnes es subdivideixen en: C, CC, CXC i CX<sub>3</sub>C. Hi ha quimioquines que han estat relacionades amb l'aterosclerosi, com la MCP-1 (CC), IL-8 (CXC) i GRO (CXC), entre d'altres. Les quimioquines modulen les reaccions inflamatòries, ja que indueixen la migració dels leucòcits a través de l'endoteli cap als llocs d'inflamació (Springer 1994), tenint un paper clau en les etapes inicials de l'aterosclerosi.



Tot i que les quimioquines guien els leucòcits cap a la zona lesionada o inflamada, pel reconeixement específic de l'endoteli per part dels leucòcits són essencials les **molècules d'adhesió**. Les molècules d'adhesió es classifiquen en: selectines, integrines i superfamília de les immunoglobulines (Malik and Lo 1996). Les cèl·lules endotelials expressen de forma constitutiva la molècula d'adhesió de plaquetes i cèl·lules endotelials 1 (PECAM-1) i la molècula d'adhesió intercel·lular 1 (ICAM-1), de la família de les immunoglobulines. Però en resposta a certs estímuls inflamatoris poden expressar o activar molècules d'adhesió específiques per definir el tipus de leucòcit reclutat. D'aquesta manera, l'estímul per determinades citoquines indueix en les cèl·lules endotelials l'expressió d'E-selectina i de la molècula d'adhesió de cèl·lules vasculars 1 (VCAM-1), i pot regular els nivells constitutius d'ICAM-1. A la superfície de leucòcits s'hi troba L-selectina i integrines com l'antigen associat a funció limfocitària 1 (LFA-1) o l'antigen molt tardà 4 (VLA-4).

El primer contacte entre cèl·lules endotelials i leucòcits es produeix per unions febles, entre selectines i carbohidrats, que provoquen la rotació dels leucòcits al llarg de la superfície endotelial. A continuació es dona una adhesió més forta mitjançant la interacció d'integrines, com d'ICAM-1 amb LFA-1 i de VCAM-1 amb VLA-4. El pas de la primera unió reversible a la unió irreversible és degut a que els leucòcits reben un senyal d'activació de les seves integrines, donat per exemple per una quimioquina al interaccionar amb un receptor específic present en els leucòcits (Tanaka 2000). Finalment, els leucòcits travessen l'endoteli per extravasació, unint-se a molècules d'adhesió tipus PECAM, i accedeixen a la capa íntima arterial.

Un altre tipus de molècules inflamatòries són els **factors de creixement**, que com el seu nom indica, indueixen el creixement de les cèl·lules, ja sigui la proliferació o la diferenciació cel·lular. En l'aterosclerosi, són fets claus la proliferació de les SMC i la diferenciació de monòcits en macròfags. Alguns dels factors de creixement que estan implicats en l'aterosclerosi són el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), el factor de creixement epidèrmic (EGF), el factor de creixement de fibroblasts (FGF), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) i els factors estimulants de colònies (CSF).

La secreció de molècules inflamatòries per part de les cèl·lules vasculars es dona per les vies de transducció de senyal principalment mitjançades per les proteïnes quinases activada per mitogens (MAPK). Les principals vies de transducció de senyal MAPK dels mamífers inclouen la quinasa reguladora de senyal extracel·lular 1 i 2 (ERK1/2), la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) i la MAPK p38. S'ha descrit que és la via de la p38 la que juga un paper especialment important en l'expressió de varis gens de citoquines i quimioquines

(Perregaux, Dean et al. 1995; Ono and Han 2000). A més, s'ha descrit que les regions promotores de la majoria de les citoquines pro-aterogèniques, com la IL-8 i MCP-1, contenen llocs d'unió consens dels factors de transcripció factor nuclear kappa B (NFκB) i de la proteïna activadora 1 (AP-1) (Roebuck, Carpenter et al. 1999).

A continuació es revisa breument el paper en l'aterosclerosi de les molècules inflamatòries que estan relacionades amb els resultats d'aquesta tesi: les citoquines IL-6 i IL-10, les quimioquines MCP-1, IL-8 i GRO, i els factors de creixement GM-CSF i PDGF.

### **3.2.1. LA CITOQUINA IL-6**

Una de les citoquines pro-inflamatòries relacionades amb l'aterosclerosi és la IL-6. Es tracta d'una citoquina multifuncional que pot promoure la producció d'anticossos (Akira, Hirano et al. 1990), induir la diferenciació de monòcits a macròfags (Chomarat, Banchereau et al. 2000) i la proliferació de SMC (Nabata, Morimoto et al. 1990). També promou la síntesis de la proteïna C-reactiva, sent un mediador central de la resposta inflamatòria de fase aguda (Ridker, Rifai et al. 2000). S'ha trobat que la IL-6 colocalitza amb macròfags (Kishikawa, Shimokama et al. 1993; Sukovich, Kauser et al. 1998; Schieffer, Schieffer et al. 2000) i SMC (Kishikawa, Shimokama et al. 1993), i s'ha vist que les cèl·lules endotelials poden secretar-la en resposta a un estímul inflamatori (Muñoz, Pascual-Salcedo et al. 1996) suggerint que la majoria dels tipus cel·lulars vasculars poden ser induïts a secretar IL-6.

Pel que fa a la seva implicació en l'aterosclerosi, s'ha detectat expressió d'IL-6 en lesions arterioscleròtiques de teixit humà (Kishikawa, Shimokama et al. 1993; Rus, Vlaicu et al. 1996; Schieffer, Schieffer et al. 2000), en rates hipercolesterolèmiques (Ikeda, Ikeda et al. 1992) i en ratolins deficients en apoE (Sukovich, Kauser et al. 1998). També s'ha descrit que nivells elevats de IL-6 correlacionen positivament amb l'extensió d'aterosclerosi coronària (Erren, Reinecke et al. 1999) i infart de miocardi (Ridker, Rifai et al. 2000; Ikeda, Ito et al. 2001). D'altra banda, s'ha observat que aquesta interleuquina pot contribuir a l'estat sistèmic pro-inflamatori característic de diferents tipus de malaltia arterial coronària reflectit per nivells plasmàtics incrementats de proteïna C-reactiva (Ridker 2003).

### **3.2.2. LA CITOQUINA IL-10**

Per altra banda, hi ha citoquines amb acció anti-inflamatòria i la IL-10 en seria una de les principals. La IL-10 és secretada principalment per monòcits i en menor part per limfòcits, i la seva funció seria contrarestar una resposta inflamatòria excessiva (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). L'acció que porta a terme sobre les cèl·lules vasculars comença per

activar els limfòcits T del fenotip anti-inflamatori Th2 (Uyemura, Demer et al. 1996) que es contraposa al fenotip inflamatori Th1. També participa en la inhibició de la interacció dels monòcits amb l'endoteli (Pinderski Oslund, Hedrick et al. 1999), l'apoptosi (Arai, Hiromatsu et al. 1995; Cohen, Crawley et al. 1997) i la fagocitosi (Capsoni, Minonzio et al. 1998). A més, la IL-10 té un paper important en la disminució de la producció de citokines inflamatòries en diferents tipus de cèl·lules estimulades (de Waal Malefyt, Abrams et al. 1991).

La relació entre la IL-10 i l'aterosclerosi està àmpliament acceptada, ja que diferents estudis clínics en humans troben nivells de IL-10 incrementats en síndromes coronaris aguts (Heeschen, Dimmeler et al. 2003; Mizia-Stec, Gasior et al. 2003), diabetis (Mysliwska, Zorena et al. 2005) i placa ateroscleròtica (Mallat, Heymes et al. 1999). D'altra banda, s'ha estudiat el paper modulador de la IL-10 en ratolins i s'ha observat que els animals que sobreexpressen IL-10 presenten una menor lesió ateroscleròtica (Pinderski Oslund, Hedrick et al. 1999; Liu, Li et al. 2006) mentre que ratolins amb manca d'IL-10 desenvolupen més aterosclerosi (Ajuebor, Das et al. 1999; Potteaux, Esposito et al. 2004) i malaltia autoimmunitària (Kuhn, Lohler et al. 1993).

### **3.2.3. LES QUIMIOQUINES MCP-1, IL-8 I GRO**

MCP-1, IL-8 i GRO són citokines quimiotàctiques, o quimioquines, que són alliberades per les cèl·lules vasculars en resposta a diferents estímuls, com poden ser TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o LDL oxidada (LDL<sub>ox</sub>). S'ha vist que participen en el reclutament de monòcits (principalment MCP-1, però també IL-8 i GRO), limfòcits T (IL-8, però també MCP-1) i neutròfils (GRO i IL-8) en les àrees susceptibles d'aterosclerosi de la paret arterial (Balentien, Han et al. 1990; Terkeltaub, Boisvert et al. 1998; Gerszten, Garcia-Zepeda et al. 1999; Smith, Galkina et al. 2005). MCP-1 és expressat per monòcits-macròfags, SMC i cèl·lules endotelials (Nelken, Coughlin et al. 1991; Yla-Herttuala, Lipton et al. 1991; Takeya, Yoshimura et al. 1993; Apostolopoulos, Davenport et al. 1996). IL-8 i GRO són produïts principalment per monòcits-macròfags, tot i que també per cèl·lules endotelials i fibroblasts (Moser, Schumacher et al. 1991; Apostolopoulos, Davenport et al. 1996; Wang, Tabas et al. 1996).

Per tal de confirmar la importància d'aquestes quimioquines en l'aterosclerosi, s'han realitzat experiments amb models animals d'aterosclerosi, observant-se l'atenuació de la patologia en ratolins en els quals s'ha bloquejant la funció d'MCP-1 (Gosling, Slaymaker et al. 1999; Ni, Egashira et al. 2001) o eliminat el seu receptor (receptor de quimioquines CCR2) (Boring, Gosling et al. 1998). Concretament, s'ha descrit que el transplantament de

cèl·lules de mèdul·la òssia provinent de ratolins que sobreexpressen MCP-1 a ratolins knockout d'apoE irradiats porta a un augment de l'aterosclerosi (Aiello, Bourassa et al. 1999). També, que el transplantament de mèdul·la òssia des de ratolins mancats del receptor d'IL-8 (receptor de quimioquines CXCR2) cap a ratolins deficients pel receptor d'LDL (rLDL) provoca una disminució de l'aterosclerosi (Boisvert, Santiago et al. 1998). Ambdós casos, suggereixen que MCP-1 i IL-8 juguen un paper significant en l'aterogènesi. Pel que fa a la família de GRO, que comprèn  $GRO\alpha$ ,  $GRO\beta$  i  $GRO\gamma$ , també hi ha articles que els relacionen amb l'aterosclerosi (Papadopoulou, Corrigall et al. 2008) i sembla que tindrien efectes semblants als de IL-8, ja que són lligands dels mateixos receptors, CXCR1 i CXCR2 (Moser, Schumacher et al. 1991; Cerretti, Nelson et al. 1993).

### **3.2.4. ELS FACTORS DE CREIXEMENT GM-CSF I PDGF**

El factor de creixement GM-CSF (factor estimulador de colònies de granulòcits i monòcits), com el seu nom indica, juga un paper important en la diferenciació i la formació de colònies de granulòcits (neutròfils, basòfils i eosinòfils) i monòcits (Sakai, Kobori et al. 2000). És sintetitzat per macròfags, cèl·lules endotelials, fibroblasts i limfòcits (Shi, Liu et al. 2006). La seva implicació en l'aterosclerosi és clara ja que la proliferació d'aquests tipus cel·lulars és un pas inicial en la formació de cèl·lules espumoses. Una altra funció de GM-CSF, que dóna idea de la polivalència de les molècules inflamàtores, és la seva acció com a quimioquina atraient de neutròfils (Gomez-Cambronero, Horn et al. 2003). A més, GM-CSF també participa en la modulació de l'expressió de col·lagen tipus VIII de les SMC (Plenz, Reichenberg et al. 1999) que pot influenciar processos com la mobilització cel·lular, l'estabilitat de la placa o l'organització del trombe. Per altra banda, aquest factor de creixement estimula les mieloperoxidases, que són enzims prooxidants altament expressats en macròfags i involucrats en modificacions oxidatives de les lipoproteïnes (Savenkova, Mueller et al. 1994).

Pel que fa al PDGF (factor de creixement derivat de plaquetes), va ser descobert com a principal factor mitogènic del sèrum secretat per plaquetes activades durant el procés de coagulació (Kohler and Lipton 1974). Es tracta d'una família de tres proteïnes formades per la combinació de dues cadenes peptídiques diferents (A i B) que donen les formes dimèriques PDGF-AA, -AB i -BB (Heldin and Westermark 1999). Els seus efectes són mediatos a través de dos receptors,  $\alpha$  i  $\beta$ , que són expressats diferentment segons el tipus cel·lulars permetent una acció específica (Ferns, Sprugel et al. 1990). Tot i que el PDGF va ser inicialment aïllat a partir de plaquetes, s'ha vist que també és expressat per totes les cèl·lules de la paret vascular, incluent SMC, cèl·lules endotelials i macròfags (Barrett and Benditt 1988; Hart and Clowes 1997). En general, les formes de PDGF són potents

estimuladors de la mitosis de SMC i fibroblasts, i també són quimiotàctiques per aquestes mateixes cèl·lules i per neutròfils i cèl·lules mononuclears (Raines, Bowen-Pope et al. 1990; Ross, Bowen-Pope et al. 1990). Altres accions en què també hi estan implicades són en l'estimulació de la fagocitosis dels neutròfils o en la regulació del moviment de les SMC de la capa mitja arterial a la íntima (Hart and Clowes 1997; Raines 2004). Existeixen evidències *in vivo* que relacionen la forma PDGF-BB, sintetitzada principalment per macròfags, amb l'aterosclerosi ja que s'ha trobat en tots els estats de desenvolupament de la lesió, on es creu que actua com a quimioquina i com agent estimulador del creixement de SMC (Ross, Masuda et al. 1990).

## 4. METABOLISME DE LIPOPROTEÏNES I LDL

### 4.1. TIPUS DE LIPOPROTEÏNES

Els lípids tenen diferents funcions fisiològiques: energètica, estructural, en la formació de membranes cel·lulars, i com a precursors d'hormones esteroidees, prostaglandines i àcids biliars. La característica comuna dels lípids és la seva insolubilitat en l'aigua, i per tant, han de ser transportats en la circulació solubilitzats en forma de lipoproteïna.

Les lipoproteïnes són partícules esfèriques o discoidals, formades per l'agrupació de molècules lipídiques i proteiques. Presenten una gran heterogeneïtat pel que fa a la composició, grandària i funció. La seva classificació es basa en la diferent densitat, degut a que s'aïllen per ultracentrifugació en funció d'aquest paràmetre (Havel, Eder et al. 1955). A la Taula 1 es resumeixen les característiques principals de cada tipus de lipoproteïna.

Taula 1. Principals característiques, funció i composició de les diferents lipoproteïnes.

	<b>QM</b>	<b>VLDL</b>	<b>IDL</b>	<b>LDL</b>	<b>Lp(a)</b>	<b>HDL</b>
	Quilomicrons	Lipoproteïna de molt baixa densitat	Lipoproteïna de densitat intermitja	Lipoproteïna de baixa densitat	Lipoproteïna (a)	Lipoproteïna d'alta densitat
<b>Densitat (Kg/L)</b>	< 0,096	0,096-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,050-1,100	1,063-1,210
<b>Diametre (nm)</b>	100-1000	35-80	30-40	18-28	28-32	5-12
<b>Origen</b>	Lípids dieta	Hepàtic	A partir de lipòlisi de VLDL	A partir de lipòlisi d'IDL i VLDL	Hepàtic	Teixits perifèrics
<b>Funció principal</b>	Transport dels lípids de la dieta	Transport de TG sintetitzats al fetge	Es troba augmentada en patologies	Transport de CT a teixits perifèrics	Es troba augmentada en patologies	Transport revers de CT
<b>Vida mitja</b>	1 hora	1-3 hores		1,5-3,5 dies		5-6 dies
<b>Composició</b>						
Triglicèrids	81 %	52 %	15 %	8 %	6 %	8 %
Colesterol	9 %	22 %	48 %	47 %	44 %	19 %
Fosfolípids	8 %	19 %	22 %	23 %	20 %	27 %
Proteïna	2 %	7 %	15 %	22 %	30 %	46 %
<b>Apolipoproteïnes principals</b>	B-48 E A-I, A-II C-I, C-II, C-III	B-100 E C-I, C-II, C-III	B-100 E C-III	B-100	B-100 (a)	A-I, A-II D E

TG: triglicèrids, CT: colesterol total.

Cada tipus de lipoproteïna varia en la seva proporció de lípids i proteïnes, variant també de mida i densitat. La fracció proteica està constituïda principalment per diferents apolipoproteïnes que són importants en el transport i la metabolització dels lípids. La part lipídica de les lipoproteïnes consta de lípids apolars, triglicèrids i ésters de colesterol, que es troben al centre de la partícula, formant el nucli hidrofòbic, i de lípids polars, colesterol lliure i fosfolípids, situats a la superfície lipoproteica juntament amb les apolipoproteïnes. També formen part de les lipoproteïnes altres molècules minoritàries, com diferents enzims i antioxidants.

#### **4.2. TRANSPORT DE COLESTEROL**

Alteracions del metabolisme de les lipoproteïnes donen lloc a la malaltia aterioscleròtica, en la que hi té un paper central el colesterol. El transport del colesterol es dona en tres sentits. Primer, els lípids provinents de la ingesta passen de l'intestí cap al fetge, sent transportat via linfàtica i sanguínia pels quilomicrons. Durant aquest trajecte els triglicèrids dels quilomicrons són hidrolitzats per la lipoproteïna lipasa (LPL) i perden part del seu contingut lipídic que és captat per les cèl·lules. Aquests quilomicrons residuals són internalitzats i catabolitzats pel fetge mitjançant la lipasa hepàtica (HL).

Segon, es dona el transport del colesterol des del fetge cap a les cèl·lules dels teixits que el necessitin. Aquest transport és dut a terme per tres tipus de lipoproteïnes: VLDL, IDL i LDL, consecutivament. Així doncs, el colesterol i els triglicèrids són empaquetats en les VLDL al fetge i secretats a la circulació plasmàtica. Al llarg del trajecte els triglicèrids de les VLDL són metabolitzats per la LPL i la proteïna transferidora d'ésters de colesterol (CETP) que intercanvia colesterol i triglicèrids amb altres lipoproteïnes. Al mateix temps, les VLDL capturen noves apolipoproteïnes, transformant-se en IDL i, a continuació, en LDL que és el principal transportador de colesterol. Les LDL s'uneixen al rLDL de les cèl·lules dels teixits, sent endocitades i posteriorment degradades en els compartiments lisosomals per les hidrolases àcides.

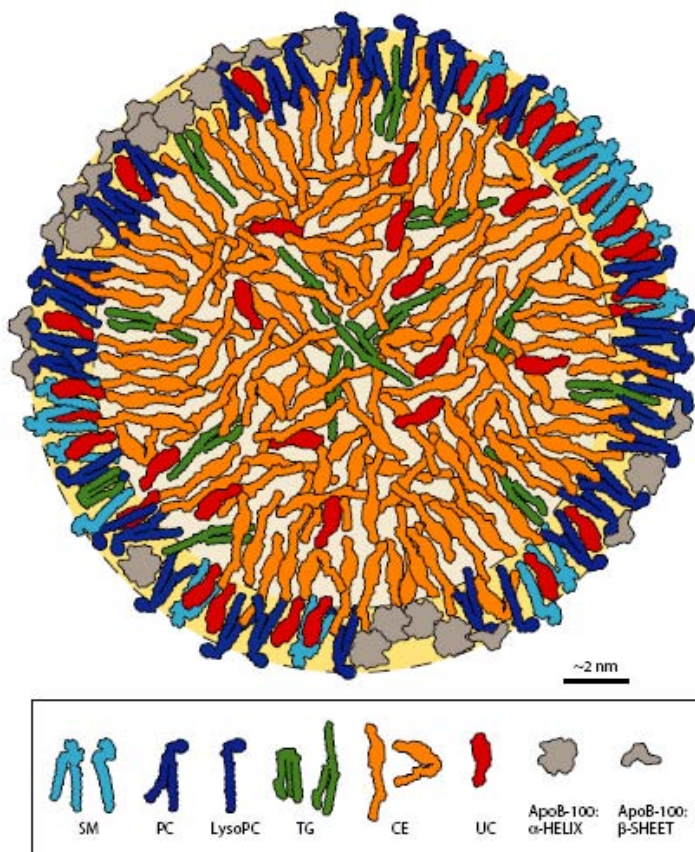
La tercera direcció del transport del colesterol és des dels teixits cap al fetge i s'anomena transport revers de colesterol. Aquest transport és necessari per tal d'eliminar l'excés de colesterol dels teixits perifèrics. Les lipoproteïnes responsables són les HDL que capturen l'excés de colesterol dipositat a les membranes cel·lulars i el condueixen al fetge per ser secretat en forma de sals biliars.

### 4.3. LDL

L'LDL és el principal transportador de colesterol a la sang i perquè desenvolupi correctament la seva funció és molt important mantenir la seva concentració plasmàtica en uns nivells adequats. En aquest sentit és fonamental el seu correcte aclariment a través del rLDL, com es comentarà al següent apartat. Per a que la interacció de l'LDL i el seu receptor sigui efectiva és important que l'LDL no tingui la seva estructura alterada.

Les LDL són un grup heterogeni de partícules que varien en mida, composició i estructura. Les partícules d'LDL del plasma estan distribuïdes en un rang de densitat continu de 1,019-1,063 Kg/L i el diàmetre de les partícules varia de 18 a 28 nm. Com s'esquematitza a la Figura 4, les partícules d'LDL contenen un nucli hidrofòbic de lípids no polars compost per colesterol esterificat (unes 1600 molècules/LDL), triglicèrids (170 molècules/LDL) i una petita quantitat de colesterol lliure (180 molècules/LDL) i una monocapa amfipàtica superficial formada per fosfolípids (700 molècules/LDL), la majoria del colesterol lliure (420 molècules/LDL) i una única còpia d'apoB-100 (Esterbauer, Gebicki et al. 1992).

Figura 4. Model molecular esquemàtic d'una partícula d'LDL. Figura adaptada de: (Hevonoja, Pentikainen et al. 2000). SM: esfingomielina, PC: fosfatidilcolina, LysoPC: lisofosfatidilcolina, TG: triglicèrids, CE: colesterol esterificat, UC: colesterol lliure.





Els principals tipus de fosfolípids de l'LDL són la fosfatidilcolina (PC) (70 %) i l'esfingomielina (SM) (25 %) (Lund-Katz and Phillips 1986). A més, les partícules d'LDL contenen antioxidants lipofílics com  $\alpha$ - i  $\delta$ -tocoferol, carotens i ubiquinol-10, i enzims com l'acetilhidrolasa activadora del factor plaquetari (PAF-AH) (Tjoelker, Wilder et al. 1995; Tew, Southan et al. 1996).

Els lípids que formen la monocapa superficial no es troben homogèniament distribuïts; s'ha vist que la PC es troba més a prop de l'apoB-100 que l'SM, mentres que l'SM i el colesterol lliure s'agrupen en àrees anomenades *rafts* lipídics (Simons and Ikonen 1997; Ramstedt and Slotte 1999). Les àrees riques en components determinats poden tenir papers fisiològics importants, com participar en l'activació i el funcionament de diverses proteïnes de membrana i receptors cel·lulars (Liu, Ying et al. 1996; Janes, Ley et al. 1999).

La proteïna majoritària de LDL, l'apoB-100, és una de les proteïnes monomèriques més grans. Està formada per 4536 residus aminoacídics i té un pes molecular de 513 KDa que al glicosilar-se acaba sent d'aproximadament 550 KDa. Està situada a la superfície de l'LDL en una conformació *ribbon and bow* (cinta i llaç) i té una estructura pentapartida constituïda per dominis amfipàtics hèlix  $\alpha$  i fulla  $\beta$  (Segrest, Jones et al. 1994; Chatterton, Phillips et al. 1995). L'apoB-100 deslipiditzada s'ha vist que conté 8 llocs potencials d'unió a heparina i 2 segments d'unió a PG que es troben en els residus 3147-3157, lloc A, i 3359-3367, lloc B (Olsson, Camejo et al. 1997). A més, el lloc B, el lloc d'unió a PG més potent, s'ha vist que està molt a prop del domini d'unió al rLDL (Boren, Lee et al. 1998).

## **5. IMPLICACIÓ DE L'LDL EN L'ATEROSCLEROSI**

### **5.1. PARADOXA DEL COLESTEROL**

Com s'ha esmentat en l'origen de la lesió ateromatosa els lípids estan implicats en el procés ateroscleròtic. De fet, ja a partir dels anys 70 es començà a establir la relació entre els nivells plasmàtics elevats de triglicèrids i colesterol, i el risc a patir malaltia cardiovascular, com ho demostren estudis epidemiològics que associen les disfuncions lipídiques amb el risc cardiovascular (Dawber 1980; Stokes 1988).

Un dels components predominants de les acumulacions lipídiques de la lesió ateroscleròtica és el colesterol. Aquest és principalment transportat per la lipoproteïna LDL, que transporta el 70% del colesterol plasmàtic. Per tant, l'LDL, com a transportadora principal del colesterol, està fortament implicada en el procés ateroscleròtic i és considerada la lipoproteïna que pot ser més aterogènica. S'observa clarament el paper aterogènic de l'LDL en la patologia de la hipercolesterolèmia familiar (HF) monogènica. Els individus afectats presenten nivells plasmàtics d'LDL molt elevats i desenvolupen importants lesions ateroscleròtiques primerenques. En aquesta patologia genètica el rLDL no és funcional, en conseqüència, hi ha una menor captació cel·lular d'LDL, fet que comporta una acumulació plasmàtica d'aquesta lipoproteïna, aterosclerosi prematura i un alt risc cardiovascular, especialment en individus homozigots (Goldstein and Brown 1983).

Com s'ha comentat, la captació cel·lular d'LDL la porta a terme, principalment, el rLDL, que regula els nivells plasmàtics d'LDL, i també de VLDL i d'IDL (Kita, Brown et al. 1982). Aquestes lipoproteïnes proporcionen colesterol a les cèl·lules que el necessiten per la obtenció d'energia i la síntesi de membranes, hormones esteroidees o sals biliars. L'expressió del receptor està estretament regulada en funció del colesterol intracel·lular (Brown and Goldstein 1999). Quan la cèl·lula té molt colesterol intracel·lular llavors disminueix l'expressió de receptors d'LDL, autoregulant-se segons les necessitats. Aquesta regulació és a nivell transcripcional i és mitjançada per les proteïnes d'unió als elements reguladors de l'esterol (SREBP).

En un inici, quan només es coneixia la captació d'LDL pel rLDL i es coneixia també la seva regulació, no s'entenia què passava amb les cèl·lules espumoses en que s'observava una acumulació de lípids sense control. Això és el que passa a les lesions ateroscleròtiques, on SMC o macròfags, capten i acumulen colesterol, transformant-se en cèl·lules espumoses (Aqel, Ball et al. 1985; Ross, Raines et al. 1986). Aquesta aparent contradicció va ser anomenada *la paradoxa del colesterol*. No obstant, més tard ja es va veure que existia una

via alternativa de captació de les LDL modificades: la via dels receptors escombriaires o receptors *scavenger* (SR). Aquests receptors reconeixen una gran varietat de lligands, entre ells LDL modificades que presenten càrrega negativa incrementada, i no estan autoregulats (Goldstein, Ho et al. 1979). Al no regular-se, les cèl·lules poden captar colesterol de forma massiva i acumular-lo intracel·lularment, convertint-se en cèl·lules espumoses que participen en la progressió de la lesió ateroscleròtica.

L'LDL nativa, en principi, no presenta característiques aterogèniques, però, en canvi, quan es modifica pot quedar més fàcilment retinguda a la matriu extracel·lular de la paret vascular, pot tenir propietats inflamatòries o pot ser captada pels SR, adquirint així un comportament aterogènic (Steinberg, Parthasarathy et al. 1989). La teoria més acceptada durant anys ha estat que l'LDL nativa es modifica un cop ha entrat a la paret arterial. Tanmateix, també s'han trobat en la circulació sanguínia LDL modificades, que serien subpoblacions minoritàries que es diferencien clarament de l'LDL nativa, com poden ser l'LDL electronegativa (LDL(-)), l'LDL glicada o l'LDL oxidada. Les LDL es poden modificar *in vivo* per diferents mecanismes originant una gran varietat de partícules diferents. A continuació s'exposen alguns tipus d'LDL modificades que estan implicades en la formació de les lesions ateroscleròtiques.

## **5.2. MECANISMES DE MODIFICACIÓ D'LDL**

### **5.2.1. OXIDACIÓ**

L'LDL nativa es pot oxidar per l'acció de radicals lliures causats pel metabolisme cel·lular, com poden ser l'anió superòxid o grups tiol de compostos sulfurats, com cisteïna, homocisteïna o glutatió. Aquests compostos poden ser generats a la paret arterial per cèl·lules endotelials, SMC o macròfags (Heinecke, Rosen et al. 1987; Steinbrecher 1988; Cathcart, McNally et al. 1989; Sparrow and Olszewski 1993). D'altra banda, també alguns enzims expressats a la paret arterial poden ser responsables de l'oxidació de l'LDL, com la mieloperoxidasa o varies lipooxigenases (van den Berg, Winterbourn et al. 1993; Sigal, Laughton et al. 1994).

L'oxidació de l'LDL és una reacció en cadena que pot causar la modificació en diferents graus dels diversos compostos que la formen, podent-se originar LDL amb diferents nivells d'oxidació, com l'LDLox o l'anomenada LDL mínimament modificada (LDLmm). L'oxidació dels lípids, o lipoperoxidació, s'inicia per la modificació dels àcids grassos poliinsaturats (sobretot araquidònic i linoleic) formant-se lipoperòxids. Els lipoperòxids són molècules molt inestables que es poden transformar en hidròxids o trencar-se originant cetones i

aldehids. Els hidròxids provinents de l'àcid araquidònic són els anomenats HODE (hidroxiocadecadienoic) i els provinents de l'àcid linoleic els HETE (hidroxieicosatetraenoic). Si hi ha fragmentació de la cadena alifàtica s'obté el MDA (malondialdehid), de l'àcid araquidònic, o el 4-HNE (4-hidroxinonenal), de l'àcid linoleic. Quan l'àcid gras fragmentat forma part d'un fosfolípid oxidat, com de la 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfolina oxidada (oxPAPC), la resta del fosfolípid oxidat se l'anomena fosfolípid semblant al PAF (factor activador plaquetari). Els fosfolípids semblants al PAF més estudiats són el POVPC, el PGPC i el PEIPC, no obstant, aquest últim té activitat tipus PAF sense estar fragmentat perquè presenta una ciclació degut a l'oxidació.

A més, els lipoperòxids poden oxidar el colesterol originant oxisterols, com hidroperoxicolesterol o el cetocolesterol (Brown and Jessup 1999). Quan l'oxidació és avançada, també pot afectar l'apoB-100, fragmentant-la, i pot acabar amb la seva degradació (Esterbauer, Jurgens et al. 1987; Fong, Parthasarathy et al. 1987). Tots aquests compostos oxidats incrementen la càrrega elèctrica negativa de l'LDL.

Es creu que l'LDL s'oxida principalment a la paret vascular, on les cèl·lules vasculares produeixen una gran quantitat de radicals lliures i hi ha enzims oxidants (Haberland and Steinbrecher 1992). Tanmateix, algunes evidències indiquen que l'LDL podria presentar un cert grau d'oxidació ja en la circulació sanguínia (Holvoet, Perez et al. 1995).

### **5.2.2. ENRIQUIMENT AMB ÀCIDS GRASSOS NO ESTERIFICATS**

Les partícules d'LDL enriquides amb àcids grassos no esterificats (NEFA) presenten canvis en la conformació de la partícula i una major càrrega negativa aportada pel grup carboxílic dels NEFA.

Les LDL es poden enriquir en NEFA quan la concentració plasmàtica de NEFA es troba augmentada i/o quan els nivells d'albumina es troben disminuïts, ja que l'albumina és la principal responsable del transport de NEFA en la circulació. Els nivells de NEFA estan incrementats en situacions metabòliques alterades, com en l'obesitat o en la situació d'insulinorresistència, freqüent en la diabetis (Charles, Eschwege et al. 1997) o en situacions d'estrès, com en l'exercici aeròbic intens (Jones, Heigenhauser et al. 1980). Per altra banda, els nivells d'albumina es troben disminuïts, per tant, hi ha hipoalbuminèmia, en diverses patologies com la síndrome nefròtica (Braschi, Masson et al. 1997).

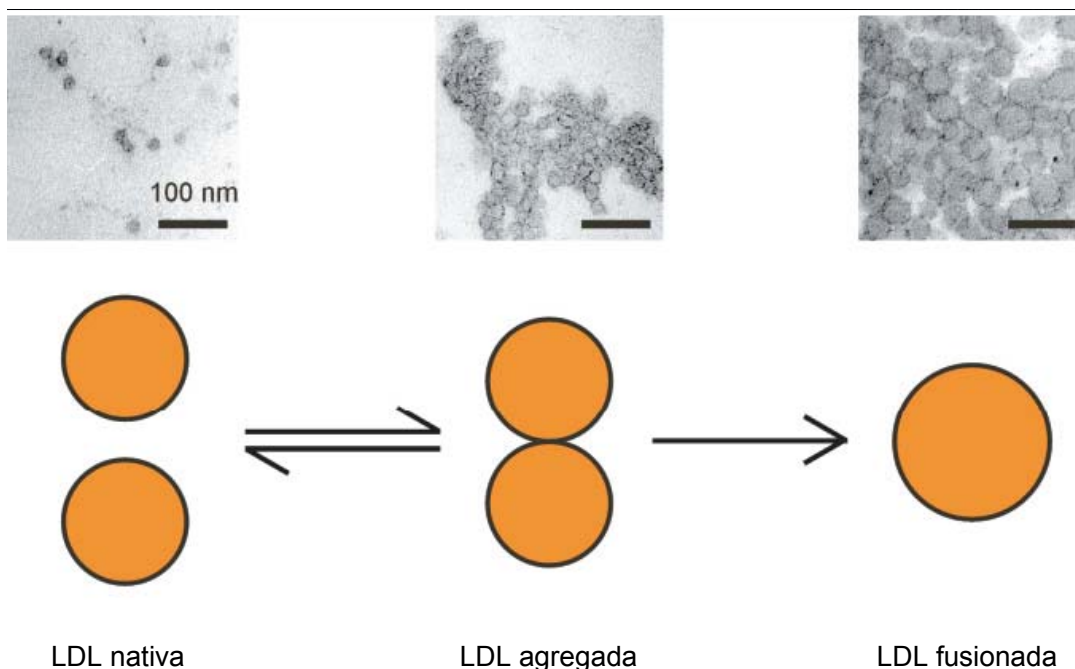
A més, també es poden originar LDL enriquides en NEFA mitjançant la hidròlisi de triglicèrids, colesterol esterificat o fosfolípids de l'LDL per l'acció de diversos enzims. Els possibles candidats d'aquesta acció són l'LPL, HL, colesterol esterasa, fosfolipasa A<sub>2</sub>

(PLA<sub>2</sub>), esfingomielinasa (SMasa), o PAF-AH. Algunes d'aquestes activitats enzimàtiques estan associades a situacions d'aterosclerosi subjacent i inflamació sistèmica (Nevalainen 1993; Hasham and Pillarisetti 2006).

### 5.2.3. AGREGACIÓ I/O FUSIÓ

L'LDL nativa pot patir vàries modificacions de la seva composició que afectin l'estructura superficial de la partícula, perdent-se, d'aquesta manera, la seva estabilitat. Aquesta inestabilitat afectarà les interaccions entre diferents partícules i pot conduir a l'agregació i/o fusió entre partícules. Sembla que la modificació extensiva d'un sol tipus de component de la superfície de l'LDL (fosfolípids, colesterol lliure o apoB-100) és suficient per provocar la seva agregació i/o fusió. En el cas de l'agregació d'LDL, s'estableix el contacte entre la superfície de diferents partícules, però no es dona una unió forta i, per tant, no canvia la mida de les partícules individuals. Si la modificació de la partícula és suficientment extensa, hi haurà estabilitzacions energètiques que acabaran amb la fusió de les partícules. Així doncs, l'agregació de partícules és, en principi, una reacció reversible, en canvi, la fusió de partícules és un fenomen irreversible (Oorni, Pentikainen et al. 2000) (Figura 5).

Figura 5. Agregació i fusió de partícules d'LDL. Figura adaptada de: (Oorni, Pentikainen et al. 2000).



En principi, l'LDL s'agrega a la paret arterial i aquest fenomen és afavorit per la retenció de les lipoproteïnes mitjançant els PG de la matriu extracel·lular (Oorni, Pentikainen et al.

2000). No obstant, també s'ha suggerit que es pot formar LDL agregada en la circulació plasmàtica en zones de flux turbulent (Steinberg, Parthasarathy et al. 1989).

Respecte a les modificacions en la composició de l'LDL que serien necessàries per originar l'agregació de les partícules, aquestes poden ser degudes tant a agents oxidants, com a l'acció de proteases o de lipases. L'oxidació altera tant la composició lipídica com proteica de la partícula. A l'apartat I-5.2.1, pàg 45, ja s'han descrit diferents mecanismes d'oxidació de l'LDL. Pel que fa a la degradació proteolítica de l'apoB-100, aquesta pot ser catalitzada per una gran varietat de proteases, entre elles la quimotripsina, tripsina, trombina, calicreïna, metal·loproteïnases, proteases lisosomals, etc (Galis, Sukhova et al. 1994; Kaartinen, Penttila et al. 1994; Smith, Crosbie et al. 1996; Sukhova, Shi et al. 1998; Cerf, Raidoo et al. 1999). Per últim, la lipòlisi de diferents components de l'LDL pot ser deguda a l'acció de la PLA<sub>2</sub>, fosfolipasa C (PLC), SMasa, lipasa éster carboxílic o lipasa àcida lisosomal (Davis, Glagov et al. 1985; Suits, Chait et al. 1989; Menschikowski, Kasper et al. 1995; Shamir, Johnson et al. 1996; Marathe, Kuriakose et al. 1999). A continuació s'aprofundeix en les modificacions lipolítiques degudes a la PLA<sub>2</sub>, PLC i SMasa.

#### **5.2.3.1. Modificació d'LDL per la fosfolipasa A<sub>2</sub>**

Les fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) són un grup d'enzims que catalitzen la hidròlisi d'esters d'àcids grassos units a la posició sn-2 dels glicerofosfolípids, produint un NEFA i un lisofosfolípid (Aggerbeck, Kezdy et al. 1976). Com que el glicerofosfolípid majoritari de l'LDL és la PC, al actuar sobre ella el lisofosfolípid que es forma és la lisofosfatidilcolina (LPC). Totes les PLA<sub>2</sub> tenen una estructura tridimensional conservada i es coneixen tant formes enzimàtiques cel·lulars com secretades. Les PLA<sub>2</sub> secretades (sPLA<sub>2</sub>), les quals són produïdes principalment per SMC i macròfags, s'han relacionat amb l'aterosclerosi ja que el seu alliberament es troba molt augmentat en situacions d'inflamació (Nevalainen 1993). S'han descrit 10 tipus de isoformes de sPLA<sub>2</sub>: IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X i XII (Gelb, Valentin et al. 2000).

S'ha descrit que la lipòlisi de l'LDL *in vitro* per la sPLA<sub>2</sub> redueix la mida de les partícules d'LDL (Aggerbeck, Kezdy et al. 1976; Kleinman, Krul et al. 1988; Wooton-Kee, Boyanovsky et al. 2004) i canvia l'empaquetament molecular dels lípids de superfície i de l'apoB-100 (Kleinman, Krul et al. 1988) produint partícules més rígides i més agregables. No obstant, la lipòlisi de l'LDL per la PLA<sub>2</sub> no produeix fusió (Oorni, Hakala et al. 1998). La incubació d'LDL amb la PLA<sub>2</sub> és un mecanisme molt utilitzat per formar *in vitro* LDL enriquides en NEFA. D'altra banda, sembla que la sPLA<sub>2</sub> també actua *in vivo*, ja que les LDL extretes del teixit vascular contenen menys PC (Daugherty, Zweifel et al. 1988; Tailleux, Torpier et al.

1993) que les LDL plasmàtiques, i una proporció augmentada de LPC (Yla-Herttuala, Palinski et al. 1989). A més, s'ha vist que la concentració plasmàtica de sPLA<sub>2</sub> tipus IIA és un potent factor de risc cardiovascular independent (Kugiyama, Ota et al. 2000).

### 5.2.3.2. Modificació d'LDL per la fosfolipasa C i l'esfingomielinasa

Unes altres lipases que degraden fosfolípids i s'ha vist que indueixen agregació i fusió d'LDL són la PLC i l'SMasa que hidrolitzen l'enllaç de l'àcid fosfòric dels fosfolípids.

La PLC és un enzim que hidrolitza els glicerofosfolípids, com la PC, produint diacilglicerol i fosforilcolina. La fosforilcolina que és hidrofílica s'allibera de la partícula d'LDL, mentre que el diacilglicerol hi roman (Polacek, Byrne et al. 1988). S'ha descrit que la PLC *in vitro* fa augmentar la terbolesa de les suspensions d'LDL (Suits, Chait et al. 1989) i que indueix agregació i fusió de les partícules d'LDL (Pollard, Scanu et al. 1969; Liu, Scraba et al. 1993). No obstant això, les LDL aïllades de l'íntima ateroscleròtica no contenen quantitats detectables de diacilglicerol ni s'ha trobat PLC extracel·lular a l'íntima arterial, per tant, no està clara la seva implicació en l'aterosclerosi.

Per altra banda, l'SMasa catalitza el mateix tipus de reacció que la PLC, però actua sobre un esfingolípide enlloc de sobre un glicerofosfolípide. Així doncs, l'SMasa hidrolitza SM, el segon fosfolípide majoritari de la superfície de l'LDL, produint una molècula de fosforilcolina hidrosoluble, que és alliberada, i una molècula de ceramida, que és retinguda a la partícula. Es coneixen diferents tipus d'SMasa, les seves principals característiques es descriuen a la Taula 2.

L'SMasa que estaria principalment relacionada amb l'agregació d'LDL és l'SMasa secretora (sSMasa). La sSMasa és secretada per cèl·lules residents a l'íntima arterial, com els macròfags (Schissel, Schuchman et al. 1996) i les cèl·lules endotelials (Marathe, Schissel et al. 1998). S'ha descrit que la sSMasa indueix *in vitro* tant agregació com fusió de les partícules d'LDL lipolitzades (Xu and Tabas 1991; Paananen and Kovanen 1994; Oorni, Hakala et al. 1998), degut a l'augment en el contingut de ceramida (Schissel, Tweedie-Hardman et al. 1996). La ceramida indueix la formació de microdominis enriquits en ceramida i, contràriament a l'SM, afavoreix la desorganització de la membrana (Huang, Goldberg et al. 1996). Els dominis apolars rics en ceramida permeten l'inici de l'agregació de les partícules a través d'associacions hidrofòbiques. Schissel et al. han trobat en les lesions arterioscleròtiques gotes d'LDL agregades que estan enriquides en ceramida (Schissel, Tweedie-Hardman et al. 1996), suggerint que les partícules d'LDL agregades podrien haver estat produïdes per una activitat tipus sSMasa.

Taula 2. Classificació i característiques dels diferents tipus d'Smasa (Goni and Alonso 2002).

	Localització	pH optim	Necessitats i activació	Observacions	Patologies relacionades	Ref
<b>SMasa àcida</b>	Lisosoma	pH 5		Relacionada amb Fas i apoptosi	Síndrome Niemann-Pick	1
<b>SMasa secretora</b>	És secretada		- Zn <sup>2+</sup> dependent (amb excepcions)	Precursor comú amb SMasa àcida	Aterosclerosi (LDL agregada per sSMasa)	2
<b>SMasa neutra dependent de Mg<sup>2+</sup></b>	- Membrana plasmàtica (mamífers) - Secretada (bacteris)	- pH 7 (mamífers) - ampli rang de pH (bacteris)	- Mg <sup>2+</sup> o Mn <sup>2+</sup> dependent - Activat per LDLox i TNF- $\alpha$	- apoB-100 té activitat nSMase - Relació evolutiva nSMasa de bacteris i DNasa I de mamífers	Aterosclerosi (apoptosi)	3
<b>SMasa neutra independent de Mg<sup>2+</sup></b>	Citosol	pH 7	Mg <sup>2+</sup> independent			4
<b>SMasa alcalina del tracte intestinal</b>	Només expressat a intestí	pH alcali	- Mg <sup>2+</sup> independent - Activat per sals biliars		Càncer de colon	5
<b>SMasa-PLC bacteriana</b>				Substrats: glicero-fosfolípids (SM, PC..)	Són toxines bacterianes	6

sSMasa: SMasa secretora, nSMasa: SMasa neutra. Referències: 1: (Barnholz, Roitman et al. 1966; Samet and Barenholz 1999), 2: (Xu and Tabas 1991; Schissel, Keesler et al. 1998; Tabas 1999), 3: (Matsuo, Yamada et al. 1996; Chatterjee 1999; Kinnunen and Holopainen 2002), 4: (Ghosh, Sabbadini et al. 1998; Birbes, El Bawab et al. 2001), 5: (Nilsson and Duan 1999; Cheng, Nilsson et al. 2002) i 6: (Titball 1993).

Per altra banda, s'ha suggerit que l'apoB-100 de l'LDL té una activitat SMasa neutra intrínseca (Holopainen, Medina et al. 2000; Kinnunen and Holopainen 2002). Els autors van trobar que l'LDL per si sola posseïa activitat SMasa i per analogia de seqüències amb enzims bacterians van suggerir que l'activitat podia ser pròpia de l'apoB-100.

Les SMasas, a part de la seva implicació en l'aterosclerosi al estar involucrades en l'agregació i fusió de l'LDL, també estan relacionades en la senyalització cel·lular de l'apoptosi, mitjançant la via de transducció de senyals de l'SM (Gomez-Munoz 1998; Kronke 1999; Kolesnick, Goni et al. 2000; Hannun, Luberto et al. 2001). Concretament, la ceramida sembla ser un segon missatger lipídic en la mort cel·lular programada i en la diferenciació i proliferació cel·lular (Ohanian and Ohanian 2001; Ruvolo 2003).

#### 5.2.4. ALTRES TIPUS DE MODIFICACIONS D'LDL

**Glicació.** L'LDL pot ser glicada de manera no enzimàtica. En pacients diabètics, degut als elevats nivells de glucosa en sang, es dona aquest procés. La glucosa s'uneix als residus de lisina de l'apoB-100 formant una base de Schiff i, com a conseqüència, la càrrega



positiva de les lisines queda emmascarada i disminuïda. En menor proporció, la glucosa també es pot unir als fosfolípids. En alguns casos es parla de glucooxidació de la lipoproteïna quan es dóna la combinació d'oxidació i glicació, processos íntimament relacionats i que es poden potenciar mútuament (Lyons and Jenkins 1997).

**Modificació multi-enzimàtica.** Hi ha investigadors que han utilitzat *in vitro* una LDL modificada enzimàticament (E-LDL) que seria una LDL hidrolitzada per diferents activitats enzimàtiques simultàniament. Normalment, es porta a terme la incubació de l'LDL amb tripsina i colesterol esterasa (Suriyaphol, Fenske et al. 2002), i a vegades també amb neuroaminidasa (Klouche, Gottschling et al. 1998). S'ha descrit que la degradació enzimàtica de l'LDL genera una partícula potencialment aterogènica amb unes característiques semblants a les de les gotes lipídiques observades i aïllades de les lesions ateroscleròtiques (Bhakdi, Dorweiler et al. 1995). L'E-LDL activa el complement, és reconeguda pels SR i és un potent inductor de la formació de cèl·lules espumoses (Klouche, Gottschling et al. 1998). Semblaria que les E-LDL participarien en l'inici de l'aterosclerosi, en canvi, les LDLox estarien involucrades en etapes més avançades de progressió de la malaltia (Torzewski and Lackner 2006).

**Acetilació.** L'acetilació de l'LDL actua directament sobre els residus de lisina de l'apoB-100, fent-los perdre la càrrega positiva. Aquesta modificació no es dóna fisiològicament, però ha sigut molt important en l'estudi dels SR, que capten eficientment l'LDL acetilada (LDLac) degut a l'augment de càrrega negativa de la partícula (Goldstein, Ho et al. 1979). Per aquest mateix fet, aquestes LDL tenen una baixa afinitat pel rLDL.

### **5.3. PROPIETATS ATEROGÈNIQUES DE LES LDL MODIFICADES**

#### **5.3.1. RETENCIÓ SUBENDOTELIAL D'LDL**

L'aterosclerosi es caracteritza per l'acumulació de lipoproteïnes aterogèniques riques en colesterol en la matriu extracel·lular de l'íntima arterial. Les lipoproteïnes es poden acumular a la paret arterial perquè poden creuar l'endoteli intacte per transcitosis no regulada si són menors de 70 nm (Simionescu and Simionescu 1993; Nordestgaard, Wootton et al. 1995). Per tant, les LDL i IDL poden infiltrar-se a la paret arterial sense necessitat de dany previ de l'endoteli, tot i que en cas de disfunció endotelial aquest procés s'incrementa.

La retenció subendotelial de les lipoproteïnes es dóna quan aquestes interaccionen amb els components de la matriu extracel·lular, principalment amb els PG. La unió de l'LDL als

PG és mitjançant interaccions iòniques de les càrregues positives dels residus de lisina i arginina de l'apoB-100 i els grups carregats negativament dels carboxils i sulfats de les cadenes de GAG dels PG (Iverius 1972; Camejo 1982). Boren et al. (Boren, Olin et al. 1998) van definir el lloc concret d'unió de l'apoB-100 de l'LDL nativa als PG, que és la seqüència compresa entre els residus 3359-3369 i se l'anomena lloc B d'unió a PG. Diversos treballs ho corroboren, com l'observació que els residus d'arginina i lisina positivament carregats del lloc B són crítics per la unió de l'LDL als PG-CS i PG-DS, i que ratolins modificats genèticament amb un defecte en el lloc B presenten una reducció de les lesions arterioscleròtiques primerenques (Skalen, Gustafsson et al. 2002). No obstant, l'afinitat de les lipoproteïnes natives pels PG no és molt elevada i s'ha vist que pot variar substancialment quan les lipoproteïnes pateixen certes modificacions.

La conformació de l'apoB-100 en la superfície d'una partícula d'LDL depèn de molts factors com de la composició del nucli lipídic, del contingut en fosfolípids de la superfície, del diàmetre de la partícula o de la possible agregació i/o fusió que la partícula pot presentar. Per tant, diferents alteracions en l'LDL poden induir canvis en l'exposició dels llocs d'unió a PG de l'apoB-100, augmentant-ne o disminuint-ne l'afinitat. Un exemple de modificació d'LDL i augment de la seva afinitat pels PG és el cas ben conegut de l'LDL tractada amb sPLA<sub>2</sub>. Aquestes LDL lipolitzades presenten una elevada afinitat pels PG ja que els canvis en la composició de fosfolípids alteren la monocapa superficial de la partícula fent variar la conformació de l'apoB-100 i exposant-li nous residus que quedaven amagats. Aquests residus de l'apoB-100 exposats per l'acció de la PLA<sub>2</sub> sobre les LDL s'anomenen lloc A i comprenen els residus 3148-3158 (Flood, Gustafsson et al. 2004). Sembla que el lloc A d'unió a PG actuaria en cooperació amb el lloc B augmentant la força de la unió d'aquestes LDL als PG. Un altre exemple d'augment de la força d'unió pels PG, però en el que no hi participaria el lloc A, és el de l'enriquiment de partícules d'LDL amb colesterol, que seria degut a canvis conformationals del propi lloc B (Flood, Gustafsson et al. 2004).

No s'ha descrit, concretament, quin mecanisme seria responsable de la major afinitat pels PG de les LDL modificades amb SMasa, però sembla que els canvis en la conformació de l'apoB-100 estarien lligats a l'elevada agregació i fusió de les partícules. S'ha descrit que l'agregació de les partícules lipolitzades augmenta la seva força d'unió pels PG i que la fusió l'augmenta encara més (Oorni, Hakala et al. 1998). L'anàlisi de la quantitat de lisines actives, residus de lisina que estan involucrats en la unió de les LDL als PG, va revelar que la fusió de les LDL incrementava, tant la quantitat de les lisines actives per partícula modificada, com la força d'unió de les partícules als PG (Paananen, Saarinen et al. 1995;

Oorni, Hakala et al. 1998). Aquest augment de l'afinitat s'explicaria, principalment, per la presència de varies molècules d'apoB-100 en les LDL agregades i, en les LDL fusionades, per la reorganització de l'apoB-100 que porta a l'exposició de noves àrees bàsiques en la superfície de la partícula engrandida.

A part de la lipòlisi d'LDL, l'alteració directe de la conformació de l'apoB-100 mitjançant proteòlisis, lògicament, farà variar la seva afinitat pels PG. S'ha observat que la hidròlisi d'LDL mitjançant enzims proteolítics, com proteases de granuls de mastòcits (Paananen and Kovanen 1994)  $\alpha$ -quimiotripsina (Paananen, Saarinen et al. 1995), i catepsina F (Oorni, Sneek et al. 2004) incrementen la força d'unió de les partícules d'LDL als PG alhora que augmenten la fusió de les partícules.

Així doncs, la principal responsable de la unió de l'LDL als PG és l'apoB-100, no obstant, es coneix que varies proteïnes poden influenciar en aquesta interacció i incrementar la retenció de lipoproteïnes a la paret arterial. S'han descrit les anomenades molècules pont que fan de mitjanceres de la unió, interaccionant amb els PG. Entre elles hi trobem: l'apoE, la proteïna sèrum amiloide A, les  $\alpha$ -defensines o l'apo(a) (O'Brien, Olin et al. 1998; Higazi, Nassar et al. 2000; Rosenfeld, Polinsky et al. 2000; Lewis, Kirk et al. 2004). També s'ha vist que diverses lipases involucrades en el metabolisme de lípids són potents molècules pont, com l'LPL, l'HL, la lipasa endotelial o la proteïna transferidora de fosfolípids (Merkel, Kako et al. 1998; Santamarina-Fojo, Haudenschild et al. 1998; Azumi, Hirata et al. 2003; O'Brien, Vuletic et al. 2003). D'altra banda, hi ha molècules que es coneix que fan augmentar l'afinitat de les lipoproteïnes pels PG sense interaccionar amb els PG, però es desconeixen els mecanismes de la seva acció. Dos exemples són l'apoAI i l'apoCIII (Ramsamy, Neville et al. 2000; Olin-Lewis, Krauss et al. 2002). Per exemple, s'ha vist que el contingut en apoCIII de les lipoproteïnes correlaciona positivament amb la seva afinitat pel biglicà, fet que expliquen per canvis conformacionals que pot provocar l'apoCIII en l'apoB-100 o en l'apoE (Olin-Lewis, Krauss et al. 2002).

Contràriament, hi ha modificacions d'LDL que fan disminuir l'afinitat de les partícules pels PG, com seria el cas de l'LDLox, que acaba perdent totalment l'afinitat pels PG (Oorni, Pentikainen et al. 1997). L'oxidació porta a un augment en la càrrega negativa de les partícules i, concretament, els productes de la descomposició dels lípids de l'LDL reaccionarien amb els residus de lisina, neutralitzant les seves càrregues positives, responsables de la unió de l'apoB-100 als PG (Steinbrecher 1987; Steinbrecher, Witztum et al. 1987; Steinbrecher, Lougheed et al. 1989; Zhang, Yang et al. 1993). En general, l'increment de la càrrega negativa de la partícula fa disminuir la força d'unió de les lipoproteïnes als PG, ja que es dona una repulsió de càrregues entre les lipoproteïnes i els

PG carregats negativament. Un altre exemple seria la sialització de lipoproteïnes, en el que l'augment de càrrega negativa degut a l'àcid siàlic fa disminuir la seva afinitat pels PG (Edwards, Wagner et al. 1999). En contra, s'ha observat que les LDL glicades estarien involucrades en la major interacció de les LDL de diabètics i els PG (Edwards, Wagner et al. 1999).

### **5.3.2. ACUMULACIÓ INTRACEL·LULAR D'LDL**

#### **5.3.2.1. Receptor d'LDL**

El rLDL pertany a una família de receptors transmembrana glicosilats que requereixen calci per unir els diferents lligands amb què interaccionen. Els lligands no comparteixen homologia a la seqüència, però sí que presenten dominis carregats positivament, rics en lisina i arginina, que semblen ser els responsables de la unió a la càrrega negativa, deguda a les cisteïnes, dels receptors d'aquesta família. Els membres més coneguts de la família del rLDL són: rLDL, LRP1 (proteïna relacionada amb el rLDL 1), megalina/LRP2, receptor de VLDL i receptor d'apoE 2 (Hussain 2001).

El rLDL regula els nivells plasmàtics d'LDL, VLDL i IDL (Kita, Brown et al. 1982), per tant, capta i metabolitza lipoproteïnes que contenen apoB-100 i apoE. Es tracta d'una glicoproteïna de 839 aminoàcids amb 5 dominis ben conservats (Goldstein, Brown et al. 1985). El domini d'unió al lligand es troba a l'extrem N-terminal i és ric en cisteïnes, que degut a la seva càrrega negativa serien les responsables de la unió a les lisines, carregades positivament, de l'apoB-100 i l'apoE (Brown and Goldstein 1986; Hobbs, Brown et al. 1986). Al produir-se la unió amb el lligand es dona la internalització d'ambdós per endocitosi. En els endosomes hi té lloc la dissociació del lligand i el receptor pot tornar a la membrana plasmàtica sent reciclat. Els endosomes es fusionen amb els lisosomes, que contenen hidrolases lisosomals i metabolitzen el lligand internalitzat. A partir de la metabolització de lipoproteïnes s'allibera el colesterol, el qual anirà a formar part de les membranes o serà utilitzat en la síntesi d'hormones esteroidees i prostaglandines. El colesterol intracel·lular està implicat en la regulació del propi rLDL per retroalimentació negativa, mitjançant el factor de transcripció SREBP (Brown and Goldstein 1999).

El rLDL està altament expressat al fetge, però també s'expressa a altres teixits com a la paret vascular. En concret, a la paret vascular és expressat en les cèl·lules endotelials, SMC, monòcits i macròfags (Hiltunen and Yla-Herttuala 1998). La mutació d'aquest receptor causa la HF monogènica, en la qual els afectats tenen problemes en l'aclariment

de l'LDL i en conseqüència presenten concentracions elevades de colesterol al plasma (Goldstein and Brown 1983).

### 5.3.2.2. LRP1

Quan les LDL estan modificades no són reconegudes pel rLDL, sinó per altres receptors cel·lulars. És el cas de les LDL agregades que són internalitzades principalment per l'LRP1 (Llorente-Cortes, Martinez-Gonzalez et al. 2000).

L'LRP1 és un receptor transmembrana de la família del rLDL (Herz, Hamann et al. 1988). És expressat a molts teixits, com al fetge, cor, vasos sanguinis o cervell. Reconeix una gran varietat de lligands diferents, entre ells LDL agregades i quilomicrons i VLDL enriquits en apoE. A part de en la captació de lligands, també està implicat en la regulació de vies de senyalització de proliferació i migració cel·lular (Llorente-Cortes and Badimon 2005). Pel que fa a la captació de LDL agregades en la paret arterial, s'ha descrit que l'LRP1 és regulat per retroalimentació positiva (Llorente-Cortes, Costales et al. 2006), regulació contrària a la del rLDL pel colesterol. Així, nivells elevats d'LDL agregada augmenten l'expressió del LRP1, contribuint a una major captació de lípid, a l'acumulació intracel·lular d'aquest i a la formació de cèl·lules espumoses.

### 5.3.2.3. Receptors *scavenger*

Altres modificacions d'LDL, com l'oxidació, provoquen l'emascament de la càrrega positiva de l'apoB-100, motiu pel qual les LDL perden afinitat pel rLDL. Tanmateix, les LDL modificades són captades pels receptors *scavenger* (SR) o escombriaires que són un conjunt de receptors cel·lulars capaços de reconèixer un ampli rang de lligands que presenten la característica comuna de ser electronegatius. Són expressats principalment pels macròfags (Brown and Goldstein 1983), però també per altres tipus cel·lulars com les SMC, les cèl·lules endotelials o els fibroblasts (Pitas 1990). Els SR són els principals receptors involucrats en la formació de les cèl·lules espumoses degut a la captació massiva d'LDL modificada.

La família dels SR és molt àmplia i comprèn receptors amb estructures molt diferents. Els seus membres més coneguts i involucrats en l'aterosclerosi són: SRAI, SRAII, SRBI, CD36 i LOX (receptor d'LDLox tipus lectina). Els SRA són els SR clàssics descrits per Goldstein i Brown els anys 80 (Goldstein, Ho et al. 1979; Brown and Goldstein 1983). SRAI i II serien els principals receptors de macròfags per l'LDLox i alhora agregada (Asmis, Begley et al. 2005), en canvi, l'LDLox però no agregada seria captades per altres SR, com el CD36. El

CD36 és un SR tipus B que s'ha vist que participa en la captació i degradació d'LDL moderadament oxidada (Endemann, Stanton et al. 1993). El SRBI a part d'unir LDL modificada també capta lipoproteïnes natives amb elevada afinitat: LDL, HDL i VLDL (Acton, Rigotti et al. 1996; Calvo, Gomez-Coronado et al. 1998). A més, pot dur a terme l'intercanvi bidireccional de lípids, participant doncs, en la sortida de colesterol de la cèl·lula cap a les lipoproteïnes, que es comentarà a continuació. Pel que fa al LOX, cada cop hi ha més evidències de que seria el principal receptor d'LDLox en les cèl·lules endotelials (Chen and Du 2007).

#### **5.3.2.4. Acumulació intracel·lular de colesterol**

Normalment, la captació d'LDL mitjançada pel rLDL acaba amb la hidròlisi completa dels seus components lipídics i proteics per les hidrolases àcides lisosomals, com la catepsina D o la lipasa àcida lisosomal. El colesterol alliberat en els lisosomes passa a formar part del conjunt de colesterol citoplasmàtic metabòlicament actiu (Brown and Goldstein 1986) que serà transportat cap a la membrana plasmàtica o cap al reticle endoplasmàtic (Underwood, Jacobs et al. 1998).

Però, en el moment que hi ha un excedent de colesterol la cèl·lula l'intenta compensar acumulant-lo en forma de gotes lipídiques citoplasmàtiques formades per colesterol esterificat. L'acil-CoA-colesterol acil-transferasa (ACAT) és l'enzim responsable de la re-esterificació del colesterol i, per altra banda, la hidrolasa neutra de colesterol esterificat és l'encarregada de hidrolitzar-lo quan és convenient, creant un cicle d'hidròlisi i re-esterificació de colesterol.

En alguns casos, les lipoproteïnes internalitzades no són degradades del tot en els lisosomes i, llavors, el colesterol s'acumula en aquests orgànuls. Això s'ha observat per l'LDLox, i seria conseqüència de la resistència a la degradació de l'apoB-100 de l'LDLox per algunes catepsines (Carr 2001). L'acumulació lisosomal de colesterol, i més si conté oxisterols, pot desencadenar noves accions que complicaran la situació. Per exemple, s'ha descrit que provoca la inhibició de l'SMasa lisosomal (Reagan, Hubbert et al. 2000), conduint a l'acumulació d'SM que portarà a l'expansió dels lisosomes (Lougheed, Moore et al. 1999) i alterarà la distribució normal de colesterol (Leventhal, Chen et al. 2001).

El colesterol també pot ser acumulat a les membranes cel·lulars, on pot influir en la funció dels receptors cel·lulars (Yeagle 1991; Gimpl, Burger et al. 1997). La membrana plasmàtica és molt rica en colesterol lliure, conté el 65-80% del colesterol lliure total cel·lular (Liscum and Munn 1999; Prinz 2002), però l'augment de la proporció del colesterol

respecte els fosfolípids pot inhibir la funció de varies proteïnes de membrana, com la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa l'adenilat ciclase o el transportador ABCA1 involucrat en l'eflux de colesterol (Yeagle 1991; Feng and Tabas 2002). En contra, el reticle endoplasmàtic és pobre en colesterol (Bretscher and Munro 1993) i normalment conté un percentatge molt baix del colesterol lliure total cel·lular (Liscum and Munn 1999; Prinz 2002). A més, l'augment de colesterol en les membranes internes també provoca problemes interferint en la funció de proteïnes de membrana que poden induir una resposta pro-inflamatòria en la cèl·lula (Li, Schwabe et al. 2005) o acabar provocant apoptosi cel·lular (Feng, Yao et al. 2003).

Tots aquests processos deguts a l'acumulació excessiva de colesterol a l'interior cel·lular porten a la transformació de la cèl·lula vascular en una cèl·lula espumosa, principal responsable de la progressió i empitjorament de la lesió ateroscleròtica.

### 5.3.3. INDUCCIÓ DE LA SECRECIÓ DE MOLÈCULES INFLAMATÒRIES

Les lipoproteïnes retingudes a la paret arterial poden ser internalitzades per les cèl·lules i activar la resposta inflamatòria induint l'alliberament de diferents molècules inflamatòries. Respecte a l'acció de l'LDL nativa, per si sola, sobre la secreció de citoquines, s'ha descrit que augmenta la secreció d'IL-8 en SMC (Ryoo, Kim et al. 2004). No obstant, l'efecte de l'LDL nativa és molt menor al produït per les formes modificades d'LDL.

La partícula d'LDL modificada de la qual s'ha estudiat més el seu efecte inflamatori és l'LDL<sub>ox</sub>. Però, cal tenir en compte que l'oxidació de les partícules d'LDL genera varies molècules biològicament actives que el seu efecte depen del grau de modificació. Per això, alguns autors precisen i parlen d'LDL mínimament modificada (LDL<sub>mm</sub>) i d'LDL extensament oxidada. En l'LDL<sub>mm</sub> s'ha suggerit que els components actius són els fosfolípids oxidats, com els oxPAPC o els fosfolípids fragmentats tipus PAF. S'ha observat que els oxPAPC i altres derivats de fosfolípids oxidats serien els responsables d'incrementar la producció d'MCP-1 i IL-8 en cèl·lules endotelials arterials, (Yeh, Leitinger et al. 2001; Subbanagounder, Wong et al. 2002) MCP-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  en macròfags (Miller, Viriyakosol et al. 2005) i MCP-1 en SMC (Cushing, Berliner et al. 1990) (Taula 3). Pel que fa a les LDL extensament oxidades, les quals presenten oxidació tant de la part lipídica com de la part proteica, els productes lipídics que indueixen la inflamació són aldehids i cetones (MDA, HNE) i oxisterols. S'ha descrit que aquestes LDL indueixen la secreció d'IL-8 en monòcits, macròfags, cèl·lules endotelials i SMC (Terkeltaub, Banka et al. 1994; Claise, Edeas et al. 1996; Wang, Tabas et al. 1996; Ryoo, Kim et al. 2004), d'MCP-1 en

cèl·lules endotelials (Wang, Deng et al. 1996; Lee, Shi et al. 2000) i d'IL-1 $\beta$  en macròfags i SMC (Lin, Yen et al. 2003).

Les vies de senyalització per les quals les LDL oxidades duen a terme aquestes accions també varien segons el grau d'oxidació de l'LDL. Per exemple, s'ha observat que les LDLmm indueixen l'activació de les MAPK p38 i JNK, però no de la MAPK ERK1/2 en SMC (Loidl, Claus et al. 2004), i que activen el factor nuclear PPAR $\alpha$  en cèl·lules endotelials (Lee, Shi et al. 2000). En canvi, les LDL extensament oxidades s'ha descrit que activen ERK1/2 en SMC (Chien, Chien et al. 2003) i que indueixen la translocació nuclear d'NF $\kappa$ B en SMC i cèl·lules endotelials (Maziere, Auclair et al. 1996). Per tant, l'oxidació d'LDL origina un grup química- i morfològicament heterogeni de partícules que poden provocar nombrosos efectes diferents.

Un altre tipus d'LDL que incrementen dramàticament la seva habilitat d'induir la secreció de citoquines inflamatòries en les cèl·lules vasculars són les LDL amb un contingut lipídic alterat. Així doncs, han sigut objecte de molts estudis les LDL modificades per l'acció de la PLA<sub>2</sub>, i s'ha vist que incrementen l'expressió d'IL-8 i MCP-1 en cèl·lules endotelials, i d'IL-8 en macròfags (Terkeltaub, Banka et al. 1994; Benitez, Camacho et al. 2004). Les seves propietats aterogèniques es creu que serien en part conseqüència dels productes de reacció, LPC i NEFA. S'ha observat que tant LPC com NEFA indueixen la secreció d'IL-8, IL-6 i MCP-1 en cultius de cèl·lules endotelials (Takahara, Kashiwagi et al. 1996; Takabe, Kanai et al. 2004), i d'IL-6 i MCP-1 en SMC (Rong, Berman et al. 2002; Staiger, Staiger et al. 2004).

En general, sempre es parla de l'efecte de les LDL un cop retingudes a l'íntima arterial, però també es coneix l'acció d'LDL modificades presents en la circulació plasmàtica. Concretament, s'ha suggerit que la PLA<sub>2</sub> podria modificar les lipoproteïnes ja en el compartiment del plasma sanguini (Sartipy, Camejo et al. 1999) i llavors, l'acció de LPC i NEFA sobre les cèl·lules arterials podria ser duta a terme tant directament per aquests lípids alliberats i transportats per l'albumina, com per les pròpies lipoproteïnes modificades per PLA<sub>2</sub> presents a l'artèria. Pel que fa al respecte, s'ha descrit que nivells plasmàtics de NEFA augmentats correlacionen amb la concentració de citoquines inflamatòries presents en la circulació sanguínia (Staiger, Staiger et al. 2004). Una altra LDL modificada present a la circulació plasmàtica és l'LDL(-) de la qual s'ha descrit que estimula l'alliberament d'MCP-1 i IL-8 en cèl·lules endotelials (De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003).



Dues altres formes d'LDL modificades que estan enriquides en NEFA, l'E-LDL i l'LDL incubada amb una barreja de NEFA, s'ha demostrat que indueixen la secreció d'IL-8 i MCP-1 en cèl·lules vasculars (Suriyaphol, Fenske et al. 2002; Benitez, Camacho et al. 2004). En conseqüència, les LDL enriquides en NEFA, o LPC, mitjançant la inducció de diverses citoquines en les cèl·lules vasculars, podrien promoure tant la diferenciació com l'acumulació de monòcits i SMC en les lesions ateroscleròtiques.

A la Taula 3 es resumeixen els principals efectes inflamatoris de diferents LDL modificades.

Taula 3. Citoquines induïdes per l'acció de diferents LDL modificades.

Estímul	Citoquina	Tipus cel·lular	Referència
<b>LDL nativa</b>	IL-8	SMC	(Ryoo, Kim et al. 2004)
<b>LDLox</b>	MCP-1	cèl·lules endotelials, monòcits	(Wang, Deng et al. 1996; Lee, Shi et al. 2000)
	IL-8	cèl·lules endotelials, monòcits, macròfags, SMC	(Terkeltaub, Banka et al. 1994; Claise, Edeas et al. 1996; Wang, Tabas et al. 1996; Lee, Shi et al. 2000; Ryoo, Kim et al. 2004)
	IL-1 $\beta$	macròfags, SMC	(Ku, Thomas et al. 1992; Lin, Yen et al. 2003)
	TNF- $\alpha$	monòcits, limfòcits	(Frostegard, Huang et al. 1997)
<b>LDLmm</b>	MCP-1	cèl·lules endotelials, macròfags, SMC	(Cushing, Berliner et al. 1990; Miller, Viriyakosol et al. 2005)
	IL-6	macròfags	(Miller, Viriyakosol et al. 2005)
	IL-8	monòcits	(Schwartz, Andalibi et al. 1994)
	TNF- $\alpha$	macròfags	(Miller, Viriyakosol et al. 2005)
<b>LDL-PLA<sub>2</sub></b>	MCP-1	cèl·lules endotelials	(Benitez, Camacho et al. 2004)
	IL-8	cèl·lules endotelials, monòcits	(Terkeltaub, Banka et al. 1994; Benitez, Camacho et al. 2004)
<b>LDL-NEFA</b>	MCP-1	cèl·lules endotelials	(Benitez, Camacho et al. 2004)
	IL-8	cèl·lules endotelials	(Benitez, Camacho et al. 2004)
<b>E-LDL</b>	MCP-1	macròfags, SMC	(Klouche, Gottschling et al. 1998; Klouche, Rose-John et al. 2000)
	IL-6	macròfags, SMC	(Klouche, Gottschling et al. 1998; Klouche, Rose-John et al. 2000)
	IL-8	cèl·lules endotelials	(Suriyaphol, Fenske et al. 2002)
<b>LDLac</b>	MCP-1	macròfags	(Wang, Tabas et al. 1996)
	IL-8	macròfags	(Wang, Tabas et al. 1996)
<b>LDL glicada</b>	MCP-1	monòcits	(Isoda, Folco et al. 2008)
<b>LDL(-)</b>	MCP-1	cèl·lules endotelials	(De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003)
	IL-8	cèl·lules endotelials	(De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003)

#### 5.3.4. ALTRES PROPIETATS ATEROGENIQUES DE LES LDL MODIFICADES

A part de les propietats aterogèniques provocades per les LDL modificades ja comentades, se'ls hi atribueixen moltes altres accions, algunes de les quals s'expliquen breument a continuació.

La **citotoxicitat** té lloc quan les cèl·lules estan exposades a certs productes que els dificulten la seva activitat metabòlica normal, creant-els-hi desordres i, finalment, la mort. Es coneix que l'LDLox és tòxica per les cèl·lules de la paret arterial, sobretot cap a les endotelials, produïnt pèrdua de la integritat de l'endoteli vascular. S'ha atribuït la causa de la seva citotoxicitat a la presència de diferents compostos d'oxidació, com oxisterols o espècies reactives d'oxígen (ROS) (Peng, Taylor et al. 1985; Sevanian, Hodis et al. 1995; Chen, Xun et al. 2007). També s'ha descrit que l'LDLox indueix **apoptosi** o mort cel·lular programada a cèl·lules endotelials, SMC i macròfags (Hardwick, Hegyi et al. 1996; Li and Mehta 2000; Kataoka, Kume et al. 2001).

Un efecte diferent de les LDL modificades és la inducció de l'alliberament de **metal·loproteïnases de la matriu** (MMP). Les MMP són enzims proteolítics que degraden les proteïnes de la matriu extracel·lular provocant la desestructuració de les capes de la paret arterial. Aquesta reorganització de la matriu promou la migració de les SMC cap a la íntima arterial i pot afavorir la progressió i ruptura de les plaques d'ateroma. S'ha observat que l'LDLox indueix la secreció de MMP principalment en macròfags, però també en cèl·lules endotelials i SMC (Xu, Meisel et al. 1999; Li, Liu et al. 2003; Haug, Lenz et al. 2004). Un altre tipus d'LDL modificada, la E-LDL, també estimula la producció de MMP en monòcits i SMC (May, Schmidt et al. 2005).

Un altre efecte específic de l'LDLox és la inhibició de l'**òxid nítric** (Schmid, Lee et al. 2008), un potent vasodilatador que té altres funcions protectores en la progressió de la placa d'ateroma, com la inhibició de l'agregació de plaquetes i de l'adhesió de leucòcits, i la prevenció de la proliferació de les SMC (Naseem 2005).

## **6. L'LDL ELECTRONEGATIVA**

### **6.1. QUÈ ÉS L'LDL ELECTRONEGATIVA?**

Des de fa 20 anys, diversos autors han detectat en la circulació plasmàtica una forma minoritària d'LDL amb major càrrega elèctrica negativa que s'anomena LDL electronegativa (LDL(-)), tot i que també se l'ha denominat: LDL-, minor LDL, LDLB, L5 o fLDL (Avogaro, Bon et al. 1988; Shimano, Yamada et al. 1991; Védie, Myara et al. 1991; Chen, Jiang et al. 2003; Zhang, Maeda et al. 2006). Concretament, es va descriure per primera vegada l'existència d'LDL(-) el 1988 quan el grup d'Avogaro va aïllar a partir de plasma humà una forma d'LDL modificada (Avogaro, Bon et al. 1988).

S'ha separat l'LDL(-) de l'LDL total, en funció de la seva elevada càrrega negativa, per diferents mètodes: cromatografia d'intercanvi iònic, electroforesi en agarosa o electroforesi capil·lar. Però, sota la característica comuna de l'elevada càrrega negativa, hi trobem un conjunt de partícules heterogènies que varien en composició lipídica i proteica, densitat i mida. Per tant, el nom de LDL(-) engloba un conjunt d'LDL modificades amb diferents orígens, com poden ser LDLox, LDL glicada, LDL agregada, LDL enriquida en NEFA, etc.

L'interès per l'estudi de l'LDL(-) va sorgir al veure que la proporció d'aquesta partícula en circulació estava augmentada en individus amb dislipèmies o diabetis, patologies que presenten alt risc cardiovascular. Per tant, es va pensar que aquesta partícula modificada podia tenir alguna relació amb l'aterosclerosi.

### **6.2. SITUACIONS FISIOPATOLOGIQUES AMB INCREMENT DE L'LDL(-)**

La proporció d'LDL(-) es troba elevada en patologies amb alt risc cardiovascular amb presència de patologia ateroscleròtica. En general, la proporció d'LDL(-) en individus sans és del voltant del 5 % de l'LDL total, però pot superar el 10-20 % en individus amb HF (Bittolo-Bon, Cazzolato et al. 1994; Védie, Jeunemaitre et al. 1998; Sanchez-Quesada, Otal-Entraigas et al. 1999; Zhang, Miura et al. 2008), hipertrigliceridèmia (Védie, Jeunemaitre et al. 1998; Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2002), diabetis mellitus tipus I (Sanchez-Quesada, Perez et al. 1996; Sanchez-Quesada, Perez et al. 2001) i tipus II (Moro, Zambon et al. 1998; Moro, Alessandrini et al. 1999; Sanchez-Quesada, Perez et al. 2001; Zhang, Kaneshi et al. 2005), disfunció renal (Ziouzenkova, Asatryan et al. 1999) o pacients amb malaltia arterial coronària documentada angiogràficament (Tomasik, Jachec et al. 2003; Zhang, Maeda et al. 2006). D'altra banda, la proporció d'LDL(-) augmenta

després d'un l'exercici físic molt intens (Sanchez-Quesada, Homs-Serradesanferm et al. 1995).

La HF monogènica es tracta d'una patologia genètica en què hi ha una manca total o parcial del rLDL funcional (Goldstein and Brown 1983; Hobbs, Brown et al. 1992). Conseqüentment, l'LDL no és internalitzada a les cèl·lules i s'acumula en el plasma augmentant molt els seus nivells de concentració que provoquen un elevat risc de patologia cardiovascular dels individus afectats. L'augment del temps de residència de l'LDL en la circulació afavoriria la seva modificació, fet que podria comportar la formació d'LDL(-). S'ha estudiat el possible origen oxidatiu de l'LDL(-) en individus d'HF, però, s'ha descartat, ja que la teràpia amb simvastatina redueix la proporció d'LDL(-) sense modificar la susceptibilitat a l'oxidació de l'LDL (Sanchez-Quesada, Ota-Entraigas et al. 1999).

En els pacients hipertriglicèridèmics la proporció de l'LDL(-) varia entre els individus, potser reflectint que hi hauria diferents causes de l'augment d'LDL(-) i, per tant, diferents orígens per l'LDL(-) d'hipertriglicèridèmics (Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2002).

En la diabetis mellitus es va hipotetitzar que l'origen de l'LDL(-) podria ser la glicació de l'LDL perquè s'ha descrit que l'LDL glicada posseeix una major càrrega negativa (Gugliucci Ceriche and Stahl 1993). De fet, s'ha proposat que la glicació no enzimàtica podria ser l'origen de l'LDL(-) dels diabètics tipus I (Sanchez-Quesada, Perez et al. 1996), mentre que no semblaria estar implicada en la generació de l'LDL(-) dels diabètics tipus II (Sanchez-Quesada, Perez et al. 2001).

Els malalts renals sotmesos a hemodiàlisi, els quals presenten major risc ateroscleròtic, també tenen augmentat el percentatge d'LDL(-) (Ziouzenkova, Asatryan et al. 1999; Ziouzenkova and Sevanian 2000). Sembla que una de les causes seria el procés d'hemodiàlisi en el que es dona entrecreuament oxidatiu de l'apoB-100 amb l'hemoglobina.

A part de les situacions patològiques, l'LDL(-) també augmenta després de l'exercici aeròbic agut (Sanchez-Quesada, Homs-Serradesanferm et al. 1995). Primer es va relacionar que l'origen d'aquesta partícula era l'estrès oxidatiu, ja que després d'exercici aeròbic intens s'observava una major susceptibilitat a l'oxidació de l'LDL i un augment paral·lel en la proporció d'LDL(-) (De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000). No obstant això, aprofundint en aquest tema, es va concloure que l'augment d'LDL(-) després de l'exercici era conseqüència d'un increment en el seu contingut en NEFA (Benitez, Sanchez-Quesada et al. 2002).

### **6.3. CARACTERÍSTIQUES FÍSICO-QUÍMIQUES DE L'LDL(-)**

La composició química de l'LDL(-) varia de la de l'LDL nativa o electropositiva (LDL(+)), presentant un augment de triglicèrids, colesterol lliure, NEFA, apoE i apoCIII, i una disminució de la proporció relativa d'apoB-100 (Chappey, Myara et al. 1995; Nyssonen, Kaikkonen et al. 1996; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003).

L'LDL(-) és heterogènia, així doncs, en formen part partícules amb diferent densitat i mida. L'augment de densitat és degut a un increment en la proporció de proteïnes respecte als lípids i va acompanyada de la disminució de la mida de la partícula. La major part de les partícules d'LDL(-) d'individus normolipèmics (NL) són petites i denses. En individus hipertriglicèridèmics, trobem dues poblacions principals: una de partícules petites i denses, i una altra de partícules grans i lleugeres. En individus HF també s'han vist ambdues poblacions, però amb major quantitat de partícules grans i lleugeres (Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2002).

La susceptibilitat de les partícules a agregar-se és major en l'LDL(-) que en l'LDL(+), tant en individus NL com HF, sent les dues subfraccions d'LDL d'individus HF encara més susceptibles a agregar-se que l'LDL(-) de NL (Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003).

Hi ha hagut moltes discrepàncies entre els autors sobre si l'LDL(-) està oxidada. Als inicis, Avogaro i col·laboradors troben un augment en el contingut de lipoperòxids, mesurats pel mètode TBARS (substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric), pel qual expliquen la major càrrega negativa de l'LDL(-) i una disminució d'antioxidants (Avogaro, Bon et al. 1988; Cazzolato, Avogaro et al. 1991; Sevanian, Bittolo-Bon et al. 1997). Més autors troben semblants resultats (Hodis, Kramsch et al. 1994; Sevanian, Hwang et al. 1996; Greilberger, Wang et al. 1999) alhora que altres estudis s'hi contraposen mostrant que no hi ha evidències d'oxidació (Chappey, Myara et al. 1995; Demuth, Myara et al. 1996; Nyssonen, Kaikkonen et al. 1996; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003).

A part de si l'LDL(-) està oxidada en la circulació plasmàtica, també s'ha mesurat la seva susceptibilitat a oxidar-se. El nostre grup va trobar que l'LDL(-) d'individus NL i HF és més resistent a l'oxidació induïda *in vitro* per  $\text{Cu}^{2+}$  (Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003). Però, altres investigadors observen el contrari, que té una major oxidabilitat (Shimano, Yamada et al. 1991; Sevanian, Bittolo-Bon et al. 1997).

D'altra banda, els canvis en la composició de la partícula poden provocar canvis en la distribució en l'espai dels components, podent-se observar diferències conformacionals de l'apoB-100. Hi ha estudis que descriuen que l'LDL(-) presenta alteracions en la

conformació de l'apoB-100, concretament una pèrdua de l'estructura secundària, desplegament i enfonsament en zones hidrofòbiques (Parasassi, Bittolo-Bon et al. 2001). Tot i que, en el cas del nostre grup, els anàlisis de l'estructura secundària i terciària per dicroïsm circular i fluorescència del triptofan, no detecten diferències clares entre les dues fraccions d'LDL (Benitez, Villegas et al. 2004).

L'LDL(-) també presenta una activitat enzimàtica associada, l'activitat acetilhidrolasa del factor activador plaquetari (PAF-AH), que es troba augmentada unes 5 vegades respecte l'LDL(+) (Benitez, Sanchez-Quesada et al. 2003). El seu paper pro-aterogènic o anti-aterogènic es discuteix més endavant.

#### **6.4. CARACTERÍSTIQUES ATEROGÈNIQUES DE L'LDL(-)**

##### **6.4.1. UNIÓ A RECEPTORS CEL·LULARS**

Diversos estudis mostren que subfraccions d'LDL amb diferent composició, càrrega, densitat i mida presenten una unió alterada al rLDL (Nigon, Lesnik et al. 1991; Campos, Arnold et al. 1996; McNamara, Small et al. 1996; Lund-Katz, Laplaud et al. 1998). En el cas de l'LDL(-) s'ha descrit que presenta una menor afinitat pel rLDL (Avogaro, Bon et al. 1988; Benitez, Villegas et al. 2004). Es creu que podria estar relacionat amb el seu contingut elevat en NEFA i LPC, que podrien originar canvis conformacionals de l'apoB-100, disminuint l'exposició dels residus de lisina de l'apoB-100 responsables de la unió amb el rLDL (Benitez, Villegas et al. 2004). També es creu que la major càrrega elèctrica negativa de l'LDL(-) podria interferir en la unió amb els residus de cisteïna carregats també negativament del rLDL. La menor afinitat de l'LDL(-) pel rLDL pot comportar un menor aclariment plasmàtic de la partícula, per tant, un temps elevat de permanència en sang que pot permetre més modificacions d'aquesta LDL, que augmentarien el seu potencial aterogènic. Tot i això, en aquest aspecte també existeixen resultats contradictoris, ja que alguns autors han descrit que l'LDL(-) presenta més (Chappey, Myara et al. 1995; Demuth, Myara et al. 1996) o igual (Shimano, Yamada et al. 1991) afinitat pel rLDL.

L'LDL(-) presenta algunes característiques que semblaria que augmentarien l'afinitat pels SR, com la major càrrega negativa o la susceptibilitat a l'agregació. Tanmateix, l'LDL(-) no presenta una major afinitat pels SR, ja que la incubació d'LDL(-) amb macròfags que expressen l'SRAII no va promoure l'acumulació de colesterol esterificat en aquestes cèl·lules (Benitez, Villegas et al. 2004). Per tant, si l'LDL(-) és reconeguda pobrement pel rLDL i no és reconeguda pels SR, ambdós fets n'incrementarien el temps de vida plasmàtica, sinó és que és captada a través d'altres receptors alternatius, com el LOX (Lu,

Yang et al. 2009). Tot i aquests resultats, altres autors defensen que l'LDL(-) sí que pot generar cèl·lules espumoses (Holvoet, Perez et al. 1995; Tertov, Bittolo-Bon et al. 1995).

#### **6.4.2. CITOTOXICITAT I APOPTOSI**

Ja des de els primers estudis es va descriure que l'LDL(-) era citotòxica per cèl·lules endotelials en cultiu (Hodis, Kramschi et al. 1994; Sevanian, Hodis et al. 1995; Demuth, Myara et al. 1996; Chang, Abdalla et al. 1997; Sevanian, Bittolo-Bon et al. 1997). Alguns dels autors atribuïen aquest efecte a un contingut elevat de colesterol oxidat de la partícula (Hodis, Kramschi et al. 1994; Sevanian, Hodis et al. 1995; Chang, Abdalla et al. 1997; Sevanian, Bittolo-Bon et al. 1997), però altres autors van descriure que l'LDL(-) induïa citotoxicitat tot i no presentar evidències d'oxidació (Demuth, Myara et al. 1996).

L'any 2003, Chen i col·laboradors (Chen, Jiang et al. 2003) van aprofundir en el mecanisme citotòxic de l'LDL(-). Van descriure que l'LDL(-) de pacients HF induïa apoptosi a cèl·lules endotelials vasculars mitjançant la inhibició de la transcripció de FGF-2. Aquest efecte va ser atribuït a una lleugera oxidació de la partícula, que podria contenir fosfolípids fraccionats semblants al PAF. Posteriorment, el mateix grup va descriure que la fracció d'LDL(-) d'HF augmentava l'expressió de catepsina B i anexina V, que són inductors de mort cel·lular programada, i que disminuïa l'expressió de molècules encarregades de la degradació de proteïnes ubiquitinades mal plegades, que són necessàries per mantenir la funció normal de la cèl·lula i que la seva supressió porta a l'apoptosi cel·lular (Chen, Lee et al. 2007). Respecte a l'LDL(-) provinent de diabètics tipus II es coneix que també induïx apoptosi suprimint l'expressió de FGF-2 (Lu, Jiang et al. 2008). En el cas de l'LDL(-) de NL, el mecanisme responsable de l'acció apoptòtica encara és desconegut.

#### **6.4.3. INDUCCIÓ DE CITOQUINES**

Una de les característiques aterogèniques més rellevants de l'LDL(-) és la seva capacitat d'induir l'alliberament de quimioquines en cultius de cèl·lules endotelials. Concretament, el nostre grup va descriure que induïx l'alliberació d'IL-8 i d'MCP-1. L'IL-8 i MCP-1 són quimioquines involucrades en el reclutament de limfòcits T i monòcits, respectivament, cap a les zones de lesió. Aquest efecte es produeix tant si la partícula prové d'individus NL (De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003) com de pacients HF (Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003; Benitez, Ordonez-Llanos et al. 2004) o de diabètics (Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2005).

Posteriorment, Abe et al. (Abe, Fornage et al. 2007) van realitzar un estudi genòmic en cèl·lules endotelials en que van observar que l'LDL(-) induïa les quimioquines CXC GRO $\alpha/\beta/\gamma$ , ENA-78, GCP-2 i també la IL-8.

A part de l'efecte quimiotàctic de l'LDL(-), alguns autors han descrit que aquesta partícula també augmenta l'expressió de la molècula d'adhesió VCAM-1 (Yang, Raya et al. 2003; Ziouzenkova, Asatryan et al. 2003; Abe, Fornage et al. 2007) mitjançant l'activació dels factors de transcripció NF $\kappa$ B i AP-1 (Ziouzenkova, Asatryan et al. 2003).

### **6.5. POSSIBLES ORIGENS DELS COMPONENTS RESPONSABLES DE L'ATEROGENESI DE L'LDL(-)**

Es coneixen bé diverses accions aterogèniques de l'LDL(-) i situacions fisiopatològiques en què es troba augmentada, però, no obstant, encara no s'ha establert quins són els mecanismes responsables de la generació d'aquesta partícula que li confereixen propietats aterogèniques. Així doncs, els possibles orígens de l'LDL(-) que han estat hipotetitzats s'exposen a la Taula 4 i s'expliquen a continuació. Tanmateix, el nom d'LDL(-) engloba un conjunt de partícules heterogènies de manera que els seus components podrien ser originats per la combinació de diferents mecanismes.

Taula 4. Possibles orígens de l'LDL(-) i les seves característiques i propietats aterogèniques associades.

<b>Possibles orígens</b>	<b>Característiques i/o components aterogènics</b>	<b>Propietats aterogèniques</b>
Oxidació	Lipoperòxids MDA Oxisterols Canvis estructura apoB-100 / lípids	Inflamació Citotoxicitat i apoptosi ↓ afinitat rLDL
Hidròlisi per PLA <sub>2</sub>	NEFA LPC Canvis estructura apoB-100 / lípids Agregació	Inflamació ↓ afinitat rLDL Retenció subendotelial
Hidròlisi per SMasa	Ceramida Canvis estructura apoB-100 / lípids Agregació i fusió	Retenció subendotelial Apoptosi ↓ afinitat rLDL
Alteració catabolisme	Triglicèrids NEFA apoE apoCIII	↓ afinitat rLDL Inflamació



### 6.5.1. OXIDACIÓ

Com s'ha comentat breument a l'apartat de característiques físico-químiques de l'LDL(-) (apartat I-6.3, pàg 63), hi ha controvèrsies sobre si l'LDL(-) està oxidada o no. Alguns autors defensen que l'LDL(-) presenta un origen oxidatiu perquè troben que presenta una sèrie de característiques que concorden amb les de l'LDLox. El grup d'Avogaro juntament amb els seus col·laboradors van descriure que l'LDL(-) presenta un contingut elevat en hidroperòxids, un augment del valor del marcador de lipoperoxidació TBARS, disminució dels nivells de l'antioxidant  $\alpha$ -tocoferol i major mobilitat electroforètica en gels d'agarosa (Cazzolato, Avogaro et al. 1991; Sevanian, Hwang et al. 1996; Sevanian, Bittolo-Bon et al. 1997). Altres autors van observar que l'LDL(-) era més susceptible a l'oxidació *in vivo* addicionant coure (Shimano, Yamada et al. 1991). A més, també es va descriure que l'LDL(-) de micos presentava un exagerat contingut en colesterol oxidat, d'aproximadament el 50 % del colesterol total, resultats que no van ser mai més reproduïts (Hodis, Kramsch et al. 1994).

No obstant, existeixen discrepàncies entre els investigadors i hi ha que grups descarten l'origen oxidatiu de l'LDL(-) ja que no troben enriquiment en lipoperòxids pel mètode de TBARS ni menor contingut en antioxidants (Chappey, Myara et al. 1995; Demuth, Myara et al. 1996; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003). Fins i tot, el grup de Sevanian, el qual en articles previs defensava l'origen oxidatiu, en un altre treball d'LDL(-) de pacients d'hemodiàlisi no va trobar indicis d'oxidació (Ziouzenkova, Asatryan et al. 1999).

Les diferències en els resultats dels diferents estudis poden ser explicades per un conjunt de factors: la gran inestabilitat dels lípids oxidats, la baixa especificitat i reproduïbilitat dels mètodes de mesura d'oxidació d'LDL i diferències en la metodologia d'obtenció de l'LDL(-), com en l'ús de diferent concentració de l'àcid etilendiaminotetracètic (EDTA) o diferències en el rang de densitat d'LDL usat. La majoria de grups aïllen LDL del rang de densitat 1.019-1.063 Kg/L (Avogaro, Bon et al. 1988; Cazzolato, Avogaro et al. 1991; Bittolo-Bon, Cazzolato et al. 1994; Hodis, Kramsch et al. 1994; Sevanian, Hwang et al. 1996), mentre que el nostre grup l'aïlla de 1.019-1.050 Kg/L (De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003; Benitez, Ordonez-Llanos et al. 2004). S'utilitza aquest rang de densitat més estret per evitar la contaminació de l'LDL(-) per Lp(a), una lipoproteïna que també és electronegativa i que podria portar a confusions en els resultats experimentals. A més, l'Lp(a) és el principal transportador de fosfolípids oxidats en plasma (Bergmark, Dewan et al. 2008), fet que podria explicar perquè alguns autors troben un contingut elevat en lipoperòxids en les seves mostres d'LDL(-). A més, l'LDLox té major densitat que l'LDL nativa, per tant, en agafar un rang de densitat més

estret es pot evitar també la possible presència d'LDLox en les nostres preparacions de LDL(-).

En el cas que l'origen de l'LDL(-) sigui oxidatiu, els components oxidats podrien explicar la majoria de les seves propietats aterogèniques. Respecte a l'activitat inflamatòria, citotòxica i apoptòtica de l'LDL(-), diversos autors indiquen que són degudes a la presència de lípids oxidats (Avogaro, Cazzolato et al. 1991; Chen, Jiang et al. 2003; Ziouzenkova, Asatryan et al. 2003; Abe, Fornage et al. 2007). Es coneix àmpliament que els lípids oxidats (lipoperòxids, MDA, oxisterols,...) són inflamatoris, citotòxics i apoptòtics per les cèl·lules (Hwang 1992; Wielkoszynski, Gawron et al. 2006). Per exemple, s'ha descrit que els productes d'oxidació del colesterol alteren el transport iònic, augmentant el flux de calci que acaba provocant citotoxicitat (Boissonneault and Heiniger 1984).

Com ja s'ha comentat, els canvis en la composició dels lípids de l'LDL, en aquest cas provocats per l'oxidació, poden provocar alteracions conformacionals de l'apoB disminuint l'exposició dels epitops responsables de la unió amb el rLDL i, per tant, afeblint l'afinitat pel rLDL, característica aterogènica de l'LDL(-) descrita a l'inici del seu descobriment (Avogaro, Bon et al. 1988).

### **6.5.2. HIDRÒLISI PER LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>**

La PLA<sub>2</sub> podria actuar sobre l'LDL a la paret arterial, on és secretada principalment per SMC i macròfags de manera abundant, o a la circulació, ja que és alliberada i es troba present al plasma. L'alliberament de PLA<sub>2</sub> està augmentat en situacions d'inflamació (Nevalainen 1993) coincidint amb el fet que la proporció d'LDL(-) també augmenta en situacions relacionades amb la inflamació (Sanchez-Quesada, Perez et al. 1996; Ziouzenkova and Sevanian 2000; Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2002; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003). Per exemple, l'artritis reumatoide és una situació en la qual es descriuen augments tant de PLA<sub>2</sub> com d'LDL(-) (Bomalaski and Clark 1993; Dai, Zhang et al. 1997).

La PLA<sub>2</sub> hidrolitza els fosfolípids de l'LDL augmentant el contingut en LPC i NEFA de la partícula, components que es troben incrementats en l'LDL(-). Hi ha autors que han assenyalat el contingut augmentat en LPC i NEFA com responsables de l'acció inflamatòria de l'LDL(-) (Benitez, Camacho et al. 2004; Benitez, Villegas et al. 2004; Asatryan, Hamilton et al. 2005). Tant LPC com NEFA són coneguts mediadors de la inflamació (MacPhee, Moores et al. 1999). Sonoki et al. (Sonoki, Iwase et al. 2003) van descriure que l'LDL tractada amb PLA<sub>2</sub> induïa l'expressió d'MCP-1 per un mecanisme

depenent d'LPC. Respecte a l'acció dels NEFA, es va observar que LDL modificades enzimàticament per la colesterol esterasa o la tripsina, que augmenten el contingut de NEFA, induïen la producció d'IL-8 en cèl·lules endotelials (Suriyaphol, Fenske et al. 2002). A més, també s'ha descrit que la modificació *in vitro* d'LDL(+) mitjançant la incubació amb PLA<sub>2</sub> reproduïx part dels efectes inflamatoris de l'LDL(-) (Benitez, Camacho et al. 2004).

La modificació del contingut lipídic per l'acció de la PLA<sub>2</sub> s'ha vist que també altera la disposició en l'espai de l'apoB-100 (Asatryan, Hamilton et al. 2005), podent fer variar l'afinitat de la lipoproteïna pels receptors.

D'altra banda, l'increment en el contingut en LPC i NEFA també podria ser degut a altres activitats enzimàtiques com la de la PAF-AH, que es troba associada a l'LDL(-) (Benitez, Sanchez-Quesada et al. 2003).

### 6.5.3. HIDRÒLISI PER L'ESFINGOMIELINASA

L'activitat SMasa podria estar implicada en l'origen de l'LDL(-) perquè la principal característica de les LDL modificades amb SMasa és l'agregació de les partícules (Oorni, Hakala et al. 1998) i l'LDL(-) presenta una major susceptibilitat a l'agregació (Avogaro, Bon et al. 1988; Cazzolato, Avogaro et al. 1991). Aquesta activitat SMasa podria provenir tant de la sSMasa secretada per macròfags i cèl·lules endotelials (Schissel, Schuchman et al. 1996; Marathe, Schissel et al. 1998) com de l'activitat suggerida com a pròpia de l'apoB-100 de l'LDL (Holopainen, Medina et al. 2000; Kinnunen and Holopainen 2002).

Com ja s'ha explicat, l'acció de l'SMasa sobre l'LDL indueix canvis en la composició, modificació de l'estructura i agregabilitat de la partícula (Oorni, Hakala et al. 1998). D'altra banda, també s'ha relacionat la major agregació de les lipoproteïnes amb la retenció subendotelial de l'LDL (Oorni, Pentikainen et al. 2000).

### 6.5.4. ALTERACIÓ DEL CATABOLISME

Diferents alteracions del metabolisme catabòlic podrien explicar els canvis en la composició de l'LDL(-) i la seva major càrrega negativa, que li atorgarien algunes de les propietats aterogèniques.

En situacions de descontrol metabòlic com en la insulinoresistència o en la diabetis s'observa un increment en els nivells de triglicèrids i NEFA (Lam, Carpentier et al. 2003). En la inflamació crònica un augment d'enzims poden també incrementar els NEFA (Nevalainen 1993). De nou, els canvis en la composició es poden relacionar amb l'afinitat

amb el rLDL i l'elevat contingut en NEFA podria explicar part de l'acció inflamatòria de l'LDL(-) (Benitez, Camacho et al. 2004; Benitez, Villegas et al. 2004).

D'altra banda, l'alteració del metabolisme lipídic pot fer variar la relació de les proteïnes en les lipoproteïnes. En el cas de l'LDL(-) presenta nivells elevats d'apoE i apoCIII (De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000) que poden participar en l'augment de la càrrega negativa de la partícula i que li podrien conferir propietats aterogèniques.

També, degut a disfuncions en el catabolisme de la VLDL, es podrien formar algunes partícules d'LDL(-) de mida elevada i baixa densitat semblants a les IDL (Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2002) que estan relacionades amb l'aterosclerosi.

## **6.6. PAPER PROTECTOR DE PAF-AH EN L'LDL(-)**

La PAF-AH és una fosfolipasa de la família de la PLA<sub>2</sub> que també és anomenada fosfolipasa associada a lipoproteïnes (Lp-PLA<sub>2</sub>). El seu substrat es el fosfolípid proinflamatori PAF, així com fosfolípids que contenen residus fragmentats per oxidació en la posició sn-2 (Hurt-Camejo, Camejo et al. 2001), anomenats fosfolípids semblants al PAF. A la PAF-AH tant se li ha suggerit una acció anti-inflamatòria com pro-inflamatòria. La seva capacitat d'hidròlisi de fosfolípids inflamatoris tipus PAF suggereix un paper anti-inflamatori (Stafforini, McIntyre et al. 1997) però, al hidrolitzar-los produeix LPC i NEFA oxidats que també són mediadors d'inflamació (MacPhee, Moores et al. 1999; Tselepis and John Chapman 2002). L'LDL(-) presenta activitat PAF-AH augmentada (Benitez, Sanchez-Quesada et al. 2003), podent conferir-li un cert paper anti-inflamatori.

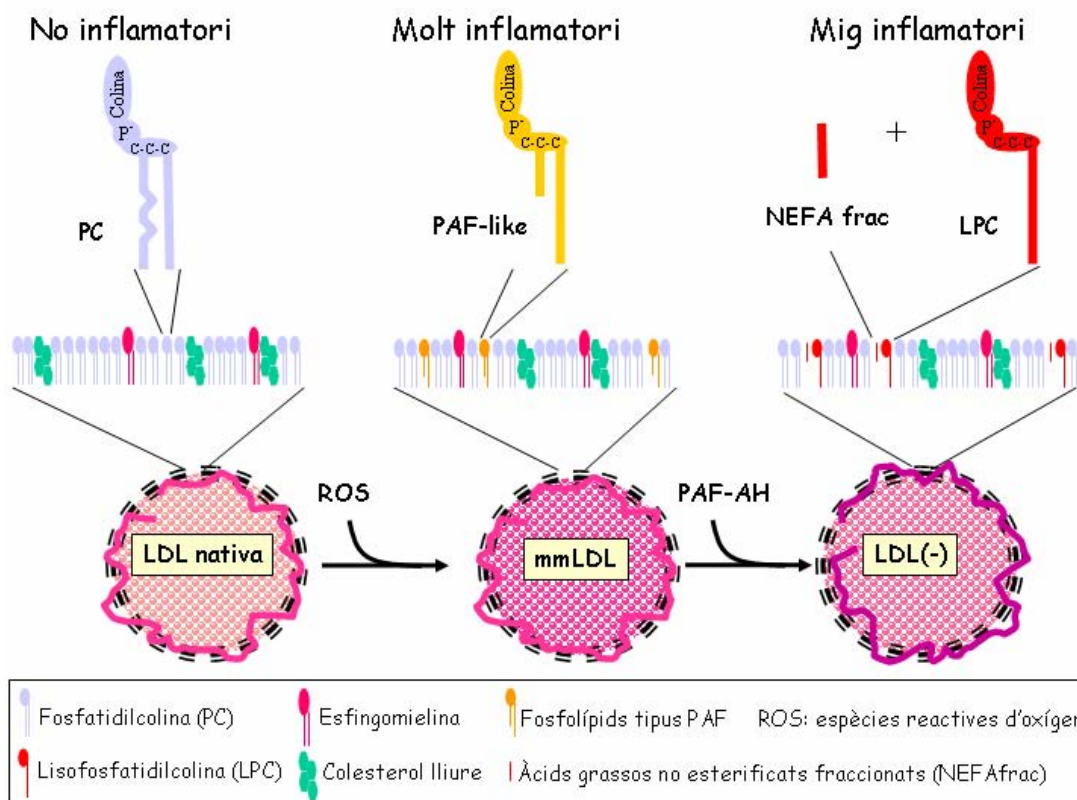
S'ha suggerit que la PAF-AH podria hidrolitzar fosfolípids tipus PAF d'LDL mínimament oxidades, produint LPC i NEFA que al ser més polars s'alliberarien en part de la partícula, i així transformaria les LDL mínimament oxidades en LDL(-), que serien menys inflamatòries (Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2004). A la Figura 6 s'esquemmatitza el possible paper protector que jugaria la PAF-AH en l'LDL.

Una teoria molt semblant ha estat proposada per l'Lp(a) que presenta un alt contingut en fosfolípids oxidats (Bergmark, Dewan et al. 2008) i també se li associa preferentment la PAF-AH (Karabina, Elisaf et al. 1996). Els autors descriuen que en situacions en que hi ha un contingut moderat en fosfolípids oxidats, l'Lp(a) els captaria i la PAF-AH associada tindria un efecte detoxificador (Tsimikas, Tsironis et al. 2007).

Tanmateix, l'augment de PAF-AH que s'ha trobat en situacions d'estrés oxidatiu i inflamació (Noto, Chitkara et al. 2006; Iwase, Sonoki et al. 2008) podria estar duent a

terme una resposta preventiva, tot i que insuficient quan els nivells d'oxidació fossin massa elevats. Això pot fer pensar que la presència de PAF-AH és un factor de risc cardiovascular, com ha estat descrit (Davidson, Corson et al. 2008).

Figura 6. Possible acció protectora de la PAF-AH convertint LDL molt inflamatòries (mmLDL) en LDL mig inflamatòries (LDL(-)). Figura adaptada de: (Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2004).



## **HIPÒTESI I OBJECTIUS**

## HIPÒTESI I OBJECTIUS

Es coneix la presència a circulació d'una subfracció minoritària d'LDL amb major càrrega negativa, anomenada LDL electronegativa. Es tracta d'una LDL modificada que presenta propietats aterogèniques. Es desconeix el seu origen, però s'ha vist que es troba augmentada en patologies d'alt risc cardiovascular, com en la hipercolesterolèmia familiar o en la diabetis mellitus. Entre les propietats aterogèniques descrites destaquen la seva capacitat inflamatòria, ja que indueix la producció de quimioquines per part de cèl·lules endotelials en cultiu, i es creu que podria induir diferents molècules inflamatòries en altres models cel·lulars. Una altra característica de l'LDL(-) és la major activitat PAF-AH, fet que suggereix que l'LDL(-) podria tenir altres activitats enzimàtiques associades. D'altra banda, la major susceptibilitat a l'agregació de l'LDL(-) fa pensar que podria unir-se més als components de la matriu extracel·lular.

En base als coneixements previs, l'objectiu de la present tesi doctoral ha estat aprofundir en l'estudi de propietats aterogèniques de l'LDL(-), concretament en els efectes inflamatoris, activitats enzimàtiques associades i la unió a components de la matriu extracel·lular, i alhora intentar entendre els mecanismes que en són responsables.

A continuació s'exposen els principals objectius d'aquest estudi:

1. Estudiar l'efecte de l'LDL(-) en la inducció de molècules inflamatòries sobre cèl·lules endotelials de vena i d'artèria de cordó umbilical i sobre monòcits i limfòcits. Comparar l'efecte entre els diferents models cel·lulars i estudiar els possibles mecanismes responsables.
2. Estudiar la presència d'activitats fosfolipolítiques en l'LDL(-) que podrien explicar part de la composició diferencial de la partícula i algunes de les seves propietats aterogèniques.
3. Estudiar la unió de l'LDL(-) a components de la matriu extracel·lular: glucosaminoglicans i proteoglicans d'artèria humana. Aprofundir en les possibles causes d'una alteració en la unió a components de la matriu extracel·lular.

## **MATERIAL I MÈTODES**



# **1. OBTENCIÓ, MODIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LIPOPROTEÏNES**

## **1.1. AÏLLAMENT D'LDL TOTAL**

Es van realitzar mescles a partir de plasma d'individus NL. Els plasmes, recollits en tubs Vacutainer amb EDTA, procedien de sobrants d'extraccions realitzades en exàmens de salut. Es van descartar els individus que presentaven dislipèmies o diagnosticats com a diabètics i/o hipertensos. Es va considerar que la mescla era normolipèmica si, després de la seva preparació, els valors de colesterol i de triglicèrids no excedien els límits que s'indiquen: colesterol < 5 mM i triglicèrids < 1,3 mM.

A partir de la barreja de plasma es realitza l'aïllament seqüencial de les lipoproteïnes segons la seva densitat:

Quilomicrons	< 0,96 Kg/L
VLDL	0,96 – 1,006 Kg/L
IDL	1,006 – 1,019 Kg/L
LDL	1,019 – 1,063 Kg/L
Lp(a)	1,050 – 1,100 Kg/L
HDL	1,063 – 1,210 Kg/L

Així doncs, es separen les diferents lipoproteïnes realitzant un aïllament seqüencial mitjançant ultracentrifugació de flotació (Havel 1955). S'ha de tenir en compte que si es parteix de plasma humà la densitat inicial és de 1,006 Kg/L i per portar-lo a la densitat desitjada cal afegir una quantitat de sals (KBr) concreta, que es pot calcular amb la fórmula de Radding i Steinberg (Radding and Steinberg 1960):

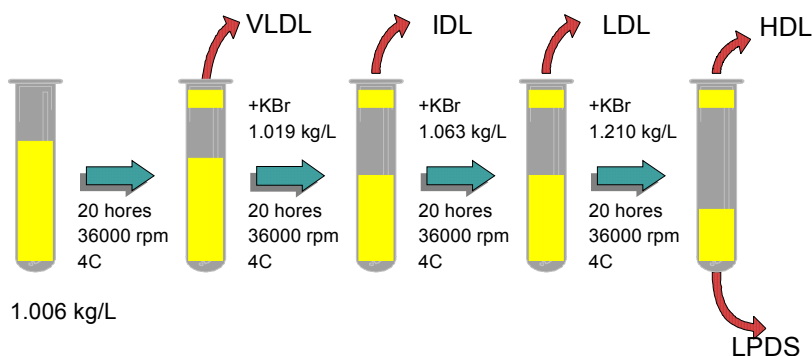
$$\text{grams KBr} = \frac{\text{Volum (mL)} \cdot (\text{densitat final} - \text{densitat inicial})}{1 - (0,312 \cdot \text{densitat final})}$$

Un cop s'ha portat el plasma a la densitat desitjada, es reparteix el volum en tubs d'ultracentrifugació, generalment s'utilitzen tubs de policarbonat de paret rígida de 20 mL. A cada tub se li sobreposa un volum de solució de la mateixa densitat que es vol assolir, fins a arribar al volum màxim dels tubs utilitzats. Les solucions de densitat es preparen a partir de la solució de densitat 1,006 Kg/L afegint-hi la quantitat de KBr adient. La solució 1,006 Kg/L és una solució salina que conté els antibiòtics cloranfenicol i gentamicina i l'inhibidor de metal·loproteases EDTA que també impedeix l'oxidació.

Solució 1,006 Kg/L  
 NaCl 150 mM  
 EDTA 1 mM  
 Cloranfenicol 0.15 mM  
 Gentamicina 80 mg/L  
 pH 7,4

Després de sobreposar la solució de densitat es procedeix a realitzar l'ultracentrifugació a 100.000 g (36.000 rpm als rotors d'angle fix TFT 70,38 i TFT 55,38 de Kontron) i a una temperatura de 4°C durant aproximadament 20 hores. Un cop finalitzada l'ultracentrifugació, les lipoproteïnes de densitat inferior a la que es porta la solució amb el KBr suren. A partir de 1,210 Kg/L, un cop aïllada l'HDL, obtenim sèrum deficient en lipoproteïnes (LPDS). El procés general d'aïllament de les diferents lipoproteïnes basat en el descrit per Havel i col·laboradors (Havel, Eder et al. 1955) es mostra esquemàticament a la Figura 7.

Figura 7. Ultracentrifugació seqüencial en rotor d'angle fix.



El procediment concret de la separació de l'LDL es detalla a continuació:

- Per tal d'aïllar en un sol pas VLDL i IDL s'ajusta el plasma a una densitat de 1,019 Kg/L. Com que la VLDL i la IDL presenten una densitat inferior a 1,019 Kg/L després d'ultracentrifugar suren i es poden separar.
- Seguidament, per aïllar l'LDL del volum restant, es portaria a densitat 1,063 Kg/L, però en el nostre cas, per evitar contaminació d'Lp(a) (densitat 1,050 – 1,100 Kg/L) ajustem a 1,050 Kg/L. Així doncs, l'LDL que aïllem és la fracció del rang de densitats 1,019 – 1,050 Kg/L.
- Per conservar les lipoproteïnes un cop aïllades és important dialitzar-les en front a un tampó per tal d'eliminar el KBr. La diàlisi es realitza en sac de diàlisi en l'anomenat tampó A, que al contenir EDTA preveu l'oxidació. Un cop dialitzada la mostra es conserva a 4°C.

Tampó A  
 Tris-HCl 10mM  
 EDTA 1 mM  
 pH 7,4

## 1.2. AÏLLAMENT D'LDL(-)

LDL(-) es separa de la forma nativa en funció de la càrrega elèctrica mitjançant cromatografia d'intercanvi aniònic seguint mètodes ja descrits (Vedie, Myara et al. 1991; Sanchez-Quesada, Perez et al. 1996; De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000), però amb la introducció d'algunes modificacions.

Es parteix d'un volum de mostra elevat, d'aproximadament 200 mg d'LDL, ja que l'objectiu és obtenir les fraccions d'LDL electropositiva o nativa (LDL(+)) i LDL(-) per recuperar-les i realitzar estudis posteriors. Prèviament, l'LDL total ha de ser dialitzada en tampó A i filtrada a través d'un filtre de 0,45 µm.

L'aïllament es porta a terme mitjançant la columna preparativa *HiLoad 26/10 Q-Sepharose High Performance* (Amersham Biosciences) (Sánchez-Quesada 2003). Aquesta columna té una gran capacitat que permet treballar amb una quantitat de fins a 50 mL totals d'LDL per càrrega de columna. La columna està adaptada a un sistema ÄKTA-FPLC (ÄKTA-cromatografia líquida ràpida de proteïnes, Amersham Pharmacia Biotech) que monitoritza la cromatografia, determinant l'absorbància a 280 nm i la conductivitat.

El tampó d'unió a la columna utilitzat és el tampó A, i el d'elució, el tampó salí anomenat tampó B. Abans d'aplicar la mostra, és important realitzar la càrrega de la columna amb contra-ions amb tampó B, almenys amb dos volums de columna (volum de la columna HiLoad Q-Sepharose: 53,09 mL). Posteriorment s'ha de reequilibrar amb dos altres volums de tampó A.

### Tampó B

Tris-HCl 10 mM

NaCl 1 M

EDTA 1 mM

pH 7,4

La separació de les fraccions d'LDL en funció de la càrrega es realitza utilitzant un gradient salí esglaonat, que es mostra a la Taula 5. El flux de la columna emprat és de 4-7 mL/min.

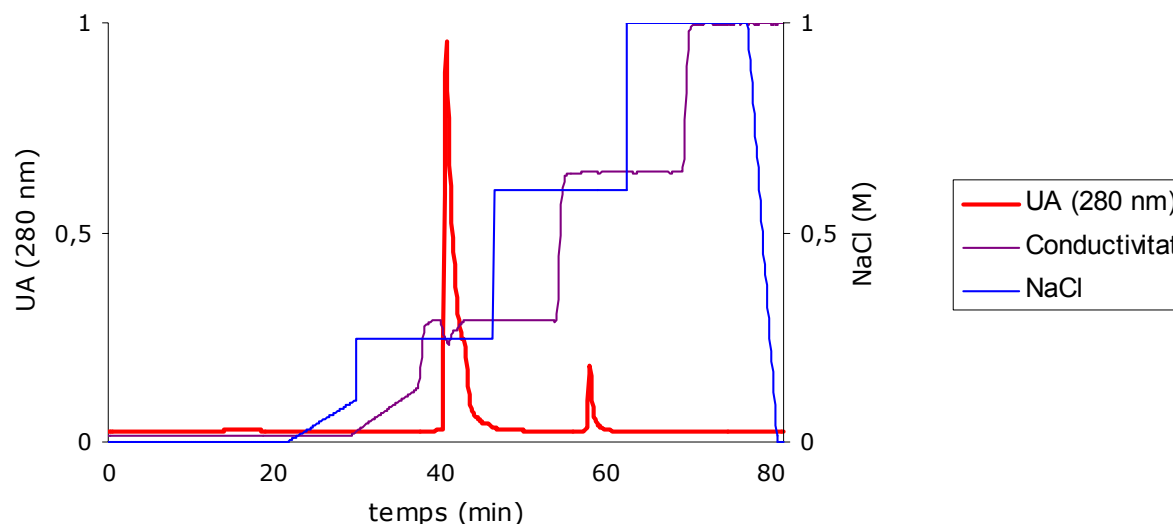
Taula 5. Mètode cromatogràfic esglaonat de la columna HiLoad Q-Sepharose.

Volums de columna	Volum (mL)	% tampó B
2 (1V loop + 1V columna)	0 - 108	0 %
1	108 - 161	0-10 % (continu)
2	161 - 267	24,5 %
2	267 - 373	60 %
2	373 - 479	100 %
0.5	479 - 506	0 %

## Material i mètodes

Per aquest mètode cromatogràfic s'aïllen les dues fraccions, l'LDL(+) i l'LDL(-), les quals elueixen respectivament a 0,245 M i 0,6 M de NaCl. A continuació es mostra un cromatograma representatiu (Figura 8).

Figura 8. Cromatograma de l'aïllament de les fraccions d'LDL, LDL(+) i LDL(-) mitjançant cromatografia d'intercanvi aniónic.



El percentatge relatiu de la fracció electronegativa es quantifica per integració de l'àrea del pic cromatogràfic (absorbància a 280 nm).

Un cop separades les fraccions i calculada la proporció de cadascuna, es reconcentren per mitjà d'ultracentrifugació portant-les a la densitat 1,063 Kg/L (8 hores, 100.000 g, 4°C), i seguidament es procedeix a la seva caracterització.

La columna es va netejar cada 5 o 6 punxades, per evitar l'acumulació de brutícia. El rentat es realitza invertint la columna i fent-li passar NaCl 2 M, aigua, NaOH 1 M, aigua i 30 % isopropanol, seguint les instruccions del fabricant.

### 1.3. MODIFICACIÓ IN VITRO D'LDL

#### 1.3.1. OXIDACIÓ D'LDL

En alguns assajos es va utilitzar l'LDL oxidada (LDLox) com a control positiu d'experiments ja que presenta propietats comunes a l'LDL(-), com un augment de la càrrega negativa i propietats inflamatòries, però més incrementades al ser una LDL molt modificada. Es va procedir a modificar LDL nativa *in vitro* incubant-la amb CuSO<sub>4</sub>, ja que els metalls pesants desencadenen el procés oxidatiu (Steinbrecher 1987).

Procediment:

- Es dialitza l'LDL nativa en el tampó fosfat salí (PBS) i es dilueix a una concentració de 0,2 g apoB/l per tal d'evitar una excessiva formació d'agregats. La composició del PBS s'especifica a continuació:

PBS

NaCl 14 mM

KCl 0,27 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,65 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,15 mM

pH 7,4

- S'afegeix CuSO<sub>4</sub> 2,5-10 μM per a promoure l'oxidació.
- Es deixa l'LDL oxidant-se a temperatura ambient durant unes 15 hores.
- Es pot concentrar l'LDLox per ultracentrifugació, considerant que la solució està a una densitat de 1,006 Kg/L i aïllem l'LDLox a 1,100 Kg/L (L'LDLox té una major densitat que l'LDL nativa).
- Per aturar la reacció d'oxidació es dialitza l'LDLox en tampó A amb 20 μM d'hidroxitolú butilat (BHT) que captarà els radicals lliures, i l'EDTA contingut en el tampó A quel·larà el Cu<sup>+2</sup>.

Un cop obtinguda l'LDLox s'avalua el nivell de modificació verificant el guany de càrrega negativa de la partícula, per mitjà de la mobilitat electroforètica (apartat MM-1.4.2.1, pàg 87).

### 1.3.2. ACETILACIÓ D'LDL

L'acetilació d'LDL modifica les lisines de l'apoB disminuint l'exposició de la seva càrrega positiva i, en conseqüència, augmenta l'electronegativitat. L'LDL es va modificar *in vitro* addicionant anhídrid acètic segons el procediment de Basu et al. (Basu, Goldstein et al. 1976).

Procediment:

- Es parteix d'LDL dialitzada en tampó A a una concentració superior a 1 g/L.
- Es barreja l'LDL amb una solució saturada d'acetat sòdic en relació volum/volum.
- S'afegeixen 2 μL d'anhídrid acètic i es deixa en agitació suau a 4°C durant 15 min. Aquest procés es repeteix tres cops més.
- Finalment, la mostra es filtra i es dialitza en tampó A per eliminar la sal i l'anhídrid acètic.

### 1.3.3. ENRIQUIMENT D'LDL AMB NEFA

Es va modificar LDL nativa incubant-la amb una barreja de NEFA. Per fer-ho es van escollir els àcids grassos majoritaris presents al plasma en condicions fisiològiques (Esterbauer, Dieber-Rotheneder et al. 1991) i es va seguir el procediment prèviament descrit (Benitez, Camacho et al. 2004).

Procediment:

- S'incuba l'LDL nativa a 0,5 g apoB/L i en tampó A, amb:
  - Concentracions creixents (de 2,5 a 20 mM) de la barreja de NEFA (àcid palmític, àcid olèic i àcid linolèic; en la proporció 35:20:45).
  - 45 g/L d'albumina lliure d'àcids grassos.
  - BHT 2  $\mu$ M.
- Les solucions de cada NEFA són en etanol. Aquest representarà un 5 % del volum total final de l'incubació. La concentració d'albumina és la fisiològica i captarà part dels NEFA que no s'uneixin a l'LDL. L'incubació serà de 4 hores a 37°C.
- Posteriorment es porten les mostres a la densitat 1,063 Kg/L i es sotmeten a ultracentrifugació a 100.000 g durant 12 hores a 4°C per tal d'eliminar l'albumina.
- Les LDL modificades es dialitzen en tampó A per cromatografia de gel filtració amb columnes PD10 (Pharmacia) per tal d'acabar d'eliminar els NEFA no units a l'LDL. Es filtren a través d'un filtre de 0,22  $\mu$ m.
- Finalment, s'avalua la composició de les LDL modificades i la seva mobilitat electroforètica en agarosa, com s'indica a l'apartat MM-1.4.2.1, pàg 87.

### 1.3.4. MODIFICACIÓ D'LDL AMB PLA<sub>2</sub>

Les LDL modificades amb PLA<sub>2</sub> presenten un contingut elevat en LPC i NEFA ja que la PLA<sub>2</sub> degrada els fosfolípids produint aquests dos components. Es van tractar les LDL segons el procediment descrit (Benitez, Camacho et al. 2004).

Procediment:

- S'incuba l'LDL nativa a 0,5 g apoB/L en tampó PLA<sub>2</sub> amb:
  - Concentracions creixents, de 5 a 20  $\mu$ g/mL, de sPLA<sub>2</sub> de verí d'abella (ref. P9279, Sigma).
  - 45 g/L d'albumina lliure d'àcids grassos.
  - BHT 2  $\mu$ M.

Tampó PLA<sub>2</sub>

HEPES 5 mM

CaCl<sub>2</sub> 5 mM

MgCl<sub>2</sub> 2 mM

pH 7,4

La concentració d'albumina és la fisiològica i captarà part dels NEFA i LPC que no s'uneixin a l'LDL. L'incubació serà de 2 hores a 37°C.

- La reacció s'atura amb EDTA 10 mM que quelarà el  $\text{Ca}^{2+}$  que l'enzim requereix per dur a terme la reacció.
- Posteriorment es porten les mostres a la densitat 1,063 Kg/L i s'ultracentrifuguen per tal de concentrar-les i eliminar la  $\text{PLA}_2$  i l'albumina a 100.000 g durant 12 hores a 4°C.
- Les LDL modificades es dialitzen en tampó A per cromatografia de gel filtració amb columnes PD10 i es filtren a través de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Finalment, s'avalua la composició de les LDL modificades i la seva mobilitat electroforètica en agarosa, com s'indica a continuació.

#### **1.4. CARACTERITZACIÓ FÍSICO-QUÍMICA DE LIPOPROTEÏNES**

##### **1.4.1. DETERMINACIÓ DE LA COMPOSICIÓ PROTEICA I LIPÍDICA**

El contingut lipídic es va valorar per mitjà de mètodes comercials de tipus enzimocolorimètrics adaptats a un analitzador automàtic Hitachi 911. Concretament es van utilitzar kits de Wako Chemicals per la determinació de colesterol lliure, fosfolípids i NEFA, mentre que colesterol total i triglicèrids es van avaluar per kits de Roche Diagnostics.

Les apolipoproteïnes B, E i CIII es van quantificar per mètodes comercials immunoturbidimètrics de Roche (apoB) i Kamiya (apoE i apoCIII) en Hitachi 911. A continuació, es comenten els fonaments de les determinacions dels lípids i de les apolipoproteïnes segons els mètodes comercials emprats. També s'indiquen els coeficients de variació (CV) interdia de les tècniques.

Fonaments en què es basen els mètodes:

- **Colesterol lliure:** oxidació per acció de la colesterol oxidasa donant lloc a la formació de colestenoona i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . L' $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona amb la 4-aminoantipirina i el 4-fenol per acció de la peroxidasa i es produeix una condensació oxidativa formant-se quinoneimina que és de color vermell detectable a 505 nm. (CV < 1,5 %)
- **Colesterol total:** trencament enzimàtic dels ésters de colesterol per acció de la colesterol esterasa i posterior oxidació del colesterol que dóna lloc a la formació de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aquesta per acció de la peroxidasa sofrirà la mateixa reacció que pel colesterol lliure. (CV < 2 %).
- **Triglicèrids:** acció de la LPL que hidrolitza els triglicèrids a glicerol, el qual per reacció oxidativa amb la glicerol quinasa i la glicerol-3P-oxidasa dóna lloc a dihidroxiacetona fosfat i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , i aquesta última reaccionarà amb la peroxidasa. (CV < 0,9 %).
- **Fosfolípids:** reacció amb la fosfolipasa D originant-se colina, la qual en presència de colina oxidasa dóna lloc a betaïna i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A continuació, té lloc la reacció de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  amb la peroxidasa. (CV < 2 %).

- **NEFA**: reacció amb el coenzim A i ATP originant-se acilCoA, a partir del qual per acció de l'acilCoA oxidasa es forma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que sofrirà després la reacció de condensació oxidativa. (CV < 3 %).
- **ApoB, apoE i apoCIII**: reacció amb l'anticòs anti-apoB/anti-apoE/anti-apoCIII i formació d'agregat insoluble, el qual augmenta la turbidesa que es mesura òpticament. (CV: apoB < 3 %, apoE < 5 %, apoCIII < 5 %).

Per altra banda, l'**apoE** també es va quantificar per una tècnica diferent a la immunoturbidimètrica, mitjançant un assaig immunoabsorbent d'enzim unit (ELISA). Es va seguir el procediment utilitzat per Siggins et al. (Siggins, Jauhainen et al. 2003). Breument, es van cobrir els pous d'assaig amb l'anticòs de captura anti-apoE policlonal de conill (R107). Les mostres d'LDL estaven a una concentració de 20 µg/mL i es van detectar amb un anticòs policlonal de conill anti-apoE conjugat amb peroxidasa HRP (DAKO).

La **proteïna total** es va mesurar mitjançant l'assaig colorimètric comercial BCA (àcid bicinconínic, Pierce), segons les instruccions del fabricant.

En alguns casos, el **colesterol total** es va mesurar amb l'*Amplex Red Cholesterol Assay Kit* (Molecular Probes), un sistema més sensible capaç de detectar concentracions baixes de colesterol. Es basa en les mateixes reaccions enzimàtiques acoblades que en el mètode de Roche pel colesterol anteriorment descrit, però la reacció final dona un substrat fluorescent (*resorufin*). Per dur a terme l'assaig es va seguir el procediment indicat pel fabricant.

#### 1.4.1.1. Determinació de subclasses de fosfolípids

Per determinar les subclasses de fosfolípids i també l'oxidació de la PC es va utilitzar la cromatografia en fase directa monitoritzada per un aparell d'HPLC (Gold Sydtem, mòdul de bomba 126, detector 168; Beckman Coulter) adaptant el mètode de Patton et al. (Patton and Robins 1998).

Procediment:

- Afegir 50 µL de l'estàndard intern dipalmitoil-glicero-fosfodimetil etanolamina (20 g/L en etanol) a 450 µL d'LDL (0,5 g apoB/L).
- Extracció de lípids pel mètode de Bligh i Dyer (Bligh and Dyer 1959):
  - Afegir als 500 µL de la mostra incubada 1,88 mL de cloroform:metanol (vol:vol,1:2) i deixar-los 30 min en agitació vigorosa.
  - Afegir 625 µL de cloroform, barrejar i centrifugar a 800 g durant 10 min.
  - Afegir 625 µL d'aigua, barrejar i centrifugar a 800 g durant 10 min.
  - Descartar la fase superior formada.



- Evaporar la fase inferior sota un flux de nitrogen. Si cal, guardar les mostres congelant-les.
- Separació de lípids per cromatografia en fase directa:
  - Resuspendre la mostra en 100  $\mu$ l d'hexà:isopropanol:aigua (vol:vol:vol, 6:8:1) i carregar 20  $\mu$ l d'aquesta solució a una columna de sílica de fase directa (Luna 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm; Phenomenex).
  - Fer córrer la cromatografia a un flux de 0,6 mL/min. La fase mòbil utilitzada és d'acetonitril:metanol:sulfat amònic 5 mM (vol:vol:vol, 56:23:6).
  - Detecció de pics mitjançant un detector *diode array* (Model 168, Beckman). Els pics principals dels fosfolípids (PC, SM i LPC) es detecten a 205 nm i els diens conjugats del pic corresponent a la PC, que indiquen la seva oxidació, a 234 nm.

## 1.4.2. CARACTERITZACIÓ ELECTROFORÈTICA

### 1.4.2.1. Electroforesi en gel d'agarosa

Es van utilitzar gels comercials d'agarosa, *Midigel lipo* (Biomidi), per determinar la mobilitat electroforètica de les lipoproteïnes. En aquests gels les partícules migren en funció de la càrrega elèctrica. Així doncs, per mitjà de l'electroforesi d'agarosa es va comprovar l'augment de càrrega negativa de l'LDL(-) i d'altres LDL modificades, respecte l'LDL(+).

Procediment, tal com descriu el fabricant:

- S'apliquen 4  $\mu$ L de cada mostra al gel. Quan la mostra ja està absorbida, es fa córrer l'electroforesi a 90 V durant 1 hora, en tampó Barbitol (donat pel fabricant: 1,47 g/L 5,5-àcid dietilbarbitúric, 8,25 g/L 5,5-sal sòdica d'àcid dietilbarbitúric, 1 g/L àcid sòdica i altres reactius per optimitzar el procés).
- Un cop acabada l'electroforesi, el gel es fixa durant 10 min, es renta amb aigua destil·lada i s'asseca sota una font directa de calor (assegador).
- A continuació, el gel es tenyeix amb Negre Sudan, que s'uneix específicament als lípids, durant 10 min, es destenyeix l'excés de coloració, es renta amb aigua destil·lada i es deixa assecar.

#### Solució fixadora

etanol: 180 mL  
aigua destil·lada: 90 mL  
àcid acètic: 30 mL

#### Solució de tinció

etanol: 80 mL  
NaCl a 20 g/L: 40 mL  
Negre Sudan\*: 4 mL d'una solució 40 mg/L en dioxà

#### Solució de destinció

etanol: 150 mL  
NaCl a 20 g/L: 150 mL

### 1.4.2.2. Electroforesi en gel d'acrilamida amb SDS

En l'electroforesi en gel d'acrilamida amb SDS (SDS-PAGE) les mostres migren en funció de la seva mida perquè l'SDS (dodecilsulfat sòdic) és un detergent que desnatura les

partícules i neutralitza la seva càrrega. Es van utilitzar gels comercials en gradient de poliacrilamida o de concentració fixa de la marca BioRad.

Procediment:

- Preelectroforesi. Es sotmet el gel sense mostres a una electroforesi en tampó Tris-glicina amb SDS durant 30 min a 100 V.
- Les mostres es preincuben amb el tampó de mostra Laemmli (BioRad; Tris 62,5mM pH 6,8, glicerol 25 %, SDS 2%, blau de bromofenol 0,01 %) durant 10 min.
- S'apliquen 20 µL de les mostres i 5 µL de l'estàndard de pes molecular als pous del gel.
- Electroforesi. El suport electroforètic és Mini-Protean III (BioRad). Primer, perquè entri la mostra al gel, es fa córrer l'electroforesi a 50 V durant 15 min. Després, s'augmenta el flux a 100 V fins que s'observa el front electroforètic a la part inferior del gel.
- La tinció es realitza amb Blau brillant de Coomassie segons un mètode comercial (PhastGel Blue, Pharmacia). A continuació es procedeix a destenyir el gel.

<u>Tampó Tris-glicina</u>	<u>Solució de tinció:</u>	<u>Solució de destinció</u>
Tris 24 mM	Blau brillant Coomassie 0,1 %	metanol 50 %
glicina 190 mM	metanol 40 %	àcid acètic 10 %
SDS 0,1 %	àcid acètic 10 %	glicerol 1 %

#### 1.4.2.3. Electroforesi en gel en gradient d'acrilamida no desnaturalitzant

Es van realitzar electroforesis en gels en gradient d'acrilamida no desnaturalitzants (GGE) en els quals les mostres corren primer segons la seva càrrega (mentre la mida del porus no és limitant) i al final segons la seva mida (quan la mida del porus és limitant), per tant, són útils per determinar la grandària de la partícula. Es van preparar els gels del 2-16 % adaptant el mètode de Nichols et al. (Nichols, Krauss et al. 1986). Es preparen dues solucions d'acrilamida, una del 2 % i l'altre del 16 % i es barregen gradualment amb unes bombes peristàltiques creant el gel en gradient. El gel es deixa polimeritzar a temperatura ambient i, després, es guarda a 4°C per utilitzar-lo l'endemà.

<u>Reactiu</u>	<u>Solució acrilamida 2 %</u>	<u>Solució acrilamida 16 %</u>
solució mare acrilamida #:	16,5 mL	10,65 mL
sacarosa 50 %:	250 µL	984 µL
tampó borat *:	fins a 25 mL	fins a 20 mL
TEMED (tetrametiletildiamida):	16,5 mL	6,7 mL
APS (persulfat amònic):	100 µL	200 µL
Blau de bromofenol :	200 µL	

\* Tampó Borat: Tris-HCl 9 mM, àcid bòric 8 mM, EDTA 0,3 M, pH 8,3.

# Solució mare acrilamida: 30 % de T (total d'acrilamida + bisacrilamida), 5 % de C (% de bisacrilamida de T).

Procediment:

- Preelectroforesi. Es sotmet el gel sense mostres a una electroforesi en tampó borat a 120 V durant 30 min.
- Les mostres es preincuben durant 15 min:
  - 10 µL d'LDL a 0,5-1 g apoB/L
  - 10 µL de Negre Sudan (0,1 % pes/volum en etilenglicol)
  - 5 µL de sacarosa (50 % pes/volum)
- S'apliquen als pous dels gel 10-20 µL de cada mostra preincubada i d'un estàndard de pool d'LDL de mida coneguda ja preparat al nostre laboratori.
- Electroforesi. El suport electroforètic és Mini-Protean III (BioRad). Primer es fa córrer l'electroforesi a 20 V durant 30 min. Després s'augmenta el flux progressivament a 70 V durant 30 min i a 100 V durant 16 hores. Tot el procés electroforètic es du a terme a 4°C.

### 1.4.3. DETERMINACIÓ DEL GRAU D'OXIDACIÓ

L'oxidació de lipoproteïnes produeix una gran varietat de compostos, en conseqüència, existeixen una gran varietat de mètodes que mesuren diferents productes d'oxidació. En la present tesi, el nivell d'oxidació de les lipoproteïnes va ser determinat detectant diens conjugats, lipoperòxids o isoprostans, pels mètodes que s'expliquen a continuació.

#### ▪ **Detecció de lipoperòxids mitjançant l'assaig colorimètric del Blau de leucometilè.**

El mètode utilitzat és el descrit per Auerbach et al. (Auerbach, Kiely et al. 1992) que permet la detecció d'hidroperòxids. Es tracta d'un assaig colorimètric en el que reaccionen els hidroperòxids de la mostra amb el reactiu Blau de leucometilè (*Leucomethylene Blue*, LMB). S'utilitza com a estàndard el 13-(S)HPODE (Biomol).

Procediment:

- Extracció lipídica pel mètode Bligh i Dyer (explicat dins l'apartat MM-1.4.1.1, pàg 86) a partir d'1,5 mL d'LDL (a 0,7 g proteïna/L).
- Preparació del reactiu LMB:
  - Barrejar 5 mg de LMB (ref. B0207, TCI) amb 8 ml de N,N-dimetilformamida.
  - Per altra banda, preparar: 80 mL d'aigua destil·lada, 1,4 mL tritó X-100, 0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
  - Barrejar les dues solucions, ajustar el pH a 5,0.
  - Afegir 5,5 mg d'hemoglobina. El reactiu es pot guardar fins una setmana a 4°C.

## Material i mètodes

- Incubació durant 30 min dels següents compostos:
  - 40  $\mu$ L extracte lipídic
  - 10  $\mu$ L de la barreja de reacció: 1 % colat sòdic, 25 % etanol i 74% PBS.
  - 100  $\mu$ L reactiu LMB
- Mesurar l'absorbància a 650 nm.

### ▪ **Detecció de lipoperòxids mitjançant un assaig colorimètric comercial.**

Es va utilitzar l'assaig colorimètric comercial PEROXsay™-LIPID (G-Biosciences) que permet la quantificació de peròxids. En concret, mesura l'oxidació del  $\text{Fe}^{2+}$  al  $\text{Fe}^{3+}$  en presència de lípids. Es va seguir el procediment descrit pel fabricant.

#### Procediment:

- Barrejar:
  - 20  $\mu$ L d'LDL (a 0,5 g proteïna /L)
  - 200  $\mu$ L del reactiu 1 (taronja de xilenol)
  - 2  $\mu$ L del reactiu 2 (solució àcida)
- Incubació de la barreja 30 min a temperatura ambient.
- Mesurar l'absorbància a 560 nm.

### ▪ **Detecció d'isoprostans mitjançant un immunoassaig enzimàtic competitiu.**

Es va utilitzar un assaig comercial tipus ELISA competitiu (ACE™ EIAs, Cayman Chemicals) que permet la quantificació del 8-isoprostà, que es tracta d'un eicosanoid produït per l'oxidació al·leatòria dels fosfolípids pels radicals d'oxigen. L'assaig es basa en la competició entre el 8-isoprostà de la mostra i el 8-isoprostà conjugat amb acetilcolina esterasa (8-isoprostà traçador) que s'hi addiciona. Es va seguir el procediment descrit pel fabricant.

#### Procediment:

- Extracció lipídica per tal d'alliberar els isoprostans esterificats en els fosfolípids.
  - Incubar 1 mL de mostra amb 1 mL de KOH 15 % durant 1 hora a 40°C.
  - Afegir 2 mL d'etanol amb 0,01 % BHT, agitar vigorosament i centrifugar, per precipitar les proteïnes.
  - Evaporar l'etanol i purificar la mostra amb una columna SPE C-18, eluint la mostra amb acetat d'etil.
  - Evaporar l'acetat d'etil i resuspendre la mostra amb el tampó de l'assaig d'ELISA.
- Realitzar els passos de l'assaig d'ELISA tal com indica el fabricant.
- Mesurar l'absorbància a 412 nm. L'intensitat del color és proporcional a la quantitat de

8-isoprostà traçador i inversament proporcional a la quantitat de 8-isoprostà lliure de la mostra.

- **Detecció de diens conjugats per HPLC mesurant l'absorbància a 234 nm.**

Mètode explicat a l'apartat MM-1.4.1.1, pàg 86, en la determinació de subclasses de fosfolípids.

#### 1.4.4. DETERMINACIÓ DEL GRAU D'AGREGACIÓ

El grau d'agregació de les partícules d'LDL es va determinar per diversos mètodes que s'enumeren a continuació:

- **Absorbància a 450 nm.** Mesurar l'absorbància de la mostra a 450 o 680 nm, ja que a aquestes longituds d'ona es detecta un augment de la dispersió de la llum provocada pels agregats presents a la mostra (Pentikainen, Lehtonen et al. 1996; Oorni, Posio et al. 2005).
- **Precipitació d'LDL agregades.** Centrifugar la mostra a 15.000 g durant 10 min, en aquest pas les LDL que estan agregades precipitaran. A continuació, quantificar les LDL que no han precipitat mesurant l'apoB o el colesterol del sobrenedant (Pentikainen, Lehtonen et al. 1996).
- **Electroforesi en gel en gradient d'acrilamida (GGE).** En aquesta electroforesi les partícules corren en funció de la seva mida i per tant, es poden visualitzar els agregats de partícules com a bandes de major mida. El procediment metodològic s'ha detallat a l'apartat MM-1.4.2.3, pàg 88.
- **Microscopia electrònica de transmissió.** El microscopi electrònic de transmissió ens permet observar les partícules d'LDL, la seva grandària i el seu grau d'agregació. Es va seguir el procediment de Forte et al. (Forte and Nichols 1972). Les preparacions d'LDL es van tenyir negativament amb fosfotungstat de potassi (2 %, pH 7,0) sobre una reixeta de coure. Les mostres tenyides es van observar i fotografiar en un microscopi electrònic de transmissió JEOL JEM-1200EX (Institute for Biotechnology, Helsinki University, Finlàndia). Les micrografies electròniques originals van ser realitzades a 60.000 augments.

#### **1.4.5. DETERMINACIÓ DE L'ESTRUCTURA SECUNDÀRIA DE L'APOB: DICROÏSME CIRCULAR**

El mètode del dicroïsme circular permet, mitjançant la llum polaritzada, predir el contingut d'estructura secundària d'una proteïna.

Es van realitzar espectres de dicroïsme circular de l'ultraviolat llunyà en un espectropolarímetre JASCO J-715, tal com està descrit (Benitez, Villegas et al. 2004). Les mostres analitzades van ser LDL en PBS a una concentració de 0,05 g proteïna/L que es van col·locar en cubetes de quars de 0,2 mm a 25°C. De cada mostra es van mesurar 20 espectres i se'n va calcular la mitjana després de sostreure el valor del blanc. Els espectres van ser desconvolucionats per poder calcular la contribució relativa de les diferents estructures secundàries (hèlix  $\alpha$ , fulla  $\beta$ , gir  $\beta$  o estructura aleatòria), mitjançant els programes d'anàlisi K2D i CDSSTR del servidor DICHROWEB (Birkbeck University, Londres) (Lobley, Whitmore et al. 2002; Whitmore and Wallace 2004).

## **2. CULTIUS CEL·LULARS**

### **2.1. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES**

#### **2.1.1. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES ENDOTELIALS VENOSSES**

Es van obtenir cèl·lules endotelials a partir de vena de cordó umbilical humà (HUVEC) mitjançant el mètode de perfusió amb col·lagenasa descrit per López et al. (Lopez, Vila et al. 1993).

Procediment:

- Acondicionar prèviament flascons de 25 cm<sup>2</sup> amb 2,5 mL de gelatina (2 % en aigua i autoclavada) cobrint la superfície del flascó durant 1 hora. Abans d'afegir-hi les cèl·lules, descartar l'excés de gelatina per decantació.
- La recollida i manipulació del cordó umbilical s'ha de fer en condicions d'esterilitat. Es processarà el cordó umbilical el mateix dia del part o el dia següent conservat a 4°C.
- Neteja de la vena del cordó umbilical. El cordó umbilical presenta dues artèries i una vena que és més ample i de la qual s'aïllaran les cèl·lules endotelials venoses. Es fa passar PBS per l'interior de la vena mitjançant una xeringa per tal de netejar-la bé de sang i de coàguls.
- Aïllament de les cèl·lules amb la col·lagenasa. La col·lagenasa permet desenganxar les cèl·lules endotelials del cordó. Per aplicar la solució de col·lagenasa (0,025 % en PBS, concentració que pot variar segons l'activitat de l'enzim) s'ha de pinçar el cordó per un extrem, introduir la solució per la vena i bloquejar l'altre extrem del cordó també pinçant-lo. S'incuba amb l'enzim durant 10 min a 37°C a l'incubador de CO<sub>2</sub>.
- Recollida de les cèl·lules endotelials. S'allibera els extrems del cordó i es recull el contingut, que conté la suspensió cel·lular, en un tub. A continuació es fa passar medi de cultiu 199 per dins la vena amb una xeringa i també es recull el contingut.
- Centrifugació dels tubs a 250 g durant 10 min. S'elimina el sobrenedant, mentre que el pèl·let, on s'hi troben les cèl·lules, es resuspèn en medi de cultiu 199 i s'aboca als flascons que havien estat acondicionats amb gelatina.
- Al cap de 2 hores, quan les cèl·lules s'han adherit a la superfície del flascó, es realitza un canvi de medi, afegint medi complet 199. El contingut del medi es detalla a l'apartat MM-2.2.1, pàg 96.

Per confirmar la puresa en cèl·lules endotelials dels cultius es realitzen les tincions específiques, mitjançant immunohistoquímica, de cèl·lules endotelials del factor von Willebrand i de VE-caderina, i, per altra banda, la tinció específica d'SMC d' $\alpha$ -actina.

A la figura 9A es pot veure una imatge de les cèl·lules HUVEC al cap d'un dia del seu aïllament.

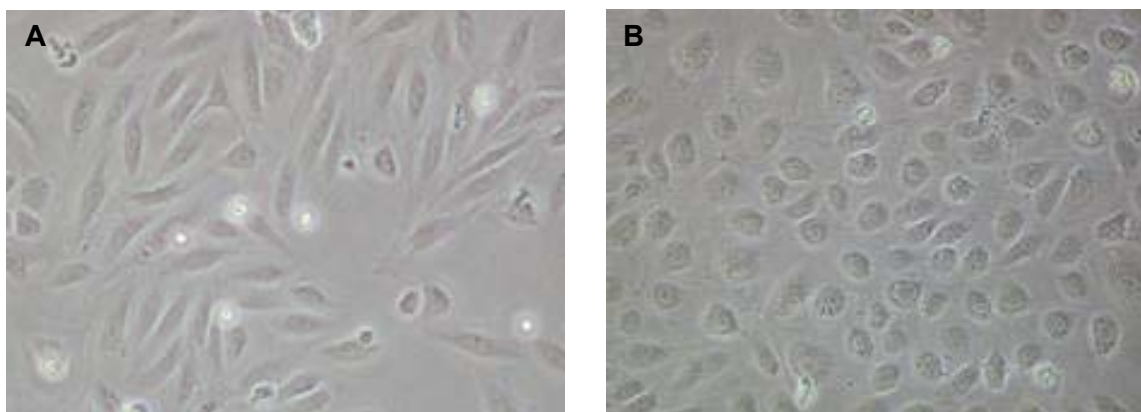
### 2.1.2. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES ENDOTELIALS ARTERIALS

Les cèl·lules endotelials d'artèria de cordó umbilical humà (HUAEC) es van aïllar seguint el mateix procediment descrit per les HUVEC amb alguns petits canvis.

Les HUAEC s'obtenen de les dues artèries del cordó umbilical que s'observen com a vasos més estrets que la vena, però de parets més gruixudes. Per tal de processar les artèries, al tractar-se de vasos molt estrets i estar cargolats, s'han d'anar tallant fragments del cordó i cal utilitzar una xeringa amb punta arrodonida per aplicar-hi les solucions. El medi de cultiu usat en aquestes cèl·lules és medi EGM-2 (Clonetics) complet, que la seva composició s'especifica a l'apartat MM-2.2.1, pàg 96.

A la Figura 9 es poden veure els dos models de cèl·lules endotelials utilitzats.

Figura 9. Cèl·lules endotelials de vena (HUVEC) (A) i d'artèria (HUAEC) (B) humana. Microscòpia òptica (40 augments).



### 2.1.3. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES MONONUCLEARS DE SANG

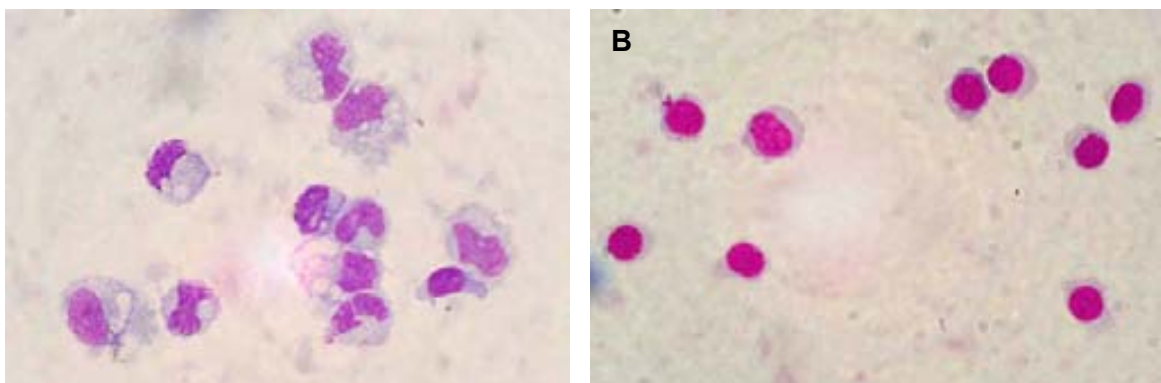
També es va treballar amb cultius primaris de cèl·lules mononuclears humanes, que comprenen monòcits i limfòcits. Les cèl·lules mononuclears van ser aïllades de sang perifèrica obtinguda amb el consentiment dels donants. Es va utilitzar el mètode d'aïllament estàndard de monòcits i limfòcits (Boyum 1968) que es basa en les diferències de densitat que presenten les cèl·lules sanguínies (eritròcits: 1,090 Kg/L, cèl·lules polimorfonuclears: 1,080 Kg/L, cèl·lules mononuclears: 1,070 Kg/L). Per la separació de les cèl·lules mononuclears s'utilitza la centrifugació en un gradient de densitat de 1,077 Kg/L (LinfoSep (Biomedics); és una solució formada per diatrizoat sòdic i polisacarosa) i es recull la banda de cèl·lules que queda immediatament per sobre del gradient.



## Procediment:

- Es parteix de sang perifèrica recollida en tubs amb anticoagulant (EDTA) i es processa aviat en condicions d'esterilitat.
- Concentració de la mostra. Centrifugació de la sang a 800 g durant 10 min. S'obté un anell de leucòcits a la interfase, entre el plasma i la resta de cèl·lules. S'extreu el plasma i es recull la capa blanca de leucòcits.
- Separació de les cèl·lules mononuclears. En un tub amb aproximadament 4 mL de Linfosep s'hi sobreposen acuradament 6 mL de la sang rica en leucòcits obtinguda en el pas anterior, evitant que es mesclin les dues fases. Es centrifuguen els tubs a 800 g durant 20 min.
- Després de la centrifugació les cèl·lules mononuclears formen una banda clarament diferenciada a la interfase entre el Linfosep i el plasma. Amb molta cura, es recull la suspensió cel·lular.
- Rentats. Es fan dos rentats successius d'aquestes cèl·lules amb PBS a 250 g durant 10 min per tal d'eliminar la solució de Linfosep, que és lleugerament citotòxica. En l'últim pas el pèl·let es resuspèn en el medi de cultiu RPMI complet (apartat MM-2.2.1, pàg 96).
- Preparació de les plaques de cultiu. Es compten les cèl·lules en cambra de Neubauer i es reparteix el nombre adient de cèl·lules segons l'experiment a les plaques de cultiu on es durà a terme l'assaig.
- Separació de monòcits i limfòcits en base a la capacitat adhesiva dels monòcits. Al cap de 4 hores de la preparació de les plaques de cultiu els monòcits s'hauran adherit a la superfície del pou i, en canvi, els limfòcits no. Aleshores es pot realitzar la separació dels limfòcits retirant el sobrenedant i sembrant-los en noves plaques de cultiu. Als monòcits se'ls afageix medi RPMI complet. Es va comprovar la correcta separació de limfòcits i monòcits realitzant la tinció May Grünwald/Giemsa (Figura 10) i per citometria de flux. L'anàlisi per citometria de flux es va fer amb un aparell FACScalibur amb 2 lasers (Becton Dickinson) i amb una combinació de 4 marcadors.

Figura 10. Monòcits (A) i limfòcits (B) un cop separats segons l'adhesivitat dels monòcits. Microscòpia òptica (200 augments), tinció cel·lular May Grünwald/Giemsa.



## 2.2. MANTENIMENT DELS CULTIUS CEL·LULARS

Tots els tipus cel·lulars es van cultivar mantenint-los a una temperatura de 37°C, en atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> i amb una humitat del 100 %. Les cèl·lules endotelials es van mantenir en flascons estèrils de cultiu abans dels experiments, en canvi, les cèl·lules mononuclears ja es van sembrar en les plaques de cultiu on tindrien lloc els experiments. El creixement i estat dels cultius es van seguir per microscòpia òptica.

### 2.2.1. MEDIS DE CULTIU

Pel manteniment de les cèl·lules, els diferents models cel·lulars requereixen un medi de cultiu base suplementat amb determinats components (medi complet) que s'indiquen a continuació. Si s'han de mantenir les cèl·lules al llarg del temps, es realitzen canvis de medi cada 2-3 dies fent un rentat amb PBS i afegint medi nou.

<b>HUVEC:</b>	<b>HUAEC:</b>	<b>Cèl·lules mononuclears:</b>
<u>Medi 199 complet</u>	<u>Medi EGM-2 complet</u>	<u>Medi RPMI complet</u>
Medi base199 (Biowhittaker)	Medi base EGM-2 (Clonetics)	Medi base RPMI 1640 (Biowhittaker)
SBF <sup>‡</sup> 20 %	SBF 2 %	SBF 10 %
antibiotics:	antibiotics:	antibiotics:
penicil·lina 0,1 UI/L	gentamicina *	penicil·lina 0,1 UI /L
estreptomycina 100 mg/L	amfotericina *	estreptomycina 100 mg/L
glutamina 2 mM	glutamina 2 mM	glutamina 2 mM
HEPES 20 mM	VEGF *	piruvat sòdic 1 mM
heparina 10.000 USP/L	FGF-2 *	
ECGS # 30 mg/L	EGF *	
	<i>insulin-like GF *</i>	
	hidrocortisona *	
	àcid ascorbic *	

<sup>‡</sup> SBF: sèrum boví fetal

# ECGS: suplement de creixement de cèl·lules endotelials

\* Aquests components formen part d'un suplement del medi de cultiu (EGM-2-MV Bullekit, Clonetics) en el que no es descriuen les concentracions.

En el cas de les cèl·lules mononuclears es van dur a terme els experiments l'endemà de la seva extracció. En canvi, les cèl·lules endotelials es van mantenir al llarg del temps. Per això, es van realitzar canvis de medi cada 2-3 dies fent un rentat amb PBS i afegint medi nou. També, en arribar a la confluència, es van subcultivar en una relació 1:3, com a màxim, semblant a una densitat alta (10.000-20.000 cel·lules/cm<sup>2</sup>). Per tal de desenganxar les cèl·lules s'usa una solució de tripsina i EDTA (tripsina 0,025 %, EDTA 1mM).

Per altra banda, en el moment de l'experiment d'incubació amb LDL, les cèl·lules es van cultivar en el medi base adient amb antibiòtic i amb un baix contingut en sèrum boví fetal (1 % SBF) per evitar una aportació externa de lipoproteïnes (medi deficient). Els medis base utilitzats van ser: medi 199 per les cèl·lules endotelials i medi RPMI per les mononuclears.

### **2.2.2. DETERMINACIÓ DE LA VIABILITAT CEL·LULAR**

La determinació de la viabilitat es va realitzar mitjançant dos mètodes: tinció amb bromur d'etidi/taronja d'acridina (BE/TA) i valorant la lactat deshidrogenasa (LDH) alliberada al medi.

#### **▪ Tinció amb bromur d'etidi/taronja d'acridina**

Els colorants fluorescents bromur d'etidi (BE) i taronja d'acridina (TA) reconeixen específicament cèl·lules mortes i cèl·lules vives. El TA entra dins les cèl·lules vives per transport actiu tenyint de color verd el DNA de doble cadena, en canvi, el BE traspasa la membrana plasmàtica de les cèl·lules mortes per transport passiu tenyint el material genètic de color vermell.

El procediment consisteix en barrejar un volum de suspensió cel·lular amb un volum de la solució de BE/TA (0,001 % BE - 0,0005 % TA en PBS), observar la preparació al microscopi òptic de fluorescència, sota llum ultraviolada, i realitzar el recompte cel·lular.

#### **▪ Determinació de la lactat deshidrogenasa**

L'enzim lactat deshidrogenasa (LDH), que es troba al citoplasma de les cèl·lules, és alliberat quan hi ha hagut mort cel·lular. Per tant, un increment d'LDH al medi indica mortalitat cel·lular.

Es va determinar l'activitat enzimàtica LDH amb un mètode comercial (Roche Diagnostics) de reaccions enzimàtiques que acaben formant un producte (*formazan*) que absorbeix a 500 nm. Com a control positiu de mort cel·lular es van lisar les cèl·lules amb tritó X-100. El procediment es va seguir segons les instruccions del fabricant.

## **2.3. EXPERIMENTS AMB CULTIUS CEL·LULARS**

### **2.3.1. TIPUS D'EXPERIMENTS REALITZATS**

Es van realitzar diferents tipus d'experiments amb cultius cel·lulars que s'exposen tot seguit. La major part dels assajos van consistir en incubar les fraccions d'LDL o altres compostos amb les cèl·lules i determinar els mediadors inflamatoris alliberats i/o expressats que van ser fonamentalment citoquines. En un altre tipus d'experiment es va valorar l'associació de les LDL a les cèl·lules.

#### **EXPERIMENTS D'EXPRESSIÓ DE CITOQUINES:**

- **Experiments d'incubació amb LDL i determinació de citoquines.** Es van realitzar assajos en els diferents models cel·lulars incubant les cèl·lules amb les fraccions d'LDL i valorant la inducció de mediadors inflamatoris. L'alliberament de citoquines es va determinar en els sobredants cel·lulars, en primer lloc, mitjançant un sistema d'*arrays* de proteïnes i, en segon lloc, per ELISA.
- **Experiments d'incubació amb LDL i determinació de la transcripció d'RNA.** En alguns casos, en les cèl·lules mononuclears, es va valorar mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR) la producció de RNA que codifica per citoquines induïda per les fraccions d'LDL.
- **Cinètiques d'alliberament de citoquines.** Es van dur a terme amb les cèl·lules HUVEC i les cèl·lules mononuclears. Es van recollir sobredants cel·lulars a diferents temps d'incubació amb les fraccions d'LDL i es van valorar les citoquines alliberades per ELISA.
- **Experiments d'incubació amb altres citoquines.** Les cèl·lules HUVEC van ser incubades amb les citoquines IL-6, IL-8, MCP-1 i GM-CSF amb l'objectiu de conèixer si podien induir l'alliberament d'altres citoquines, i amb l'anticòs anti-receptor de IL-6 per veure si bloquejant la entrada de IL-6 s'inhibia el possible efecte de citoquina de primera onada induït per la IL-6. Els assajos van ser valorats per ELISA.
- **Experiments de l'efecte modulador de la IL-10.** Es van realitzar amb les cèl·lules mononuclears incubant-les amb IL-10, anticòs anti-IL-10 o anticòs anti-receptor de IL-10 i valorant l'expressió de citoquines per ELISA i RT-PCR.

## EXPERIMENT D'ASSOCIACIÓ D'LDL A CÈL·LULES:

- **Experiment d'associació de les fraccions d'LDL a les cèl·lules.** Aquest assaig es va realitzar en cèl·lules HUVEC i consisteix en valorar l'associació de l'LDL(+) i l'LDL(-), marcades fluorescentment, a les cèl·lules amb l'objectiu de saber si les fraccions d'LDL són captades diferencialment per les cèl·lules.

### 2.3.2. PROCEDIMENTS PREVIS A LA INCUBACIÓ

En el cas de les cèl·lules HUVEC es van dur a terme els experiments en els passos 1-2 i en les HUAEC, en els passos 2-4. En ambdós casos es van sembrar  $10^5$  cel/mL ( $\sim 10^4$  cel/cm<sup>2</sup>) en plaques de 6 pous i un cop les cèl·lules van ser confluents es va realitzar l'experiment.

D'altra banda, en les cèl·lules mononuclears, es van sembrar les cèl·lules just després de la seva obtenció, es van separar en monòcits i limfòcits, i es van realitzar els experiments a les 24 hores de la seva obtenció. Els experiments de l'*array* de proteïnes i d'ELISA es van realitzar en plaques de cultiu de 12 pous amb una concentració de  $10^6$  cèl·lules/mL ( $\sim 3 \cdot 10^5$  cèl·lules/cm<sup>2</sup>) i els estudis d'RT-PCR en plaques de 6 pous amb  $3 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL ( $\sim 3 \cdot 10^5$  cèl·lules/cm<sup>2</sup>).

En el moment de l'experiment, les cèl·lules que han estat mantingudes en medi complet es passen a cultivar amb medi deficient en lipoproteïnes. Aquest medi deficient presenta només un 1 % de SBF per minimitzar les possibles interferències de les lipoproteïnes bovines presents en el SBF amb les LDL que afegim a les cèl·lules.

Abans d'incubar amb les cèl·lules, les mostres d'LDL es van dialitzar per gel filtració (en columnes Sepharose G25M, Amersham Pharmacia) amb el medi de cultiu base idoni (apartat MM-2.2.1, pàg 96) i es va mesurar la concentració de la mostra. En el cas d'altres mostres de components més concentrats es van aplicar directament a les cèl·lules en condicions d'esterilitat.

### 2.3.3. EXPERIMENTS D'EXPRESSIONI DE CITOQUINES

Per cada experiment es van incubar les cèl·lules amb diferents compostos per dur a terme les següents condicions experimentals:

- control negatiu (blanc, producció cel·lular basal) → cèl·lules sense estímul
- control positiu → cèl·lules endotelials: IL1 $\beta$  a 10-20  $\mu$ g/L  
cèl·lules mononuclears: lipopolisacàrid (LPS) a 0,1 mg/L
- fraccions d'LDL → LDL(+)/LDL(-) a 150 mg apoB/L

En alguns casos es van utilitzar altres compostos:

- IL-6 a 1, 10 i 100 KIU/L
- MCP-1, IL-8 o GM-CSF a 1, 10 i 100  $\mu$ g/L
- anticòs monoclonal anti-receptor de IL-6 a 1 i 10 mg/L (clon UV4)
- IL-10 a 2, 5 i 10  $\mu$ g/L
- anticòs policlonal anti-IL-10 a 5 i 15 mg/L (Peprotech)
- anticòs monoclonal anti-receptor  $\alpha$  de IL-10 a 5 i 15 mg/L (clon 37607.11)
- actinomicina D a 1 mg/L (inhibidor de la transcripció)
- polimixina B a 50 mg/L (inhibidor d'LPS)

Tots els productes utilitzats eren de la marca Sigma i en el cas contrari està indicat.

Les fraccions d'LDL i els altres compostos usats van ser filtrats per 0,22  $\mu$ m i afegits a les cèl·lules en esterilitat. Les incubacions van tenir lloc durant 4 i/o 24 hores a 37°C. Al finalitzar, es va recollir el sobrenedant cel·lular de cada pou amb l'objectiu d'avaluar les citoquines alliberades per les cèl·lules. En els experiments de RNA, també es van recuperar les cèl·lules per poder realitzar l'extracció de RNA, gratant la superfície del pou amb l'ajut d'un rascador (*cell scrapper*). En ambdós casos es centrifugen els sobrenedants cel·lulars obtenint-se el sobrenedant lliure de restes cel·lulars i les cèl·lules que en el cas que es vulgui extreure l'RNA seran rentades amb PBS i amb aigua amb dietilpirocarbonat (aigua-DEPC). Tant els sobrenedants com les cèl·lules es van emmagatzemar congelats a -80°C fins al moment del seu processament i/o valoració.

### 2.3.4. EXPERIMENT D'ASSOCIACIÓ D'LDL A LES CÈL·LULES

Es van realitzar assajos d'associació de les fraccions d'LDL a les cèl·lules HUVEC marcant les fraccions d'LDL amb el compost fluorescent dioctadecil-indocarbocianina perclorat (Dil, Molecular probes).

Procediment:

- Marcatge fluorescent d'LDL segons el mètode d'Stephan i Yurachek (Stephan and Yurachek 1993):
  - Incubació d'LDL (en tampó A) amb Dil (30 g/L en DMSO) a una relació de 300 mg Dil/g apoB durant 18 hores a 37°C en agitació suau.
  - Concentració de la mostra mitjançant ultracentrifugació a 100.000 g durant 5 hores a 4°C.
  - Es filtra la mostra amb un filtre de 0,22 µm per eliminar els agregats.
  - Diàlisi de la mostra en tampó A en sac de diàlisi.
  - Abans de l'experiment es filtra la mostra de nou.
- Experiment d'associació de les LDL a les cèl·lules:
  - Incubació de les cèl·lules HUVEC, cultivades en les mateixes condicions que s'han descrit anteriorment, amb 25 o 150 mg apoB/L de les fraccions d'LDL marcades amb Dil durant 24 hores a 37°C. En alguns pous, es van incubar les cèl·lules amb 25 mg apoB/L i es va afegir un excés de 10 cops d'LDL no marcada per determinar l'associació no específica.
  - Després de la incubació, es renten els pous amb PBS-albúmina (2 g/L) i amb PBS sol.
  - Solubilització dels lípids amb 1 mL isopropanol/pou en agitació durant 15 min.
  - Centrifugació del contingut dels pous 15 min a 1800 g, per eliminar agregats.
  - Mesura de la fluorescència ( $\lambda$  excitació: 520 nm;  $\lambda$  emissió: 578 nm). Es quantifica la fluorescència incorporada a les cèl·lules i es resta l'associació no específica de l'associació total.

### 3. DETERMINACIÓ DE LA PRODUCCIÓ CEL·LULAR DE CITOQUINES

#### 3.1. ANÀLISI DE LA SECRECIÓ DE CITOQUINES

##### 3.1.1. ARRAY DE CITOQUINES

En els sobredants cel·lulars es va valorar la producció de 42 mediadors inflamatoris relacionats amb l'aterosclerosi mitjançant el sistema de detecció simultània *RayBio™ Human Cytokine Array III* (Ray Biotech). Aquest mètode és un assaig immuno-enzimàtic amb una membrana com a suport. La membrana conté els anticossos per reconèixer 42 citoquines diferents repartits en l'espai (Taula 6 i 7). La detecció final és per quimioluminescència.

Taula 6. Distribució de les diferents molècules que detecta l'array de citoquines humanes III (Ray Biotech).

Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	G-CSF	GM-CSF	GRO	GRO $\alpha$	I-309	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$
Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	G-CSF	GM-CSF	GRO	GRO $\alpha$	I-309	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-15	IFN $\gamma$
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-15	IFN $\gamma$
MCP-1	MCP-2	MCP-3	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1 $\delta$	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- $\beta$ 1
MCP-1	MCP-2	MCP-3	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1 $\delta$	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	TNF- $\beta$	EGF	IGF-1	Ang	OSM	Tpo	VEGF	PDGF B	Leptin	Neg	Pos
TNF- $\alpha$	TNF- $\beta$	EGF	IGF-1	Ang	OSM	Tpo	VEGF	PDGF B	Leptin	Neg	Pos

Taula 7. Sensibilitat de l'array de citoquines humanes III (Ray Biotech) per les diferents proteïnes i nom complet d'aquestes.

Citoquina	Nom complet	Sensibilitat (pg/mL)
Ang	angiogenina .....	10
EGF	factor de creixement epidèrmic .....	1
ENA-78	proteïna activadora de neutròfils epitelials 78 .....	1
G-CSF	factor estimulant de colònies de granulòcits .....	2000
GM-CSF	factor estimulant de colònies de granulòcits i monòcits .....	100
GRO	oncogen relacionat amb el creixement .....	$\alpha$ $\beta$ -1000, $\gamma$ -1
GRO $\alpha$	oncogen relacionat amb el creixement alfa .....	1000
I-309	I-309 .....	1000
IFN $\gamma$	interferó gamma .....	100
IGF-1	factor de creixement semblant a l'insulina 1 .....	10
IL-1 $\alpha$	interleuquina 1 alfa .....	1000
IL-1 $\beta$	interleuquina 1 beta .....	100



IL-2	interleuquina 2 .....	25
IL-3	interleuquina 3 .....	100
IL-4	interleuquina 4 .....	1
IL-5	interleuquina 5 .....	1
IL-6	interleuquina 6 .....	1
IL-7	interleuquina 7 .....	100
IL-8	interleuquina 8 .....	1
IL-10	interleuquina 10 .....	10
IL-12	interleuquina 12 .....	1
IL-13	interleuquina 13 .....	100
IL-15	interleuquina 15 .....	100
Leptin	leptina .....	100
MCP-1	proteïna quimiotàctica de monòcits 1 .....	3
MCP-2	proteïna quimiotàctica de monòcits 2 .....	100
MCP-3	proteïna quimiotàctica de monòcits 3 .....	1000
M-CSF	factor estimulant de colònies de monòcits-macròfags .....	1
MDC	quimioquina derivada de macròfags .....	1000
MIG	monoquina induïda per l'interferó gamma .....	1
MIP-1 $\delta$	proteïna inflammatòria de macròfags 1 delta .....	100
OSM	oncoestatina M .....	100
PDGF-B	factor de creixement derivat de plaquetes B .....	1000
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i> .....	2000
SCF	factor de cèl·lules mare .....	10
SDF-1	factor derivat de cèl·lules de l'estroma .....	2000
TARC	quimioquina regulada i activada del timus .....	100
TGF- $\beta$ 1	factor transformador del creixement-beta .....	200
TNF- $\alpha$	factor de necrosi tumoral alfa .....	-
TNF- $\beta$	factor de necrosi tumoral beta .....	1000
TPO	trombopoietina.....	100
VEGF	factor de creixement de l'endoteli vascular .....	100

Abans de dur a terme l'assaig amb l'*array* de citoquines humanes, es van valorar pel mètode d'ELISA (apartat MM-3.1.2, pàg 105) els sobrenedants d'alguns experiments per tal d'assegurar que havien produït inducció de citoquines. Es van valorar les quimioquines IL-8 i MCP-1 perquè es coneix que són alliberades per les cèl·lules endotelials i mononuclears en resposta a diferents estímuls (Terkeltaub, Banka et al. 1994; De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000; Osterud and Bjorklid 2003).

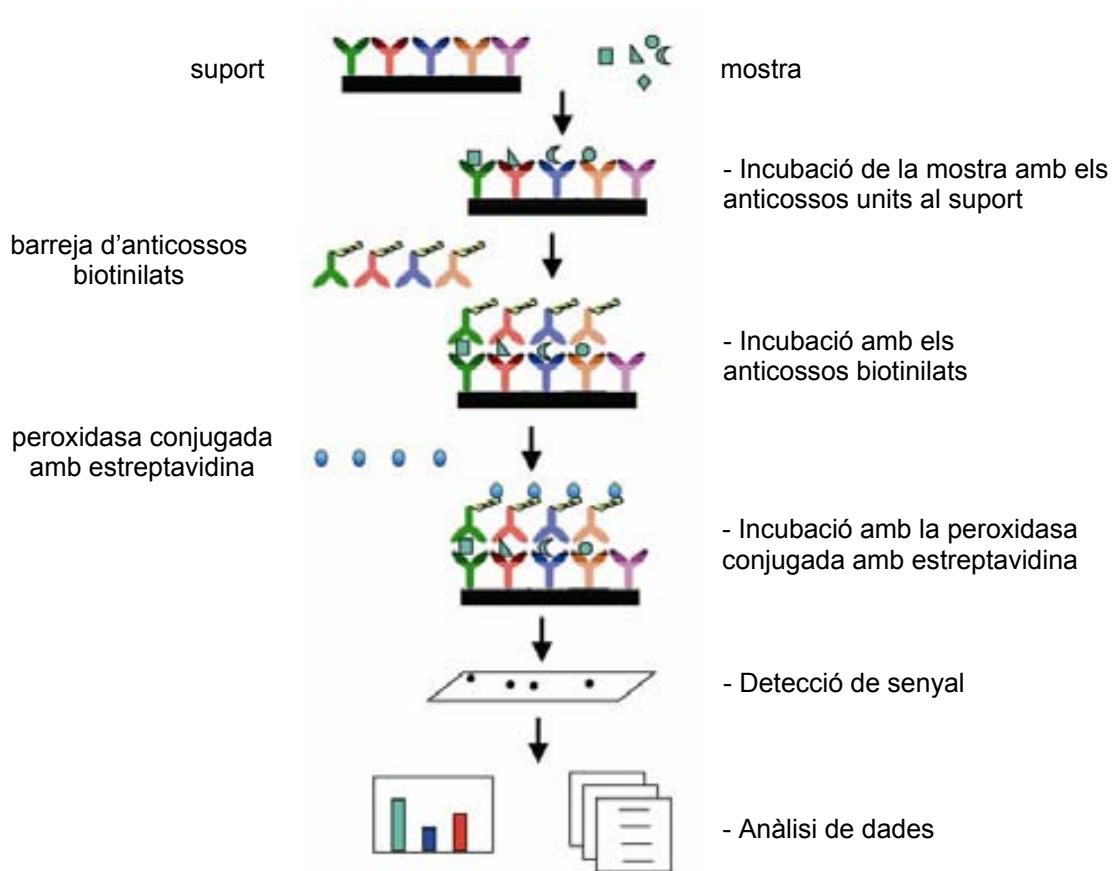
Per cada experiment es van utilitzar 4 membranes, una per cada condició experimental: LDL(+), LDL(-), control negatiu (producció cel·lular basal) i control positiu (IL-1 $\beta$  o LPS). Es va seguir el procediment recomanat pel fabricant en què les incubacions es fan a temperatura ambient i en agitació (Figura 11).

## Material i mètodes

### Procediment :

- Bloquejar les membranes amb tampó de bloqueig durant 30 min.
- Incubar cada membrana amb 1 mL del sobrenedant cel·lular concret, sense diluir, durant 1 hora i 30 min.
- Rentar les membranes amb 2 tampons de rentat diferents.
- Incubar amb la barreja d'anticossos conjugats amb biotina durant 1 hora i 30 min.
- Rentar i afegir la peroxidasa, deixar incubar durant tota la nit a 4°C.
- Rentar i afegir el substrat quimioluminescent. Detectar els senyals amb un detector de quimioluminescència (densitòmetre Chemi Doc, Bio-Rad).

Figura 11. Esquema del procediment de l'array de proteïnes.



### 3.1.2. QUANTIFICACIÓ DE CITOQUINES MITJANÇANT ELISA

Les molècules que pel mètode d'array de citoquines humanes van ser induïdes per les cèl·lules en resposta a l'estímul de l'LDL(-) es van valorar per kits ELISA per tal de confirmar i quantificar els resultats.

Per mesurar IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1 i GM-CSF es van utilitzar ELISA comercials (*Module Set antibody pairs*, Bender MedSystems), per GRO $\alpha$  i PDGF-B també ELISA comercials (R&D). En canvi, la valoració de GRO $\beta$  i GRO $\gamma$  es va avaluar mitjançant proteïnes estàndard recombinants, anticossos policlonals sense marcar i policlonals biotinitats (PeproTech) i peroxidasa conjugada amb estreptavidina (Sigma) seguint un protocol estàndard d'ELISA. Es va seguir el procediment descrit per els fabricants o un procediment general d'assaig d'ELISA.

Les mostres de sobrenedants abans d'afegir a l'ELISA es van diluir perquè entressin a dins del rang de sensibilitat de l'assaig. Es van fer diferents dilucions amb medi deficient segons les citoquines (Taula 8). En el cas del control positiu IL-1 $\beta$  el sobrenedant va ser diluït 10 cops més que les altres condicions experimentals.

Taula 8. Dilucions utilitzades en les mostres valorades per ELISA en els diferents models cel·lulars.

	HUVEC	HUAEC	Cèl·lules mononuclears
MCP-1	1/100	1/100	1/6
IL-6	1/30	1/30	1/10
IL-8	1/100	1/100	1/6
IL-10	-	-	1/8
GRO $\alpha$	-	1/5	-
GRO $\beta$	1/5	1/100	1/40
GRO $\gamma$	1/5	1/100	1/40
GM-CSF	1/5	1/5	sense diluir
PDGF-B	-	1/20	-

Procediment general:

- Preparació de les plaques:
  - Incubar l'anticòs primari de revestiment en plaques de 96 pous tota la nit a 4°C.
  - Realitzar 3 rentats amb tampó de rentat (PBS amb tween-20 0,005 %)
  - Bloquejar amb tampó d'assaig (PBS, tween-20 0,005 %, albúmina de sèrum boví (BSA) 0,5 %) durant la nit a 4°C. Abans de carregar les mostres tornar a rentar.
- Assaig. El temps d'incubació varia depenent de la molècula a valorar, es van seguir les instruccions del fabricant. Es realitzen rentats entre els diferents passos. Tot el procediment es du a terme a temperatura ambient.
  - Incubar cada pou amb la mostra prèviament diluïda (Taula 8).

- Incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb biotina
- Incubar amb la peroxidasa conjugada amb estreptavidina.
- Afegir el substrat cromogènic TMB (tetrametilbenzidina, Calbiochem) i esperar fins a la detecció de color.
- Aturar la reacció amb una solució àcida (àcid fosfòric 1 M o àcid sulfúric 4 N).
- Mesurar l'absorbància a 450 nm.
- Calcular els valors de les diferents citoquines interpolant les absorbàncies obtingudes en els valors de la recta patró d'estàndard i corregint per la dilució.

### **3.2. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE CITOQUINES**

L'estudi de l'expressió dels nivells de mRNA dels gens que codifiquen per les citoquines d'interès es va portar a terme per la tècnica de retrotranscripció de l'RNA total i la posterior amplificació selectiva del fragment de la còpia complementària de DNA del gen d'interès mitjançant RT-PCR.

#### **3.2.1. EXTRACCIÓ D'RNA**

L'extracció d'RNA es va realitzar a partir de  $3 \cdot 10^6$  cèl·lules cultivades en plaques de 6 pous per cada condició. Després de la incubació de les cèl·lules amb les fraccions d'LDL o altres compostos es va rascar la superfície dels pous i es van recollir els sobrenedants i les cèl·lules en condicions d'esterilitat i lliure d'RNAses. Els pèl·lets cel·lulars es van rentar 2 cops amb PBS i aigua, i es van guardar congelats a  $-80^{\circ}\text{C}$  fins al moment de l'extracció d'RNA.

Per a l'extracció d'RNA es va utilitzar l'assaig comercial *Qiagen extraction kit RNAeasy minikit* (Qiagen) que utilitza columnes. L'assaig consisteix en un pas previ de digestió amb DNAses, seguit de l'homogenització de la mostra i l'aplicació a les columnes subministrades. Es fan un seguit de rentats amb etanol 70 % i amb diferents solvents proporcionats pel fabricant i s'acaba eluint l'RNA amb aigua-DEPC.

Es va determinar la concentració i puresa de l'RNA espectrofotomètricament amb les relacions següents:

- Concentració:  $1 \text{ UAbs}_{260} = 40 \mu\text{g/mL}$
- Puresa:  $\text{Abs}_{260} / \text{Abs}_{280}$  (1,8-2; indica que l'RNA és íntegre i no presenta contaminació de DNA o proteïna).

També es va comprovar la integritat de l'RNA per electroforesi en gels d'agarosa a l'1 %. Breument, es prepara el gel amb agarosa disolta en tampó TBE (Tris 90 mM, àcid boric 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). S'apliquen al gel les mostres d'RNA amb sacarosa. Es fa córrer l'electroforesi 40 min a 80 V. Es tenyeix el gel amb SYBR Safe (Molecular Probes) i s'observen les bandes d'RNA sota llum ultraviolada.

### 3.2.2. TRANSCRIPCIÓ REVERSA D'RNA

Mitjançant el procés de transcripció reversa a partir de l'RNA es va sintetitzar una cadena complementària de DNA (cDNA) mitjançant l'activitat transcriptasa reversa i emprant com a encebador oligonucleòtids de timina.

Procediment:

- Escalfar la barreja d'RNA total (1 µg) amb oligo(dt)<sub>15</sub> (0,5 µg; Promega) 5 min a 70°C i tot seguit refredar en gel. L'objectiu d'aquest pas és assegurar una unió eficient de l'encebador amb el mRNA.
- Retrotranscripció. Afegir la resta de components necessaris per la reacció i incubar durant 1 hora a 42°C.
  - 14 µL RNA + oligo (dT) (productes del pas anterior)
  - 5 µL tampó (Promega)
  - 1,25 µL dNTP (Sigma)
  - 3,75 µL aigua-PCR (Sigma)
  - 1 µL transcriptasa reversa *Moloney murine leukemia virus H* (Promega)
- Inactivar l'enzim escalfant a 70°C durant 15 min. Immediatament, refredar en gel i congelar la mostra de cDNA a -80°C.

### 3.2.3. ANÀLISI D'EXPRESSION D'RNA PER RT-PCR

L'anàlisi quantitatiu de mRNA dels gens escollits es va fer mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR) amb l'aparell AbiPrism 7000 (Applied Biosystems). La RT-PCR utilitza un marcatge fluorescent que permet fer el seguiment de l'amplificació del DNA obtenint-se una representació gràfica de la intensitat de la fluorescència a cadascun dels cicles de la reacció de PCR i podent conèixer el cicle a partir del qual s'inicia l'ampliació del DNA (cicle llindar, *cycle threshold*, Ct) que permet la quantificació.

Es van utilitzar sondes predissenyades (*assay-on-demand*, Applied Biosystems) dels gens seleccionats per ser estudiats. Es va usar com a control intern de l'assaig la β-actina humana (Applied Biosystems). Tots els gens es van valorar per duplicat.

## Material i mètodes

Barreja de reacció, per mostra:

- 1 µL cDNA (aproximadament 40 ng)
- 12,5 µL enzim *Taqman* (*Universal PCR Master Mix*, Applied Biosystems)
- 1,25 µL sonda (*assay-on-demand*, Applied Biosystems)
- 10,25 µL aigua-PCR (Sigma)

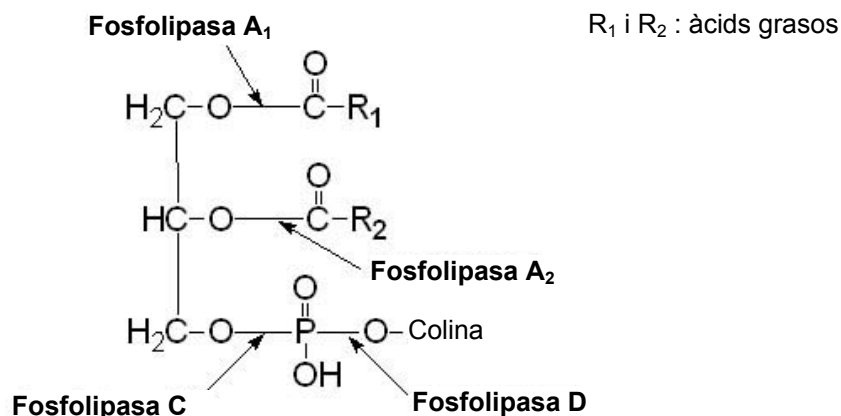
A partir dels gràfics de l'aparell s'obtenen els valors de Ct dels diferents gens. Un valor de Ct baix indica una amplificació més primerenca i un nombre de còpies de RNA inicials major. Es normalitzen els valors Ct de cada gen amb el valor Ct del gen constitutiu de la  $\beta$ -actina. Finalment, per calcular el nombre de còpies d'RNA inicials s'aplica la fórmula:

$$\text{nombre de còpies} = 2^{-Ct}$$

#### 4. DETERMINACIÓ D'ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

Els assajos d'activitats enzimàtiques que s'han realitzat són tots d'activitats de degradació de fosfolípids. A continuació, es mostra en l'esquema els diferents punts en els que es pot trencar un fosfolípid i l'activitat enzimàtica responsable (Figura 12).

Figura 12. Punts de tall de les activitats fosfolipolítiques sobre la fosfatidilcolina.

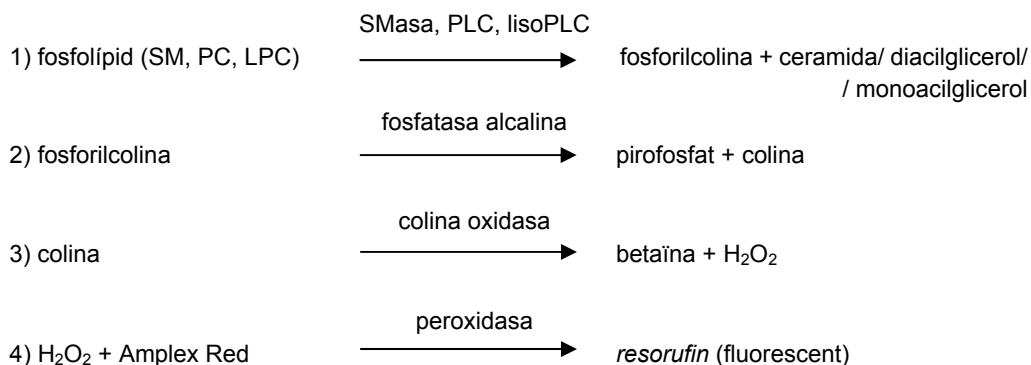


##### 4.1. ASSAIG FLUORIMÈTRIC D'ACTIVITATS FOSFOLIPOLÍTIQUES: SMASA, PLC I LISOPLC

És un assaig que detecta la formació de fosforilcolina. Per tant, pot detectar l'acció de diferents activitats enzimàtiques que degradin fosfolípids amb colina en la posició C (veure Figura 12), com l'activitat SMasa o PLC.

Es va adaptar l'assaig comercial *Amplex Red SMase assay kit* (Molecular Probes) segons les necessitats del nostre estudi. Es van utilitzar com a substrats: SM, PC o LPC, i en alguns casos directament LDL natives o modificades, que contenen aquests fosfolípids. Les mostres d'estudi avaluades, que podien contenir l'activitat enzimàtica, van ser les fraccions d'LDL (LDL(+)) i LDL(-)). Si les mostres tenen activitat fosfolipolítica, degraden el substrat produint fosforilcolina, que és detectada mitjançant diferents reaccions enzimàtiques acoblades que reaccionen amb el substrat Amplex Red i acaben produint un producte fluorescent. L'assaig consisteix en les reaccions enzimàtiques que s'exposen a continuació:

## Material i mètodes



### Procediment:

- Posar les mostres (100 µl d'LDL a 0,3 g/L) a una placa de fluorescència negra de 96 pous. Les mostres estaran prèviament dialitzades en el tampó d'assaig d'SMasa.

#### Tampó d'assaig SMasa

Tris-HCl 10 mM  
NaCl 140 mM  
MgCl<sub>2</sub> 10 mM  
pH 7,4

- Fer una recta patró amb SMasa de *Staphylococcus sp.*
- Afegir a tots els pous 100 µL de la barreja de reacció que conté el substrat, enzims i el reactiu d'Amplex Red.

#### Barreja de reacció:

<u>Concentració final per mostra</u>	<u>Volum i conc. a afegir a la barreja de reacció</u>
Substrat: SM/PC/LPC 0,5 mM	10 µL a 5 mM, en tritó X-100 2 %
fosfatasa alcalina 8 U/mL	2 µL a 400 U/mL
colina oxidasa 0,2 U/mL	1 µL a 20 U/mL
peroxidasa (HRP) 2 U/mL	1µL a 200 U/mL
Amplex Red 0,1 mM	1 µL a 10 mM, en DMSO
Tampó de la reacció: (Tris-HCl 85 mM, MgCl <sub>2</sub> 8,5 mM, pH 7,4)	85 µL (Tris-HCl 100 mM, MgCl <sub>2</sub> 10 mM, pH 7,4)

- Cinètica de reacció: mesurar la fluorescència ( $\lambda$  excitació: 530 nm;  $\lambda$  emissió: 590 nm) durant 3 hores a 37°C.
- Calcular l'activitat fosfolipolítica de cada mostra a partir de la pendent màxima de les cinètiques de reacció i extrapolant els valors a la recta patró de la SMasa de *Staphylococcus sp.* Els valors s'han expressat com a mU d'equivalents d'SMasa/mg apoB.

Adaptant l'assaig també es pot calcular l'activitat enzimàtica fosfolipasa D (PLD). Només cal treure de la barreja de la reacció la fosfatasa alcalina i llavors l'assaig permet detectar la formació de colina enlloc de fosforilcolina.



A més de mesurar les activitats fosfolipolítiques de diferents LDL, també es va determinar en altres lipoproteïnes, com la VLDL i l'HDL, i en l'enzim PAF-AH previament aïllat al laboratori com s'explica a continuació.

#### 4.1.1. AÏLLAMENT DE PAF-AH

L'enzim PAF-AH es va purificar a partir d'LDL total, realitzant dues cromatografies seqüencials. Per fer-ho, es va adaptar el protocol de Tew et al. (Tew, Southan et al. 1996).

Procediment:

- Solubilitzar 15 ml d'LDL total (a 1 g apoB/L) amb CHAPS 10 mM en agitació durant 30 min.
- Injectar la mostra en una columna HR30/5 (AmershamPharmacia) empaquetada amb *Blue Sepharose* (AmershamPharmacia) i prèviament equilibrada amb el tampó MES/CHAPS.
- S'elueixen les proteïnes de l'LDL amb tres tampons successius: tampó MES/CHAPS, tampó MOPS/CHAPS i tampó Tris/NaCl/CHAPS. Les fraccions amb activitat PAF-AH s'elueixen amb tampó Tris/NaCl/CHAPS.

<u>Tampó MES/CHAPS</u>	<u>Tampó MOPS/CHAPS</u>	<u>Tampó Tris/NaCl/CHAPS</u>
MES 50 mM	MOPS 50 mM	Tris 50 mM
NaCl 0,5 M	NaCl 0,5 M	NaCl 1,5 M
CHAPS 10 mM	CHAPS 10 mM	CHAPS 10 mM
pH 6,5	pH 7,5	pH 8,0

- S'ajunten les fraccions que contenen l'activitat PAF-AH (que es mesura segons el mètode de l'apartat MM-4.3, pàg 113), es concentren per ultrafiltració (10.000 MWCO, Amicon Ultra, Millipore) i es dialitzen amb tampó Tris/CHAPS \*(Tris 50 mM, CHAPS 10 mM, pH 8,0).
- Segon pas cromatogràfic de les fraccions amb activitat PAF-AH. S'utilitza una columna MonoQ HR5/5 (AmershamPharmacia) i s'elueix la mostra amb un gradient lineal de 0 a 1 M de NaCl en tampó Tris/CHAPS\*.
- S'ajunten les fraccions amb activitat PAF-AH, es concentren i es guarden a 4°C.

Per confirmar la puresa i especificitat de la PAF-AH aïllada es realitza una electroforesi en gel d'acrilamida en SDS (apartat MM-1.4.2.2, pàg 87) amb tinció de plata (*Silver Stain Plus*, Bio Rad) i Western blot, segons el descrit (Benitez, Sanchez-Quesada et al. 2003).

#### **4.2. ASSAIG DE L'ACTIVITAT SMASA AMB SUBSTRAT FLUORESCENT**

L'assaig d'activitat SMasa de les mostres amb SM marcada fluorescentment (boron-dipirrometà (BODIPY)-FL-C12-SM, Molecular Probes) és un assaig directe que, al no tenir reaccions enzimàtiques acoblades, permet evaluar diferents efectes, com el del pH i del  $Mg^{2+}$ , sobre l'activitat SMasa. Es va seguir el procediment descrit per Holopainen et al. (Holopainen, Medina et al. 2000).

Procediment:

- Incubació de les mostres (100  $\mu$ L LDL a 0,3 g/L) amb el substrat (SM-BODIPY, concentració final 0,025 mM, en tritó X-100 2 %) en el tampó adient, durant 3 hores a 37°C (volum final de la reacció: 200  $\mu$ L). S'usen diferents tampons segons la condició que es vulgui avaluar: a diferent pH i amb/sense  $Mg^{2+}$ .

Tampó neutre SM-BODIPY

Tris-HCl 10 mM  
( $MgCl_2$  10 mM)  
pH 7,4

Tampó àcid SM-BODIPY

acetat sòdic 50 mM  
( $MgCl_2$  10 mM)  
pH 5,0

- Extracció de lípids pel mètode de Bligh i Dyer (Bligh and Dyer 1959):
  - Afegir als 200  $\mu$ L de la mostra incubada 300  $\mu$ L del tampó i procedir a l'extracció de lípids.
  - Afegir als 500  $\mu$ L de la mostra 1,88 mL de cloroform:metanol (vol:vol,1:2) i deixar-los 30 min en agitació vigorosa.
  - Afegir 625  $\mu$ L de cloroform, barrejar i centrifugar a 800 g durant 10 min.
  - Afegir 625  $\mu$ L d'aigua, barrejar i centrifugar a 800 g durant 10 min.
  - Eliminar la fase superior formada.
  - Evaporar la fase inferior sota un flux de nitrogen. Si cal, guardar els extractes congelats.
- Separació de lípids per cromatografia de capa fina:
  - Resuspendre la mostra en 40  $\mu$ L de cloroform i aplicar-ne 15  $\mu$ L a una placa de cromatografia de capa fina de sílica (5x20 cm, Watson). Aplicar també els patrons de SM-Bodipy i ceramida-Bodipy (4  $\mu$ L dilució 1/50 en cloroform).
  - Fer córrer la cromatografia dins una cubeta amb una fase mòbil de dicloretà:metanol:aigua (vol:vol:vol,180:40:1).
  - Visualitzar la placa cromatogràfica amb un detector de luminescència. S'observarà tant el substrat de la reacció (SM-BODIPY) com el producte (ceramida-BODIPY).

#### **4.3. ASSAIG DE L'ACTIVITAT PAF-AH**

L'activitat PAF-AH es mesura amb un mètode comercial colorimètic que usa com a substrat 2-tio-PAF (ref. 760914, Cayman Europe), tal com està prèviament descrit (Benitez, Sanchez-Quesada et al. 2003).

Procediment:

- Preparació del substrat 2-tio-PAF. Evaporar en nitrogen el contingut del vial i ressuspendre en 12 mL de tampó d'assaig PAF-AH \*(Tris-HCl 100 mM, EGTA 1 mM, pH 7,2).
- Carregar en una placa de 96 pous:
  - 10 µL de cada mostra d'LDL a 0,25 g apoB/L, en tampó A.
  - 5 µL tampó d'assaig PAF-AH\*
  - 10 µL de DTNB (5,5'-ditio-bis-(àcid 2-nitrobenzoic)) (10 mM en tampó Tris-HCl 0,4 M, pH 8,0).
- Afegir, just abans d'iniciar la cinètica i de forma simultània, 200 µL del substrat 2-tio-PAF.
- Mesurar l'absorbància a 414 nm cada 30 seg durant 15 min. A partir del pendent de la cinètica es calcula l'activitat enzimàtica PAF-AH expressant-la en µmols/min·mL o en µmols/min·mg de proteïna.

#### **4.4. ASSAIG DE L'ACTIVITAT PLA<sub>2</sub>**

L'activitat PLA<sub>2</sub> es mesura amb un mètode comercial colorimètic semblant al de l'activitat PAF-AH que usa com a substrat 1,2-diheptanoilfosfatidilcolina (ref. 10006809, Cayman).

Procediment:

- Preparació del substrat 1,2-diheptanoilfosfatidilcolina. Evaporar en nitrogen el contingut del vial i ressuspendre en 12 mL de tampó d'assaig PLA<sub>2</sub> \*(Tris-HCl 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 100 mM, tritó X-100 0,3 mM, BSA 1 g/L, pH 7,5).
- Carregar en una placa de 96 pous:
  - 10 µL de mostra d'LDL a 0,25 g apoB/L, en tampó A.
  - 5 µL tampó d'assaig PLA<sub>2</sub>\*
  - 10 µL de DTNB (10 mM en tampó Tris-HCl 0,4 M, pH 8,0).
- Afegir, just abans d'iniciar la cinètica i de forma simultània, 200 µL del substrat 1,2-ditiodiheptanoilfosfatidilcolina.
- Mesurar l'absorbància a 414 nm cada 30 seg durant 15 min. A partir del pendent de la cinètica es calcula l'activitat enzimàtica PLA<sub>2</sub> expressant-la en µmols/min·mL o en µmols/min·mg de proteïna.

## **5. ESTUDIS D'UNIÓ D'LDL A PROTEOGLICANS**

### **5.1. OBTECCIÓ DE PROTEOGLICANS D'AORTA**

Els PG es van obtenir a partir de les capes íntima i mitja d'aortes humanes. Per evitar la possible autòlisi post-mortem dels teixits arterials, les aortes humanes van ser obtingudes en l'autòpsia fins a 24 hores després de la mort accidental i, posteriorment, van ser congelades a -80°C fins al moment de la seva utilització.

L'extracció i purificació dels PG es va fer seguint el mètode de Hurt-Camejo et al. (Hurt-Camejo, Camejo et al. 1990), com s'indica a continuació.

Procediment:

- Disgregació mecànica de l'aorta, tallant-la en fragments petits.
- Disgregació enzimàtica: incubació dels fragments d'aorta en un tampó que conté urea 6 M, NaCl 1 M i inhibidors de proteases durant 24 hores a 4°C.
- Filtrar per eliminar els fragments de teixit més grans.
- Ultracentrifugar el filtrat durant 2 hores a 15.000 g.
- Proseguir amb el sobrenedant, sense agafar la part lipídica que està en suspensió. Diluir ¼ amb urea 6 M perquè la barreja estigui a una concentració de NaCl 0,25 M.
- Carregar la barreja a una columna de intercanvi aniònic HiTrap Q preequilibrada amb tampó PG-1.
- Eluir els PG amb un gradient lineal de NaCl de 0,25 M a 1 M, utilitzant el tampó PG-2, i recollir els pics detectats a 280 nm.

Tampó PG-1

urea 1 M  
CaCl<sub>2</sub> 10 mM  
acetat Na 50 mM  
NaCl 250 mM  
pH 6,2

Tampó PG-2

urea 1 M  
CaCl<sub>2</sub> 10 mM  
acetat Na 50 mM  
NaCl 1 M  
pH 6,2

- Dialitzar la mostra, liofilitzar-la i guardar-la congelada a -80°C.

El contingut dels PG en els diferents GAG va ser quantificat pel mètode de Bartold i Page (Bartold and Page 1985) que consisteix en el tractament dels PG amb condroitinasa ABC i AC, i en l'anàlisi per HPLC usant una columna NH<sub>2</sub> 5-µm.

## **5.2. DETERMINACIÓ DE LA UNIÓ D'LDL A PROTEOGLICANS**

Es van utilitzar tres mètodes diferents per tal d'estudiar la unió de les LDL als PG: la precipitació de complexos d'LDL-GAG, la incubació d'LDL en placa amb PG immobilitzats i la cromatografia d'afinitat de PG.

### **5.2.1. PRECIPITACIÓ DE COMPLEXES D'LDL-GAG**

L'assaig basat en el mètode descrit per Davidsson et al. (Davidsson, Hulthe et al. 2005) determina la unió de les LDL a diferents tipus de GAG comercials.

Procediment:

- Incubar les l'LDL (200 µl a 0,5 mM colesterol/L) amb el GAG (heparà sulfat, dermatà sulfat o condroití sulfat; a 10 i 100 µg GAG/mL) en el tampó GAG durant 2 hores a 4°C.

Tampó GAG

HEPES 5 mM

NaCl 20 mM

CaCl<sub>2</sub> 10 mM

MgCl<sub>2</sub> 2 mM

pH 7,0

- Centrifugar a 12.000 g durant 10 min a 4°C. Els complexos que s'hagin format d'LDL-GAG precipitaran.
- Per tal de conèixer el contingut d'LDL no unida a GAG, mesurar el colesterol del sobrenedant mitjançant un mètode enzimàtic (Roche Diagnostics).

### **5.2.2. INCUBACIÓ D'LDL EN PLACA AMB PG IMMOBILITZATS**

Es tracta d'un assaig en que s'usen PG d'artèria humana. Aquests són immobilitzats en una placa de 96 pous on s'hi incuben les LDL. Després d'uns rentats, es determina a la placa les LDL unides als PG. Es va adaptar el procediment descrit per Sneck et al. (Sneck, Kovanen et al. 2005).

Procediment:

- Immobilització dels PG incubant-los (100 µL/pou a 25 µg/mL) en una placa de poliestirè de 96 pous durant la nit a 4°C. En alguns pous, enlloc d'immobilitzar PG, s'hi posa albúmina (5 % BSA sense lípids) i serviran de control d'unió no específica.
- Bloqueig dels pous amb una barreja d'albúmina (3 % BSA sense lípids) i llet en pols (1 %, sense lípids) durant 1 hora a 37°C.
- Incubació amb concentracions creixents d'LDL (2,5-20 µg proteïna d'LDL) en tampó PG-unió durant 1 hora a 37°C.

<u>Tampó PG-unió</u>	<u>Tampó PG-rentat</u>
HEPES 20 mM	HEPES 20 mM
NaCl 32 mM	NaCl 50 mM
CaCl <sub>2</sub> 2 mM	CaCl <sub>2</sub> 2 mM
MgCl <sub>2</sub> 2 mM	MgCl <sub>2</sub> 2 mM
1 % BSA	pH 7,4
pH 7,4	

- Es realitzen rentats amb tampó PG-rentat en els que s'elimina l'LDL no unida als PG.
- Es quantifica el contingut d'LDL mesurant el colesterol total present als pous mitjançant l'assaig de gran sensibilitat *Amplex Red Cholesterol Assay Kit* (Molecular Probes), seguint les instruccions del fabricant (apartat MM-1.4.1, pàg 85).
- La unió d'LDL detectada als pous amb albúmina immobilitzada és considerada unió no específica i el seu valor serà sostret del dels pous coberts amb PG.

### 5.2.3. CROMATOGRAFIA D'AFINITAT DE PG

S'utilitza el mètode analític de la cromatografia d'afinitat de PG per tal de visualitzar l'afinitat de les poblacions d'LDL i poder determinar la força iònica de la seva unió als PG. Per altra banda, es pot utilitzar el mètode preparatiu, amb un volum de columna més gran, amb l'objectiu de reaïllar les mostres analitzades i poder estudiar-les posteriorment. En ambdós casos, es du a terme la cromatografia amb un aparell d'FPLC i es segueix el procediment descrit per Oorni et al. (Oorni, Pentikainen et al. 1997).

#### Mètode analític:

- S'uneixen els PG d'artèria humana a la columna HiTrap d'1 mL amb N-hidroxisuccinimida activada, seguint el procediment del fabricant (GE Healthcare).
- S'equilibra la columna amb el tampó A, es renta amb el tampó PG-B i es re-equilibra amb tampó PG-A.

<u>Tampó PG-A</u>	<u>Tampó PG-B</u>
HEPES 10 mM	HEPES 10 mM
CaCl <sub>2</sub> 2 mM	CaCl <sub>2</sub> 2 mM
MgCl <sub>2</sub> 2 mM	MgCl <sub>2</sub> 2 mM
pH 7,4	NaCl 250 mM
	pH 7,4

- Es carrega l'LDL (50 µL d'LDL a 0,5 g proteïna/L) a la columna utilitzant tampó PG-A a un flux de 0,5 mL/min. L'LDL s'uneix als PG.
- S'elueix l'LDL amb un gradient lineal de NaCl usant el tampó PG-B.
- Es monitoritza l'elució de l'LDL fent el seguiment de l'absorbància a 280 nm i es mesura el gradient de NaCl determinant els canvis en la conductivitat.

S'ha descrit el procediment de l'assaig en condicions de pH neutre. Si es vol realitzar a pH àcid es poden utilitzar els següents tampons PG-C i PG-D. Cal explicar que el tampó PG-D presenta el doble de NaCl ja que s'ha descrit que les LDL s'uneixen amb major força als PG a pH àcid (Sneck, Kovanen et al. 2005) i, per tant, és necessària una major força iònica per tal d'eluir-les.

<u>Tampó PG-C</u>	<u>Tampó PG-D</u>
MES 10 mM	MES 10 mM
CaCl <sub>2</sub> 2 mM	CaCl <sub>2</sub> 2 mM
MgCl <sub>2</sub> 2 mM	MgCl <sub>2</sub> 2 mM
pH 5,5	NaCl 500 mM
	pH 5,5

### **Mètode preparatiu:**

En aquest cas, per augmentar el volum de columna s'utilitzen 3 columnes connectades en sèrie i es carrega una major quantitat de mostra (aproximadament 2 mL d'LDL a 0,4 g proteïna/L). Es realitza la cromatografia de la mateixa manera i utilitzant els mateixos tampons. Es recullen les fraccions d'LDL eluides, es concentren per centrifugació (10.000 MWCO, Amicon Ultra, Millipore) se'ls mesura la concentració i s'utilitzen en posteriors anàlisis.

### **5.3. CROMATOGRAFIA D'IMMUNOAFINITAT ANTI-APOE**

Per avaluar si la unió a PG depèn de la quantitat d'apoE de la mostra es va subfraccionar l'LDL(-) mitjançant la cromatografia d'immunoafinitat anti-apoE.

La cromatografia d'immunoafinitat anti-apoE s'utilitza per separar les lipoproteïnes riques en apoE de les més empobrides. Es va seguir el procediment utilitzat per Siggins et al. (Siggins, Jauhiainen et al. 2003).

Procediment:

- S'enganxen els anticossos policlonals anti-apoE (R107, IgG purificats pel mètode de proteïna G) a una columna de sefarosa CL-4B amb CNBr activat, seguint les instruccions del fabricant (Amersham Pharmacia Biotech).
- S'aplica la mostra d'LDL a la columna preequilibrada amb PBS (pH 7,4) a un flux de 0,5 mL/min usant un aparell d'HPLC.
- Es recullen fraccions d'1 mL de les LDL no unides a la columna (LDL empobrides en apoE).
- Les LDL unides a la columna (LDL enriquides en apoE) s'elueixen amb glicina 0,1 M (pH 2,5) i es recullen en tubs que contenen Tris-HCl 1 M (pH 8,5) per neutralitzar la mostra.
- Les mostres són dialitzades en el tampó adient i concentrades amb Centricon YM-10 (10.000 MWCO Amicon, Millipore).

## **6. MÈTODES ESTADÍSTICS**

Els resultats es van expressar com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard (SD). Es van utilitzar els programes estadístics SPSS 11.5.2 i 15.0, i Sigma Stat 2.0 per a Windows.

En general, les diferències entre grups es van avaluar amb el test  $t$  de Wilcoxon (variables aparellades) i amb el test de U-Mann Whitney (variables no aparellades). Excepcionalment, també es van avaluar amb el tests de Kruskal-Wallis (per l'anàlisi de la unió d'LDL a PG immobilitzats en placa) o per ANOVA (les diferències entre les subfraccions d'LDL(-) amb diferent afinitat a PG), tal com s'indica en les diferents figures.

Es va considerar, en general, significatiu una  $p < 0,05$ . Quan no va ser així es va indicar el valor corresponent de  $p$ .



**PUBLICACIONES**

## PUBLICACIONS

Publicacions subordinades perquè la subcomissió de Postgrau de la Universitat Autònoma de Barcelona no permet que formin part de la tesi ja que no apareix l'afiliació de la doctoranda a aquesta universitat. Així doncs, només formen part de l'annex, no obstant, com permet la normativa, són comentades a la discussió.

1. *Sònia Benítez, Mercedes Camacho, **Cristina Bancells**, Luis Vila, José Luis Sánchez-Quesada, Jordi Ordóñez-Llanos. Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array. Biochemica et Biophysica Acta 1761 (2006) 1014-1021.*
2. *Conxita de Castellarnau \*, **Cristina Bancells** \*, Sònia Benítez, Manuel Reina, Jordi Ordóñez-Llanos, José Luis Sánchez-Quesada. Atherogenic and inflammatory profile of human arterial endothelial cells (HUAEC) in response to LDL subfractions. Clinica Chimica Acta 376 (2007) 233-236.*  
\* Els dos autors van contribuir igualment en l'article.
3. *Sònia Benítez, **Cristina Bancells**, Jordi Ordóñez-Llanos, José Luis Sánchez-Quesada. Pro-inflammatory action of LDL(-) on mononuclear cells is counteracted by increased IL10 production. Biochemica et Biophysica Acta 1771 (2007) 613-622.*

Publicacions principals de la tesi, que sí que han estat acceptades per formar-ne part:

4. **Cristina Bancells**, Sònia Benítez, Sandra Villegas, Oscar Jorba, Jordi Ordóñez-Llanos, José Luis Sánchez-Quesada. Novel phospholipolytic activities associated with electronegative low-density lipoprotein are involved in increased self-aggregation. *Biochemistry* 47 (2008) 8186-8194.
5. **Cristina Bancells**, Sònia Benítez, Matti Jauhiainen, Jordi Ordóñez-Llanos, Petri T. Kovanen, Sandra Villegas, José Luis Sánchez-Quesada, Katariina Öörni. High-binding affinity of electronegative low-density lipoprotein to human aortic proteoglycans is related to its aggregation level. *Journal of Lipid Research* 50 (2009) 446–455.

**DISCUSSIÓ**

## **BLOC A: EFECTE INFLAMATORI DE L'LDL(-)**

En la present tesi s'ha estudiat l'efecte inflamatori de l'LDL(-), una LDL modificada present a la circulació plasmàtica. Prèviament el nostre grup va descriure que l'LDL(-), tant provinent d'individus NL com d'HF i diabètics, indueix l'alliberament de les quimioquines MCP-1 i IL-8 en cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical (HUVEC) (De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003; Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2005). Així, un dels objectius de la present tesi va ser aprofundir en aquesta acció inflamatòria de l'LDL(-). Per portar-lo a terme es van realitzar assajos d'incubació d'LDL(-) amb diferents tipus cel·lulars en els que es va valorar l'alliberament de molècules inflamatòries mitjançant un *array* de proteïnes. L'*array* utilitzat (*RayBio™ Human Cytokine Array III*, Ray Biotech) permet la detecció simultània de 42 molècules inflamatòries i es va usar per realitzar un primer sondeig de l'efecte de l'LDL(-). A continuació, per tal de confirmar els resultats obtinguts amb l'*array* es va quantificar la secreció de citoquines mitjançant ELISA. D'altra banda, amb l'objectiu de conèixer si la inducció de citoquines era a nivell transcripcional es va mesurar mitjançant RT-PCR la transcripció dels gens que codifiquen les citoquines detectades.

Comparant els resultats obtinguts amb l'*array* de proteïnes i amb el mètode d'ELISA podem concloure que l'*array* de proteïnes aporta informació qualitativa de quines molècules es troben presents al medi, però no dades quantitatives fiables de la concentració de molècules presents, sinó, només orientatives. Tanmateix, malgrat no ser un bon mètode de quantificació és un sistema excel·lent per realitzar simultàniament el cribatge d'un important nombre de molècules.

### **1. EFECTE SOBRE CÈL·LULES ENDOTELIALS**

Els primers assajos es van dur a terme amb cèl·lules endotelials HUVEC, obtingudes de vena de cordó umbilical humà. El model cel·lular HUVEC ha estat utilitzat per molts grups per ser un cultiu cel·lular primari, relativament fàcil d'obtenir i amb bona resposta als estímuls aplicats. Tanmateix, les plaques ateroscleròtiques es troben als vasos arterials i es coneix que les cèl·lules endotelials són diferents segons el teixit i el vas sanguini d'origen. Per tant, en el segon treball es van realitzar experiments amb cèl·lules endotelials d'artèria de cordó umbilical humà (HUAEC) per veure si es reproduïen els resultats obtinguts amb HUVEC.

En els dos models de cèl·lules endotelials, L'LDL(-) va induir una major secreció que l'LDL(+) de les quimioquines ja descrites MCP-1 i IL-8, i a més, de la citoquina IL-6 i del

factor de creixement GM-CSF. La relació entre l'LDL(+) i LDL(-) en l'alliberament d'aquestes molècules va ser semblants entre els dos models cel·lulars, tot i que la quantitat de citoquines produïdes va ser major per les cèl·lules HUAEC que per les HUVEC, suggerint que les cèl·lules arterials són més sensibles. Les úniques diferències pel que fa al tipus de citoquines alliberades induïdes per l'LDL(-) van ser que les cèl·lules HUVEC van secretar les quimioquines GRO $\beta$  i GRO $\gamma$ , i les HUAEC, el factor de creixement PDGF-B. Tanmateix, s'observa una resposta a l'LDL(-) semblant pels dos models endotelials, tot i no ser idèntica.

En el cas de GRO $\beta$  i GRO $\gamma$ , les cèl·lules HUAEC també van secretar, però tant en resposta a l'LDL(+) com en l'LDL(-), no trobant-se una diferència significativa entre les dues fraccions d'LDL. En canvi, la seva alliberació induïda per l'LDL(+) en les cèl·lules HUVEC va ser molt menor, semblant a la condició control. En conseqüència, semblaria que les cèl·lules arterials serien més sensibles a una resposta inflamatòria induïda per l'LDL(+) en el cas de la producció de GRO.

L'altra principal diferència en la resposta de les cèl·lules arterials i venoses va ser l'alliberament per part de HUAEC de PDGF-B, un important mediador involucrat en l'aterosclerosi (Ross, Raines et al. 1986). D'altra banda, el PDGF tampoc es va veure induït en HUAEC pel típic mediador inflamatori IL-1 $\beta$ , suggerint que l'LDL(-) utilitza vies d'activació diferents a les de la IL-1 $\beta$ .

Les diferències en l'expressió de molècules inflamatòries entre HUVEC i HUAEC en resposta a diferents estímuls ja era coneguda. Així doncs, altres autors havien descrit una resposta diferencial en l'expressió de VCAM-1 en cèl·lules endotelials de diferent origen al incubar-les amb LDLox o LPC (Kume, Cybulsky et al. 1992; Khan, Parthasarathy et al. 1995), alhora que coincideixen en que la resposta de les cèl·lules HUVEC és menor. També, Deng et al. (Deng, Tsalenko et al. 2006) descriu que l'LDLox estimula en major grau en cèl·lules arterials que en venoses l'expressió de gens relacionats amb la proliferació. Per tant, les cèl·lules HUAEC, per la seva major sensibilitat i tenir un origen arterial, serien un millor model *in vitro* per estudiar les propietats inflamatòries de les lipoproteïnes.

Abe et al. (Abe, Fornage et al. 2007), en un article coetani, van realitzar un estudi genòmic en cèl·lules HUVEC incubades amb LDL(-) de pacients HF, obtenint uns resultats semblants als nostres. Coincideixen en la inducció de l'expressió d'IL-8, GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , però també troben GRO $\alpha$ , ENA-78, GCP-2 i VCAM. Cal tenir en compte en els nostres experiments es va valorar la proteïna alliberada als sobrenedants cel·lulars i que el sistema

de detecció utilitzat permet valorar 42 molècules concretes i no hi són presents GCP-2 ni VCAM. D'altra banda, Abe et al. no detecten MCP-1, IL-6 ni GM-CSF, tot i que posteriorment, el mateix grup, van detectar increment d'MCP-1 (Chen, Lee et al. 2007). El rang d'increment de l'expressió de les diferents citoquines (LDL(-)/LDL(+)) que descriuen és de l'ordre dels nostres valors (de 2 a 7 vegades), però una mica menor, ja que no resten el valor de la producció basal de les cèl·lules.

## **2. EFECTE SOBRE CÈL·LULES MONONUCLEARS**

L'objectiu del tercer treball de la tesi va ser estudiar l'acció inflamatòria de l'LDL(-) sobre leucòcits circulants en la sang, amb els quals l'LDL(-) podria interaccionar fàcilment en la pròpia circulació.

Els leucòcits són les cèl·lules promotores de la resposta inflamatòria i en l'aterosclerosi tenen un paper capdavanter tant en l'inici com en la progressió de la lesió. Un pas primerenc de la lesió ateroscleròtica és el reclutament de monòcits i limfòcits cap a la íntima de la paret arterial on generen una àmplia gamma de mediadors inflamatoris o, més endavant, la diferenciació dels monòcits a macròfags que poden captar LDL modificades i donar lloc a cèl·lules espumoses.

Per realitzar els assajos es van aïllar cèl·lules mononuclears, monòcits i limfòcits, a partir de sang humana. L'LDL(-) va induir tant en monòcits com en limfòcits la secreció d'MCP-1, IL-8, IL-6, GRO $\beta$ , GRO $\gamma$  i IL-10. En els monòcits el nivell de producció de citoquines va ser major, de l'ordre del doble que en limfòcits. Aquestes mateixes citoquines també havien estat secretades per les cèl·lules endotelials, excepte la IL-10. En canvi, els monòcits i els limfòcits no van alliberar GRO $\alpha$  ni els factors de creixement GM-CSF i PDGF per acció de l'LDL(-).

En el cas de les cèl·lules mononuclears es va estudiar si la inducció de les citoquines per part de les fraccions d'LDL era a nivell de secreció de les molècules ja sintetitzades a l'interior cel·lular o si activava la seva transcripció *de novo*. D'una banda, l'actinomicina D, inhibidor de la transcripció, va disminuir la secreció de citoquines, fet que també s'havia comprovat en HUVEC (De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000) i, d'altra banda, mitjançant anàlisi per RT-PCR, es va veure que induïa la transcripció de mRNA. Per tant, l'LDL(-) induïx la transcripció *de novo* de les citoquines alliberades per monòcits i limfòcits. El nivell de còpies de mRNA va ser major a 4 hores que a 20 hores, una resposta lògica ja que l'RNA codificador de citoquines és inestable per tal d'assegurar una síntesi de citoquines puntual. Pel que fa a nivell de secreció de proteïnes es va observar, en les

cinètiques d'alliberació, que les citoquines augmentaven en els sobredants cel·lulars amb el temps, no arribant de vegades a la saturació ni en el temps màxim de l'assaig (48 hores). En canvi, la IL-6 i la IL-10 van seguir un tipus de cinètica diferent com es comentarà en el següent apartat.

Totes les molècules estimulades per l'LDL(-) en cèl·lules endotelials, monòcits i limfòcits tenen una acció pro-inflamatòria, excepte la IL-10 que és una citoquina amb acció anti-inflamatòria. La IL-10 pot inhibir la producció i/o l'efecte d'altres citoquines i, en conseqüència, realitzar una acció moduladora de la resposta inflamatòria (Terkeltaub 1999). A més, també inhibeix processos cel·lulars importants en la progressió de la placa d'ateroma o la trombosis, com són la interacció dels monòcits amb l'endoteli (Pinderski Oslund, Hedrick et al. 1999), la fagocitosi (Capsoni, Minonzio et al. 1998) o l'apoptosi (Arai, Hiromatsu et al. 1995). En el següent apartat s'aprofundeix en l'acció moduladora de la IL-10 sobre les altres citoquines inflamatòries induïdes per l'LDL(-) i sobre ella mateixa.

### **3. INTERRELACIONS ENTRE LES CITOQUINES**

Es coneix que les diferents citoquines interaccionen entre elles podent activar l'expressió d'altres citoquines i provocar efectes sinèrgics o, per altra banda, inhibir i modular la resposta inflamatòria.

En el treball de cèl·lules HUVEC (publicació 1) es va hipotetitzar que potser la IL-6 actuava com una citoquina de primera onada, com ho fan la IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ . Ho va fer pensar el fet que en la cinètica de IL-6 s'observa una alliberació avançada, en comparació amb la de les altres citoquines. Així, la IL-6, en ser induïda a temps més curts per l'LDL(-), podria desencadenar a continuació la inducció de les altres citoquines. Sobre aquesta acció s'ha descrit que la IL-6 pot promoure la producció d'MCP-1 en cèl·lules endotelials (Rott, Zhu et al. 2003). A la inversa, també s'ha observat que la MCP-1 estimula la producció de IL-6 en SMC (Viedt, Vogel et al. 2002). A més, s'ha vist que GM-CSF indueix la síntesi d'IL-8 en neutròfils (Cowburn, Deighton et al. 2004). Tanmateix, en les nostres condicions experimentals, es va descartar que la IL-6 fos una citoquina de primera onada perquè quan es van preincubar les cèl·lules amb un anticòs anti-receptor de IL-6 no es va inhibir l'alliberament induït per l'LDL(-) de les citoquines IL-8, MCP-1 o GM-CSF, ni quan es va afegir IL-6 exògena no es va observar un augment d'aquestes altres citoquines. En el mateix treball també es va descartar que IL-8, MCP-1 i GM-CSF es potenciessin l'alliberament entre elles, perquè l'addició de cadascuna d'aquestes citoquines exògenament no va induir la secreció de les altres citoquines.

Per altra banda, en el treball de cèl·lules mononuclears (publicació 3) es va confirmar l'acció moduladora de la IL-10 sobre les altres citoquines. Concretament, a l'afegir IL-10 exògena a les cèl·lules estimulades amb LDL(-) es va observar una disminució de la producció de totes les citoquines i es va veure que aquest efecte era dut a terme a nivell transcripcional. A més, afegint un anticòs anti-IL-10, l'efecte modulador de la IL-10 va quedar bloquejat i es va observar un augment en la producció de les altres citoquines comparat a la condició sense afegir IL-10. També es va apreciar aquest efecte utilitzant un anticòs anti-receptor  $\alpha$  de IL-10, tot i que l'efecte no va ser tant fort i el grau d'inhibició va variar entre les diferents citoquines. Aquests resultats suggereixen la implicació del receptor de IL-10 en l'acció moduladora d'aquesta citoquina, malgrat que puguin existir altres vies d'entrada, com la unió de la IL-10 a altres proteïnes integrals de membrana (Capsoni, Minonzo et al. 1998). L'efecte inhibitor de la IL-10 sobre les altres citoquines el podria exercir induint la degradació de l'RNA que codifica per gens concrets (Wang, Wu et al. 1994). Tanmateix, no està clara la via concreta de transducció de senyals per la qual la IL-10 promouria l'efecte i s'ha proposat que hi estarien implicades les tres vies principals de les MAPK, ERK1/2, JNK i p38, o també STAT o NF $\kappa$ B, segons l'efecte específic (Sato, Nagayama et al. 1999; Suttles, Milhorn et al. 1999; Driessler, Venstrom et al. 2004; Ricchetti, Williams et al. 2004; Rahimi, Gee et al. 2005).

Respecte la regulació sobre si mateixa de la IL-10, s'ha descrit que la seva expressió està autoregulada (de Waal Malefyt, Abrams et al. 1991; Knolle, Uhrig et al. 1998) i s'ha suggerit que seria una regulació autocrina per retroalimentació negativa (Giambartolomei, Dennis et al. 2002). Els nostres resultats mostren que afegint IL-10 exògena disminueix l'expressió de IL-10 endògena. A més, el comportament de la IL-10 al llarg del temps, reflectit a la seva cinètica d'alliberament, és diferent al de les altres citoquines, amb un màxim de secreció a les 24 hores, seguit de la disminució de la seva concentració. Aquesta disminució podria ésser conseqüència de la seva autoregulació. Tot i això, la disminució de IL-10 al llarg del temps ja ha estat descrita per altres autors en monòcits sense estímul i l'expliquen per la unió inespecífica de la IL-10 secretada a la superfície dels propis monòcits (Capsoni, Minonzo et al. 1998). També podria ser deguda a una combinació dels diferents mecanismes.

Els resultats obtinguts suggereixen que el receptor de IL-10 estaria involucrat en l'autoregulació de la IL-10, perquè quan es va bloquejar l'entrada de la IL-10 per aquest receptor es va observar una acumulació d'aquesta citoquina en els sobrenedants cel·lulars degut a que no pot inhibir la producció de nova IL-10.



Així doncs, la IL-10 té un efecte regulador de la resposta inflamatòria de l'LDL(-) disminuint l'alliberament de les altres citocines inflamatòries. Això és conegut que passa en el sistema immunitari, que en resposta a una agressió externa s'activen les vies pro-inflamatòria i anti-inflamatòria per tal de controlar danys col·laterals (O'Garra, Vieira et al. 2004). L'LDL(-) seria l'estímul extern que induiria en monòcits i limfòcits ambdues vies. Així, l'LDL(-) semblaria activar el fenotip cel·lular de limfòcits Th1 que produiria diverses citocines pro-inflamatòries i, al mateix temps, potser activaria el fenotip cel·lular Th2 (Uyemura, Demer et al. 1996) que és anti-inflamatori i produiria la IL-10. El fenotip Th2 es contraposa al fenotip Th1, havent-hi un balanç d'accions oposades i regulant la resposta inflamatòria. Per altra banda, es pot pensar que sense l'acció reguladora de la IL-10 l'alliberament de citocines pro-inflamatòries induïdes per l'LDL(-) seria major, fet que afavoriria l'avanç de la lesió. Malgrat tot, l'autoregulació de la pròpia IL-10 sembla impedir l'anul·lació total de la resposta inflamatòria.

#### **4. POSSIBLES MECANISMES D'ACCIÓ**

##### **4.1. MOLÈCULES IMPLICADES**

En el cas de les cèl·lules HUVEC, es va aprofundir en el possible mecanisme implicat en l'acció inflamatòria. En anteriors treballs del grup s'havia suggerit que la inducció de les citocines MCP-1 i IL-8 podia ser deguda en part pel contingut en lípids oxidats de l'LDL(-) (De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000).

En general el nostre grup recolza la idea que l'LDL(-) no està oxidada o ho està en un nivell molt baix, pròxim al límit de detecció dels mètodes usats per la determinació d'oxidació, ja que no trobem signes d'oxidació augmentada respecte l'LDL(+) (Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003; Benitez, Ordonez-Llanos et al. 2004).

Per altra banda, també s'ha descrit que l'alt contingut de l'LDL(-) en NEFA i LPC, coneguts mediadors de la inflamació, podria ser el responsable de l'efecte inflamatori d'aquesta partícula (Benitez, Camacho et al. 2004). L'augment de NEFA en l'LDL(-) pot ser conseqüència d'una desregulació del catabolisme de lípids (Charles, Eschwege et al. 1997) o de l'acció d'activitats enzimàtiques tipus PLA<sub>2</sub> sobre la lipoproteïna. Tant la PLA<sub>2</sub> com la PAF-AH degradarien els fosfolípids produint LPC i NEFA o NEFA fraccionats, i a més, s'ha descrit que la PAF-AH s'uneix preferentment a l'LDL(-) (Benitez, Sanchez-Quesada et al. 2003). En assajos d'incubació d'LDL enriquides amb NEFA o tractades amb PLA<sub>2</sub> es va veure que aquestes LDL modificades induïen la secreció d'MCP-1 i IL-8

per part de cèl·lules HUVEC (Benitez, Camacho et al. 2004), reproduint part de l'acció de l'LDL(-).

En el primer treball de la present tesi, es van dur a terme experiments complementaris, també en cèl·lules HUVEC, en els que es va observar que el contingut elevat en NEFA i LPC d'LDL enriquides també augmentava la secreció d'IL-6, GM-CSF, GRO $\beta$  i GRO $\gamma$ . D'aquesta manera s'amplia el nombre de molècules possiblement induïdes per l'efecte dels NEFA i/o LPC de l'LDL(-). Experiments duts a terme pel nostre grup van reproduir resultats semblants en monòcits i limfòcits (Bancells, Benítez et al. 2006) (veure l'Annex). No obstant, aquestes LDL enriquides no reproduïen totalment els resultats de l'LDL(-) ja que hi ha citoquines que no arriben al grau d'inducció aconseguit per l'LDL(-), suggerint que hi poden haver altres components en l'LDL(-) implicats en els efectes inflamatoris descrits.

Altres LDL modificades també indueixen l'alliberament de citoquines en cèl·lules endotelials i leucòcits com LDL modificades oxidativament (LDLox, LDLmm) (Terkeltaub, Banka et al. 1994; Claise, Edeas et al. 1996; Miller, Viriyakosol et al. 2005) o LDL amb el contingut augmentat en NEFA (E-LDL) (Klouche, Gottschling et al. 1998; Suriyaphol, Fenske et al. 2002), entre d'altres. L'LDL(-), al ser una barreja de partícules diferents, podria contenir diferents tipus de partícules modificades, com les anteriors.

#### 4.2. RECEPTORS IMPLICATS

Respecte a la captació d'LDL(-), en el primer treball de la tesi es va estudiar si hi havia una major internalització d'LDL(-) comparat amb LDL(+) que pogués explicar l'efecte inflamatori incrementat. No obstant, es va trobar un nivell semblant d'internalització per ambdues fraccions d'LDL. De totes maneres, el nivell d'internalització podria ser semblant, però utilitzar diferents receptors i en el cas de l'LDL(-) que el receptor desencadenés una major resposta, com una major alliberació de citoquines. La utilització de diferents receptors podria ser deguda a la composició diferencial de les dues partícules, com en NEFA, LPC, triglicèrids, colesterol lliure, apoE i apoCIII, o la major susceptibilitat a l'agregació, que provocarien la captació preferent de l'LDL(-) per un receptor determinat.

En estudis previs es va trobar que l'LDL(-) té una menor afinitat d'unió pel rLDL de fibroblasts en comparació amb l'LDL(+) i també es va descartar la major captació pel receptor *scavenger* (SR) tipus SRIIA en estudis amb macròfags (Benitez, Villegas et al. 2004), per tant, hi podrien haver vies alternatives de captació d'LDL(-). Altres possibles candidats serien l'LRP1 que reconeix LDL agregades o els SR tipus CD36 o LOX-1 que

uneixen principalment LDLox. En el cas del CD36, també uneix NEFA, i presumiblement, LDL enriquides amb NEFA. Respecte LOX-1, s'ha descrit que l'LDL(-) porta a terme efectes apoptòtics a través d'aquest receptor (Tang, Lu et al. 2008; Lu, Yang et al. 2009).

#### **4.3. VIES DE SENYALITZACIÓ**

No està clara la via o vies de transducció de senyals implicades en l'alliberament de citokines induïda per l'LDL(-) en els diferents models cel·lulars. S'ha descrit que podria esser via els factors de transcripció NF $\kappa$ B i/o AP-1 ja que alguns dels seus components (p65 i p50 per NF $\kappa$ B; c-Jun, c-Fos i ATF2 per AP-1) van incrementar la seva translocació nuclear en resposta a l'LDL(-) en HUVEC (Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2005). NF $\kappa$ B i AP-1 també estan involucrats en la inducció de la molècula d'adhesió VCAM-1 per part de l'LDL(-) (Ziouzenkova, Asatryan et al. 2003). En el mateix article aprofundeixen en les vies de transducció i veuen que es reverteix la inducció de VCAM-1 mitjançant lligands de PPAR $\alpha$  produïts en tractar l'LDL(-) amb LPL.

En general, sembla que l'LDLox induiria l'expressió de citokines mitjançant els factors NF $\kappa$ B i AP-1 (Terkeltaub, Banka et al. 1994; Brand, Eisele et al. 1997; Leonarduzzi, Arkan et al. 2000), tot i que s'ha descrit que l'LDLmm indueix l'expressió d'IL-8 i MCP-1 activant el PPAR $\alpha$  (Lee, Shi et al. 2000), factor més relacionat amb efectes anti-inflamatoris. Per la seva banda, els NEFA també activen el factor NF $\kappa$ B (Thurberg and Collins 1998) i AP-1 (Rao, Alexander et al. 1995) els quals indueixen, entre d'altres, gens implicats en la inflamació.

#### **5. RELLEVANCIA FISIOPATOLOGICA DE L'ACTIVITAT INFLAMATORIA DE L'LDL(-)**

En conjunt, els resultats obtinguts confirmen que l'LDL(-) presenta una àmplia acció inflamatòria. Aquesta LDL modificada present a la circulació plasmàtica estimula les cèl·lules endotelials i mononuclears a produir molècules inflamatòries que tenen funcions importants en varies etapes del desenvolupament de l'aterosclerosi.

Un dels primers passos en l'aterogènesi, com és el reclutament de leucòcits a les àrees lesionades, sembla ser potenciat per l'LDL(-) a través de l'alliberament de factors quimiotàctics. En els treballs d'aquesta tesi s'ha vist que indueix en cèl·lules endotelials i mononuclears l'expressió de les quimioquines IL-8, MCP-1, GRO $\beta$  i GRO $\gamma$ . A més, també indueix l'alliberament de GM-CSF en cèl·lules endotelials, factor de creixement que també actua com a citokina quimioattractant de neutròfils humans (Gomez-Cambronero, Horn et

al. 2003). Per tant, l'LDL(-) a través de la inducció de l'expressió de diferents quimioquines pot estimular el reclutament de monòcits (principalment MCP-1, però també IL-8 i GRO), limfòcits T (IL-8, però també MCP-1) i neutròfils (GRO i IL-8) (Terkeltaub, Boisvert et al. 1998; Gerszten, Garcia-Zepeda et al. 1999; Smith, Galkina et al. 2005). Al seu torn, els leucòcits reclutats, poden interaccionar amb LDL modificades o LDL(-) retingudes a l'espai subendotelial, produir més quimioquines i activar encara més la resposta inflamatòria.

L'LDL(-) també va induir l'expressió de molècules que participen en altres accions implicades en l'aterosclerosi, com els factors de creixement GM-CSF i PDGF-B. Com el seu nom indica, GM-CSF és un factor estimulador de colònies de granulòcits que està implicat en la proliferació i diferenciació de granulòcits i macròfags (Sakai, Kobori et al. 2000). En conseqüència, com que activa els macròfags, pot participar en la formació de cèl·lules espumoses, un pas rellevant en l'evolució de la lesió ateroscleròtica. GM-CSF també modula l'expressió del col·lagen tipus VIII en SMC (Plenz, Reichenberg et al. 1999), modificant les característiques i la composició de la matriu extracel·lular. Per la seva banda, el factor de creixement PDGF induïx la fagocitosi dels neutròfils, afavorint la formació de cèl·lules espumoses, i estimula el creixement i la movilització de les SMC (Ross, Bowen-Pope et al. 1990; Raines 2004). Aquestes modificacions poden desestabilitzar la integritat de la paret arterial contribuint a la progressió de la placa d'ateroma.

Una altra molècula inflamatòria induïda per l'LDL(-) és la IL-6. Es tracta d'una citoquina multifuncional que, entre d'altres accions, estimula la diferenciació dels limfòcits B, promou la producció d'anticossos i participa en la resposta inflamatòria de fase aguda induint l'expressió de molècules que hi estan implicades, com la proteïna C-reactiva (CRP) (Akira, Hirano et al. 1990; Ridker, Rifai et al. 2000). Per aquest últim efecte, potser l'LDL(-), mitjançant la IL-6, pot contribuir a l'estat sistèmic proinflamatori d'individus amb malalties arterials coronàries, ja que s'ha descrit que presenten nivells plasmàtics de CRP incrementats (Ridker 2003).

Tanmateix, l'LDL(-) també estimula en monòcits i limfòcits l'alliberament de IL-10, una citoquina anti-inflamatòria que pot disminuir la producció i/o l'efecte d'altres citoquines (Terkeltaub 1999). A més, també dificulta altres processos importants en la progressió de la placa d'ateroma o la trombosis, perquè inhibeix la producció de metal·loproteïnases o del factor tissular (Lindmark, Tenno et al. 1998; Terkeltaub 1999). En el nostre cas, la IL-10 sembla estar involucrada en la modulació de la resposta pro-inflamatòria induïda per l'LDL(-) impeding que sigui excessiva.

## Discussió

Cal remarcar que aquests estudis estan realitzats *in vitro* i per tant no es pot extrapolar directament l'efecte *in vivo*, on hi intervenen molts altres factors addicionals. És coherent, però, suposar que a l'ambient de la lesió hi hauran altres estímuls aterogènics els quals poden actuar per separat o sinèrgicament amb l'LDL(-) en la producció d'efectes inflamatoris. Alhora, molècules produïdes per un tipus cel·lular poden tenir un efecte sobre el mateix o altre tipus cel·lular, amplificant la resposta inflamatoria.

Una limitació d'aquests estudis és que s'ha valorat l'alliberament de molècules inflamatòries, però no s'ha avaluat l'efecte biològic resultant d'aquesta acció, com per exemple l'atracció de leucòcits mitjançada per les quimioquines o la proliferació cel·lular provocada pels factors de creixement. També és necessari aprofundir en els receptors i vies de transducció de senyals implicades en la inducció de les molècules inflamatòries per part de l'LDL(-), i també poder identificar els components propis de l'LDL(-) que fan que tingui aquest comportament aterogènic.

## **BLOC B. ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES ASSOCIADES A L'LDL(-) I UNIÓ A PROTEOGLICANS**

### **1. ACTIVITAT FOSFOLIPOLÍTICA TIPUS FOSFOLIPASA C**

Amb l'objectiu de comprendre la implicació de l'LDL(-) en la patologia ateroscleròtica el nostre grup ha centrat part de la seva investigació en conèixer el possible origen d'aquesta partícula i les causes de les seves propietats. En aquest aspecte, s'ha descrit que l'LDL(-) presenta una diferent composició comparat amb l'LDL(+): augment de triglicèrids, colesterol lliure, NEFA, LPC, apoCIII i apoE; una disminució de la proporció relativa d'apoB-100; i una major activitat PAF-AH (Chappey, Myara et al. 1995; Nyssonen, Kaikkonen et al. 1996; Benitez, Sanchez-Quesada et al. 2003; Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003). Aquestes diferències respecte l'LDL(+) poden donar pistes del possible origen o mecanismes dels seus efectes. Per exemple, s'ha hipotetitzat que l'activitat fosfolipolítica PAF-AH augmentada en LDL(-) podria explicar part de l'augment del contingut en NEFA i LPC, que ahora semblen estar implicats en l'acció inflamatòria de l'LDL(-) (Benitez, Camacho et al. 2004). En relació amb això, en la present tesi, per tal d'aprofundir en el coneixement de l'LDL(-) s'han estudiat altres activitats fosfolipolítiques associades a aquesta partícula modificada.

Els resultats obtinguts en el quart treball de la tesi descriuen una nova activitat fosfolipolítica associada a l'LDL(-) que no es troba present en l'LDL(+). És una activitat enzimàtica tipus fosfolipasa C (PLC) que trenca el fosfolípid entre l'enllaç èster de l'àcid fosfòric i el glicerol. Es va observar que degrada principalment LPC, també SM i menys eficientment PC donant fosforilcolina i monoacilglicerol/ceramida/diacilglicerol, respectivament. En conseqüència, es pot dir que l'LDL(-) presenta activitat lisoPLC, SMasa i PLC.

A més d'utilitzar diferents fosfolípids lliures com a substrats, es va observar que l'activitat fosfolipolítica de l'LDL(-) degrada eficientment LDL enriquides en LPC, com LDLox o LDL tractada amb PLA<sub>2</sub>. També pot utilitzar com a substrat els propis fosfolípids de la partícula d'LDL(-), autodegradant-la. Per altra part, ni la VLDL ni l'HDL van presentar activitat fosfolipolítica tipus PLC.

El mètode de detecció de l'activitat fosfolipolítica utilitzat va ser un assaig fluorescent (Amplex Red, Molecular Probes) que permet la detecció de la molècula de fosforilcolina. L'assaig consisteix en reaccions enzimàtiques encadenades que en presència de fosforilcolina acaben produint un producte fluorescent. Però, aquest mètode com que té

reaccions enzimàtiques intermitges pot presentar més interferències i no permet avaluar efectes com l'absència de  $Mg^{2+}$  perquè hi ha enzims de l'assaig que el requereixen. Per tant, en alguns casos, per confirmar els resultats obtinguts també es va mesurar l'activitat SMasa mitjançant un mètode més específic de degradació d'un substrat fluorescent. El mètode consisteix en incubar l'LDL(-) amb SM fluorescent i observar la formació de ceramida fluorescent per cromatografia de capa fina de l'extracte lipídic. Mitjançant aquest mètode es va corroborar que l'LDL(-) té una major activitat SMasa. A més, es va observar que presenta activitat tant a pH neutre com en àcid, i no requereix  $Mg^{2+}$ .

L'activitat fosfolipolítica sembla estar relacionada amb una major agregació de les partícules d'LDL, ja que quan es va incubar LDL(-) durant 24 hores a 37°C, en condicions que prevenen l'oxidació, es va detectar degradació de fosfolípids, alhora que es va observar un augment en l'agregació de les partícules. Des dels inicis, ja es coneixia la major susceptibilitat a l'agregació de l'LDL(-) (Avogaro, Bon et al. 1988) que sembla ser conseqüència de l'activitat fosfolipolítica intrínseca.

### **1.1. POSSIBLE ORIGEN DE L'ACTIVITAT FOSFOLIPOLÍTICA**

No està clar quin és l'origen de l'activitat fosfolipolítica tipus PLC present en l'LDL(-), tot i que hi ha diferents hipòtesis.

S'ha descartat que l'activitat fosfolipolítica i també l'autoagregació de l'LDL(-) estiguin relacionades amb l'oxidació de la partícula perquè, en l'assaig de degradació de fosfolípids de l'LDL(-) no es va detectar la presència de diens conjugats en la PC (detectats mesurant la absorbància a 234 nm del pic de PC), que sí que van ser observats en l'LDLox. D'altra banda, en l'oxidació d'LDL es dona una degradació preferencial de la PC, en canvi, en l'LDL(-) la degradació és més específica per la SM. A més a més, la fosforilcolina, la molècula detectada pel mètode d'Amplex Red, no és un producte que hauria de ser produït per la peroxidació lipídica.

En segon lloc, assajos realitzats en presència d'inhibidors suggereixen que l'activitat fosfolipolítica de l'LDL(-) seria una activitat fosfolipolítica diferent a les principals presents al plasma. En concret, es va observar que inhibidors específics dels enzims SMasa neutre, SMasa àcida, PLC dependent de PC, sPLA<sub>2</sub> o PAF-AH no van bloquejar gens eficientment l'activitat de l'LDL(-). Només la clorpromacina (inhibidor de la SMasa àcida) i el metil- $\gamma$ -linoleil fluorofosfonat (inhibidor de la PLC dependent de PC) van inhibir-la parcialment (39 % i 16 %, respectivament).

Per altra banda, en l'activitat fosfolipolítica de l'LDL(-) tampoc hi estarien implicades les proteïnes minoritàries presents en major concentració en l'LDL(-) respecte l'LDL(+) (apoE, apoCIII i PAF-AH), ja que ni la PAF-AH purificada ni LDL(+) enriquides amb apoE i apoCIII no van presentar activitat fosfolipolítica tipus PLC. Pel que fa a la possible implicació dels lípids de l'LDL(-), tampoc es va observar activitat en els extractes lipídics analitzats.

Així doncs, havent descartat les possibilitats anteriors, també s'ha pensat que la responsable de l'activitat fosfolipolítica de l'LDL(-) podria ser una proteïna fins ara desconeguda present en l'LDL(-). S'ha descrit que l'LDL total conté 10 proteïnes minoritàries: apoE, apoCIII, apoCII, apoAI, apoAIV, apoJ, apoM, sèrum amiloide AIV, calgranulina A i lisosoma C (Karlsson, Leanderson et al. 2005). Estudis proteòmics preliminars realitzats en el nostre grup concreten que algunes d'aquestes proteïnes descrites es troben principalment en la subfracció d'LDL(-), com l'apoE, apoCIII, apoAI i apoJ, a més que descriuen altres apolipoproteïnes també incrementades en l'LDL(-): apoAII, apoD i apoF (resultats encara no publicats). No obstant, no s'ha descrit que cap d'aquestes proteïnes presenti activitat fosfolipolítica. A més a més, no es va trobar activitat fosfolipolítica en la VLDL ni en l'HDL, i aquestes lipoproteïnes presenten un major contingut en moltes de les proteïnes descrites. En conseqüència, sembla improbable la implicació d'aquestes proteïnes en l'activitat fosfolipolítica de l'LDL(-), tot i que no es pot descartar categòricament que alguna d'aquestes proteïnes presenti algun tipus d'activitat enzimàtica encara no descrita.

L'altra opció possible és que l'activitat fosfolipolítica de l'LDL(-) sigui deguda a l'apoB. Holopainen et al. van descriure una activitat SMasa associada a l'LDL plasmàtica i van hipotetitzar que podia ser una propietat intrínseca de l'apoB-100 (Holopainen, Medina et al. 2000). Van arribar a aquesta conclusió perquè van trobar homologies en la seqüència de l'apoB-100 i tres regions de la SMasa de *Bacillus cereus*. Aquests autors també van suggerir que l'apoB-100 presenta la triada catalítica His-Ser-Asp comuna en molts enzims lipolítics.

En aquest sentit, podria ser que l'activitat SMasa que Holopainen et al. troben en l'LDL plasmàtica, en realitat seria deguda a les partícules d'LDL(-) presents en l'LDL total que ells aïllen i que la resta d'LDL(+) no hi contribuiria. Però, tant l'LDL(+) com l'LDL(-) tenen una molècula d'apoB-100 amb la mateixa seqüència d'aminoàcids, per tant, ambdues haurien de presentar activitat fosfolipolítica si fos deguda a l'apoB-100. Tanmateix, la diferència s'explicaria per canvis estructurals de l'apoB-100 entre les dues fraccions d'LDL, de manera que l'apoB-100 de l'LDL(-) adoptaria la conformació òptima per ser activa. L'espectre de diroïsmes circular de l'LDL(-) va ser lleugerament diferent del de l'LDL(+) i va



tenir un 10 % menys de senyal indicant pèrdua d'estructura secundària regular, d'acord amb treballs d'altres autors (Parasassi, Bittolo-Bon et al. 2001; Asatryan, Hamilton et al. 2005). No obstant, amb els mètodes utilitzats la diferència en la conformació detectada en les dues subfraccions va ser petita i en treballs anteriors del grup no s'havia detectat (Benitez, Villegas et al. 2004). No es pot descartar que aquestes mateixes suposicions puguin aplicar-se, a part de a l'apoB-100, a altres proteïnes. Així, alguna proteïna present a l'LDL podria patir canvis en la conformació pel diferent entorn lipídic i guanyar activitat enzimàtica.

L'assaig d'envelliment d'LDL(+) que es va realitzar recolza la idea del canvi conformacional. En aquest experiment es va observar que LDL(+) envellida fins a 40 dies a 4 °C presentava un progressiu augment d'activitat fosfolipolítica i diferències en l'estructura secundària de l'apoB-100. En concret, l'LDL(+) envellida va anar perdent l'estructura secundària regular a canvi de guanyar conformació aleatòria que aporta flexibilitat a l'estructura, i així, l'apoB-100 o una altra proteïna potser adoptaria la conformació òptima per tenir activitat. Tanmateix, l'espectre de dicromisme circular de l'LDL(+) envellida va ser diferent del de l'LDL(-) indicant que el procés d'envelliment *in vitro* difereix del procés que es dona *in vivo* amb l'LDL(-).

Per altra banda, el grup d'Holopainen et al. (Kinnunen and Holopainen 2002) observen que mentre l'activitat SMasa és present en l'LDL plasmàtica, la ceramida és gairebé absent, tot i que s'ha demostrat que es troba en grans quantitats en LDL agregades, incrementada entre 10 i 50 vegades (Schissel, Tweedie-Hardman et al. 1996). Creuen que el possible lloc actiu de l'activitat SMasa estaria orientat cap a l'exterior de la superfície lipoproteica impedit l'accés de la SM continguda en aquesta lipoproteïna. Els resultats del nostre treball van mostrar que l'LDL(-) presentava una certa activitat fosfolipolítica en absència de substrat extern que podria estar actuant sobre la pròpia partícula activa o, recolzant la hipòtesi anterior, sobre altres partícules d'LDL(-). Tanmateix, l'activitat era molt baixa i augmentava molt més quan s'aportava substrat extern.

Calen més experiments per aclarir l'implicació de l'apoB-100 o altres proteïnes en l'activitat fosfolipolítica tipus PLC de l'LDL(-), alhora que seria interessant determinar les possibles regions implicades en la generació d'aquesta activitat.

## **2. UNIÓ A PROTEOGLICANS**

La patologia aterioscleròtica es caracteritza per la retenció d'LDL a la íntima arterial. L'LDL, un cop retinguda, s'acumula i pot ser modificada adquirint propietats inflamatòries. Segons la hipòtesi de la resposta a la retenció de Williams i Tabas, la retenció de les lipoproteïnes seria el fet central iniciador de la lesió aterioscleròtica (Williams and Tabas 1998). Degut a la importància de la retenció subendotelial i que l'LDL(-) presenta característiques que suggerien una possible major unió, es va plantejar estudiar l'afinitat de l'LDL(-) a les principals molècules constituents de la matriu extracel·lular arterial: els proteoglicans (PG).

Els PG estan formats per una proteïna nucli i cadenes de glucosaminoglicans (GAG). La unió de l'LDL als PG és mitjançant interaccions iòniques entre els residus carregats positivament de l'apoB-100 i els grups sulfat i carboxil carregats negativament dels GAG (Iverius 1972). Per una part, la càrrega negativa de l'LDL(-) suggereix una menor unió als PG, també carregats negativament. No obstant, hi ha altres característiques que fan pensar el contrari.

L'LDL(-) podria ser propensa a unir-se a PG degut al seu major contingut en apoE, que és una proteïna que s'uneix als PG (Mahley, Weisgraber et al. 1979), en apoCIII, que media la unió (Olin-Lewis, Krauss et al. 2002), la major susceptibilitat a l'agregació (Oorni, Pentikainen et al. 2000) o pel fet de ser més petita i densa que l'LDL nativa (Camejo, Hurt-Camejo et al. 1998). A més, LDL tractades amb PLA<sub>2</sub>, que és un model que reproduïx part de les característiques de l'LDL(-), també tenen una major afinitat pels PG (Oorni, Hakala et al. 1998).

Així doncs, en el cinquè treball de la tesi es va estudiar l'afinitat d'unió de l'LDL als PG avaluant-la per tres mètodes. Tots van determinar que l'LDL(-) presenta una major unió als PG comparat amb l'LDL(+). La primera aproximació va ser valorar la unió de les dues fraccions d'LDL a diferents tipus de GAG mitjançant la precipitació dels complexos LDL-GAG formats. Aquest assaig, a part de determinar que l'LDL(-) s'uneix més als GAG que l'LDL(+) (de 2 a 4 vegades), va permetre concretar que la major afinitat és pel condroití 6-sulfat, seguit del dermatà sulfat i la menor per l'heparà sulfat. Així, l'LDL(-) presenta la major afinitat pel GAG més abundant de la íntima arterial, ja que el condroití 6-sulfat forma part del PG majoritari versicà. També l'LDL(+) es va unir lleugerament al condroití 6-sulfat com ja s'havia descrit per l'LDL nativa (Olsson, Ostergren-Lunden et al. 2001).

En els següents experiments es van utilitzar PG aïllats de la capa íntima i mitja arterial humana per tal de realitzar els assajos en unes condicions més fisiològiques. Com és conegut, el constituent majoritari dels PG aïllats va ser el GAG condroití 6-sulfat (53 %),

seguit del condroití 4-sulfat (27 %) i del dermatà sulfat (20 %). L'assaig d'incubació d'LDL en pous coberts de PG també va determinar que l'afinitat d'unió de l'LDL(-) és unes quatre vegades major que la de l'LDL(+). L'altre mètode utilitzat, la cromatografia d'afinitat de PG, va permetre determinar la força de la unió de les diferents partícules d'LDL. Es va veure que l'LDL(-) té dues poblacions amb diferent afinitat d'unió als PG, una amb menor afinitat que l'LDL(+) i l'altra amb major afinitat. El resultat s'explica per l'heterogeneïtat de les partícules d'LDL(-), que pel fet de divergir en composició, densitat i mida poden presentar comportaments diferents.

A més, pel mètode de la cromatografia d'afinitat també es va valorar la unió a PG en condicions de pH àcid. Ambdues fraccions d'LDL s'uneixen més fort a pH àcid que a pH neutre, com ja ha estat descrit per l'LDL nativa i LDL proteolitzades, lipolitzades i oxidades (Sneck, Kovanen et al. 2005). Es va observar que l'LDL(-) també presenta dues poblacions a pH àcid, una amb afinitat d'unió a PG incrementada respecte l'LDL(+) i l'altra lleugerament disminuïda. És interessant saber que partícules l'LDL(-) tenen també una major unió a pH àcid ja que en les àrees profundes de la lesió s'hi troben zones acidificades degut l'activitat metabòlica dels macròfags i/o a hipòxia (Leake 1997; Bjornheden, Levin et al. 1999). En conseqüència l'LDL(-) pot tenir un paper en les lesions ateroscleròtiques avançades, en les quals hi ha àrees acidificades (Naghavi, John et al. 2002).

## **2.1. POSSIBLE CAUSA DE LA MAJOR UNIÓ A PROTEOGLICANS**

Per estudiar la causa de la major unió d'algunes partícules d'LDL(-) als PG es van recollir diferents subfraccions d'LDL(-) segons la seva afinitat d'unió i es van estudiar les seves principals característiques.

Respecte a la composició, una hipòtesi era que les subfraccions d'LDL(-) amb major unió a PG tindrien el contingut incrementat en apoE i apoCIII. Tanmateix, en contra de l'esperat, es va observar que el contingut en aquestes apolipoproteïnes no només no era major en les subfraccions amb més afinitat, sinó que era inversament proporcional a la unió a PG. Per confirmar els resultats, en el cas de l'apoE, es va fer un assaig complementari que consistia en separar l'LDL(-) en partícules riques o pobres en apoE mitjançant cromatografia d'afinitat anti-apoE i, a continuació, valorar-ne l'afinitat d'unió als PG. Es van obtenir uns resultats concordants, ja que les partícules d'LDL(-) riques en apoE es van unir menys als PG. Segons articles publicats l'apoE té dos llocs d'unió per heparina i participa en la unió de lipoproteïnes remanents als PG (Weisgraber, Rall et al. 1986; Ji, Brecht et al. 1993). Però, en primer lloc, el contingut en apoE de l'LDL(-) (menys de 0,3 molècules

d'apoE per partícula, de mitjana) (Demuth, Myara et al. 1996; De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000) és molt menor que el de les lipoproteïnes remanents (varies molècules d'apoE per partícula) (Olin-Lewis, Krauss et al. 2002). En segon lloc, l'apoE presenta alta afinitat per heparina i heparà sulfat, menor per dermatà sulfat i gairebé nul·la per condroití sulfat (Shuvaev, Laffont et al. 1999), i és aquest últim el constituent majoritari (80 %) de les preparacions de PG d'artèria humana utilitzades. Respecte l'apoCIII, s'ha descrit que pot modular la unió entre els PG i l'apoB o l'apoE de les lipoproteïnes, sense unir-se directament als PG (Olin-Lewis, Krauss et al. 2002). De nou, la concentració d'apoCIII en l'LDL(-) és molt baixa (menys de 0,3 molècules d'apoCIII per partícula, de mitjana) (De Castellarnau, Sanchez-Quesada et al. 2000) i podria no afectar en la seva unió. De totes maneres, sembla que hi ha una relació inversa clara entre aquestes apoproteïnes i la unió als PG de l'LDL(-) que no sabem explicar.

Per altra banda, els resultats van suggerir que la causa de la major afinitat d'unió als PG d'algunes partícules d'LDL(-) era l'agregació. Es va demostrar en trobar en les fraccions d'LDL(-) amb major unió a PG una major terbolesa, bandes de major pes molecular en electroforesi no desnaturitzant en gradient d'acrilamida i, a més, es van observar partícules agregades en les imatges de microscòpia òptica. Es coneix que les LDL agregades o fusionades s'uneixen més fort als PG que l'LDL nativa (Paananen, Saarinen et al. 1995; Oorni, Pentikainen et al. 2000). L'explicació que donen és que les partícules d'LDL agregades o fusionades com que tenen la monocapa superficial alterada pateixen una reestructuració de l'apoB-100 en la qual es poden exposar nous residus implicats en la unió als PG. També diuen que en haver-hi més molècules d'apoB-100 per LDL agregada hi ha més llocs d'unió.

En l'estudi de l'activitat fosfolipolítica es va descriure que l'activitat tipus PLC de l'LDL(-) podia ser la responsable de la major susceptibilitat a l'agregació de l'LDL(-) perquè es va observar una relació entre elles i es coneix molt bé que l'activitat SMasa o PLA<sub>2</sub> promouen l'agregació de les partícules lipolitzades, al mateix temps que aquestes partícules s'uneixen més als PG (Oorni, Hakala et al. 1998). Per tant, es poden relacionar els tres paràmetres en relació a l'LDL(-): major activitat fosfolipolítica tipus PLC, més agregació i unió a PG augmentada. Es va arribar a aquesta idea en veure que les subfraccions d'LDL(-) amb major afinitat d'unió a PG i més agregació són les que tenen activitat fosfolipolítica tipus PLC (lisoPLC i SMasa). En canvi, l'activitat PAF-AH no hi estaria implicada perquè no es va veure relacionada amb l'afinitat a PG.

L'activitat fosfolipolítica altera la composició lipídica de l'LDL, disminuint el contingut en PC i SM (dades de la quarta publicació). Això concorda amb que es va observar un menor

contingut en fosfolípids en la subfracció d'LDL(-) amb major unió a PG i més activitat fosfolipolítica, tot i que la diferència no va ser significativa. Les activitats SMasa, PLC i lisoPLC descrites produeixen fosforilcolina, que és alliberada de la partícula, i ceramida, diacilglicerol i/o monoacilglicerol que queden retinguts. En principi, aquests lípids apolars poden crear dominis hidrofòbics a la superfície de la partícula i propiciar l'inici de l'agregació de les partícules.

D'altra banda, l'alteració lipídica junt amb l'agregació pot provocar una reorganització de la monocapa superficial de la partícula d'LDL i fer variar la conformació de l'apoB-100 (Flood, Gustafsson et al. 2004). En aquest aspecte, en la subfracció d'LDL(-) amb major unió a PG, es va detectar un menor contingut relatiu en apoB-100 malgrat no disminuir el contingut proteic. Aquest resultat indicaria que no hi ha pèrdua d'apoB-100 sinó variacions en la disposició espacial de la proteïna que dificultarien el seu reconeixement mitjançant anticossos, ja que es va utilitzar un mètode d'immunodetecció per determinar l'apoB-100.

Els canvis en l'apoB-100 de l'LDL podrien recol·locar residus implicats en la unió a PG o exposar regions amagades carregades positivament i establir nous llocs d'unió a PG, diferents del lloc B (residus 3.359-3.369), que és el lloc funcional d'unió d'LDL nativa a PG (Boren, Olin et al. 1998). En el cas de les LDL lipolitzades amb PLA<sub>2</sub>, que tenen una major afinitat d'unió als PG (Sartipy, Bondjers et al. 1998; Sartipy, Camejo et al. 1999), s'ha descrit que és deguda a l'exposició d'un nou lloc d'unió de l'apoB-100, anomenat lloc A (residus 3.148-3.158). Aquest lloc A no és funcional en l'LDL nativa, per això, les LDL tractades amb PLA<sub>2</sub> presenten una major unió a PG, perquè sembla que el lloc A actua cooperativament amb el lloc B (Camejo, Olsson et al. 2002; Flood, Gustafsson et al. 2004). Tanmateix, es desconeix si el lloc A és funcional en la subpoblació d'LDL(-) que presenta una major unió a PG. Per tant, seria interessant realitzar nous experiments per aprofundir en aquesta possibilitat.

### **3. RELLEVÀNCIA FISIOPATOLÒGICA DE L'ACTIVITAT FOSFOLIPOLÍTICA I LA UNIÓ A PROTEOGLICANS**

Les implicacions de l'activitat fosfolipolítica tipus PLC associada a l'LDL(-) podrien involucrar diverses propietats aterogèniques observades en l'LDL(-), concretament la seva activitat apoptòtica i inflamatòria, i l'elevada susceptibilitat a l'agregació. Aquesta última, al seu torn, podria comportar un diferent mecanisme d'internalització cel·lular i una major unió a PG.

### 3.1. APOPTOSI I INFLAMACIÓ

L'activitat SMasa podria estar relacionada amb el procés apoptòtic mitjançat per l'LDL(-) (Chen, Jiang et al. 2003; Chen, Hosken et al. 2007), ja que com a producte d'aquesta acció enzimàtica es forma ceramida, un important mediador d'apoptosi (Mathias, Pena et al. 1998). La ceramida pot actuar de segon missatger i participar en la senyalització cel·lular de l'aturada de la proliferació i diferenciació cel·lular, i també desencadenar apoptosi (Ohanian and Ohanian 2001). Kinnunen et al. ja van suggerir que l'activitat SMasa intrínseca de l'LDL podria ser un nexa entre l'aterosclerosi i l'apoptosi (Kinnunen and Holopainen 2002). També, l'LDLox indueix apoptosi en SMC per mitjà de la ceramida via activació de l'SMasa neutra (Chatterjee 1999). D'altra banda, l'activitat SMasa incrementada correlaciona amb els nivells elevats de ceramida i apoptosi en mostres de plaques d'ateroma de pacients que van morir d'aterosclerosi (Kinnunen and Holopainen 2002). Els diferents resultats coincideixen amb articles que descriuen la inducció d'apoptosi per part de l'LDL(-) a través de l'activació de caspases (Chen, Jiang et al. 2003; Chen, Hosken et al. 2007; Yang, Chen et al. 2007), fet que es relaciona amb la via apoptòtica dependent de ceramida.

Com que la ceramida actua modificant dominis de membrana que en estar enriquits en ceramida tenen la capacitat d'amplificar senyals, es creu que la seva funció no estaria limitada a la inducció d'apoptosi, sinó que també podria actuar en altres accions com en la inducció de la producció de citoquines (Schenck, Carpinteiro et al. 2007). Entre els pocs treballs publicats sobre el tema, n'hi ha un que descriu que la ceramida és un potent inductor de IL-6 en fibroblasts (Laulederkind, Bielawska et al. 1995). Per tant, es podria pensar que la ceramida produïda per l'acció SMasa intrínseca de l'LDL(-) podria estar relacionada amb la seva capacitat d'induir l'expressió de molècules inflamatòries.

### 3.2. AGREGACIÓ, UNIÓ A RECEPTORS I A PROTEOGLICANS

L'LDL(-) presenta una elevada susceptibilitat a l'agregació (Sanchez-Quesada, Camacho et al. 2003), una propietat que és induïda en l'LDL nativa pel tractament amb SMasa (Pentikainen, Lehtonen et al. 1996). Els resultats obtinguts en la tesi suggereixen que l'auto-agregació de l'LDL(-) podria ser deguda a la seva pròpia activitat fosfolipolítica, ja que la formació d'agregats d'LDL(-) va estar acompanyada per la degradació de SM. Sembla més possible que l'activitat fosfolipolítica sigui la causa de l'augment de l'agregació, però no es pot descartar l'ordre invers, que la major agregació activi l'activitat fosfolipolítica.

D'altra banda, es coneix que les LDL agregades estan involucrades, juntament amb les LDLox, en la formació de cèl·lules espumoses. Els macròfags i SMC presents a la íntima arterial capten les LDL modificades per receptors diferents al rLDL no autoregulats i acumulen lípids intracel·lularment convertint-se en cèl·lules espumoses que empitjoren la lesió. S'ha observat que LDL tractades amb SMasa poden induir la formació de cèl·lules espumoses *in vitro* (Xu and Tabas 1991). Un dels principals receptors pels quals l'LDL agregada seria captada és el LRP1 (Llorente-Cortes, Martinez-Gonzalez et al. 2000). Tanmateix, s'ha descrit que les LDL agregades també poden entrar a les cèl·lules per compartiments connectats a la superfície per un mecanisme no dependent del rLDL (Zhang, Gaynor et al. 1997). Aquest mecanisme sembla relacionat amb el suggerit per Kinnunen et al. en el que especulaven que LDL enriquides amb ceramida, potser formades per l'acció de l'activitat SMasa intrínseca a l'LDL, podrien penetrar a les cèl·lules per auto-endocitosi (Kinnunen and Holopainen 2002). Concretament, van descriure que l'activitat SMasa sobre vesícules unilamelars formava àrees riques en molècules de ceramida que es desprenien creant vesícules endocítiques (Holopainen, Angelova et al. 2000).

En relació a les LDL agregades, es coneix que aquestes partícules presenten una major unió a PG, fet que s'ha observat en l'LDL(-). Així doncs, sembla que hi hauria una relació clara entre la major activitat fosfolipolítica de l'LDL(-), la major agregació i l'afinitat d'unió a PG augmentada.

L'afinitat incrementada pels PG de les partícules d'LDL(-) pot comportar una major retenció d'aquestes lipoproteïnes a la matriu extracel·lular de la íntima arterial i, per tant, conduir al desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques. De fet, un cop les lipoproteïnes queden retingudes a l'espai subendotelial poden oxidar-se o hidrolitzar-se per enzims de la íntima arterial transformant-se en lipoproteïnes més aterogèniques i activar la resposta inflamatòria que complicarà la lesió. La LDL(-) de per si ja presenta propietats aterogèniques a la circulació i, al quedar retinguda per PG, augmentaria el seu efecte a nivell local.

A més de a la matriu extracel·lular, els PG també es troben a la superfície de les cèl·lules on exerceixen funcions importants com ancorar les cèl·lules a la matriu extracel·lular o facilitar la unió de lligands als receptors cel·lulars. Així, l'LDL(-) també podria unir-se més a la superfície cel·lular i ser més fàcilment internalitzada per les cèl·lules espumoses ja que s'ha descrit que els PG poden facilitar la captació de les lipoproteïnes per part de les cèl·lules. Per exemple, s'ha observat que la internalització d'LDL nativa i LDLox depèn de la presència de PG a la superfície dels macròfags (Halvorsen, Aas et al. 1998) o que les LDL tractades amb PLA<sub>2</sub> V promouen la formació de cèl·lules espumoses mitjançant un

procés independent de SRA i CD36 que implica els PG cel·lulars (Boyanovsky, van der Westhuyzen et al. 2005). D'altra banda, la possible major captació de partícules d'LDL(-) unides a la superfície cel·lular també suggereix la major inducció de l'expressió de citokines per part de les cèl·lules. Aquesta interacció entre l'LDL(-) i la cèl·lula tant es podria donar un cop les lipoproteïnes estiguessin retingudes a la paret arterial com circulant lliures pel torrent sanguini, i en ambdós casos, activar la resposta inflamatòria.

En conjunt, la propietat d'unir-se més als PG comportaria que l'LDL(-) seria més aterogènica que l'LDL(+) tenint una major capacitat de retenció subendotelial i adhesió cel·lular que pot facilitar l'activació de la resposta inflamatòria i la formació de cèl·lules espumoses, i, en conseqüència, fer progressar la lesió ateroscleròtica.

#### **4. TÉ UN POSSIBLE PAPER ANTI-ATEROGÈNIC L'LDL(-)?**

La majoria de resultats descrits anteriorment indiquen que l'LDL(-) es una partícula amb propietats pro-inflamatòries i pro-aterogèniques. Tanmateix, algunes de les seves accions, com la inducció de la IL-10, fan pensar que potser l'LDL(-) podria comportar-se, en certa manera, com una partícula anti-inflamatòria. De fet, l'LDL(-) podria ser generada com un mecanisme per limitar els efectes perjudicials exercits per l'oxidació mínima d'LDL sobre les cèl·lules vasculars. Per tant, l'LDL(-) podria ser una conseqüència més que una causa d'inflamació. A continuació, s'hipotetitza sobre dos mecanismes amb una possible funció reguladora de l'LDL(-).

##### **4.1. PAPER MODULADOR DE LA IL-10**

Per una banda, l'LDL(-) exerciria part del seu paper protector mitjançant la citokina anti-inflamatòria IL-10. Com indiquen els resultats del tercer treball, la IL-10 modula la resposta inflamatòria de l'LDL(-) disminuint l'expressió de citokines pro-inflamatòries. Es pot pensar que sense l'acció reguladora de la IL-10, l'alliberament de citokines inflamatòries per part de l'LDL(-) seria major, desequilibrant la resposta en direcció a un estat més pro-inflamatori. De fet, s'ha descrit que l'LDLox, a diferència de l'LDL(-), no indueix l'expressió de IL-10 i en alguns casos l'inhibeix (Varadhachary, Monestier et al. 2001; Groeneweg, Kanters et al. 2006). Així doncs, l'efecte de l'LDL(-) sobre els leucocits circulants podria compensar l'acció inflamatoria que l'LDLox retinguda a la intima arterial podria exercir sobre les cèl·lules de la paret arterial, principalment les endotelials.

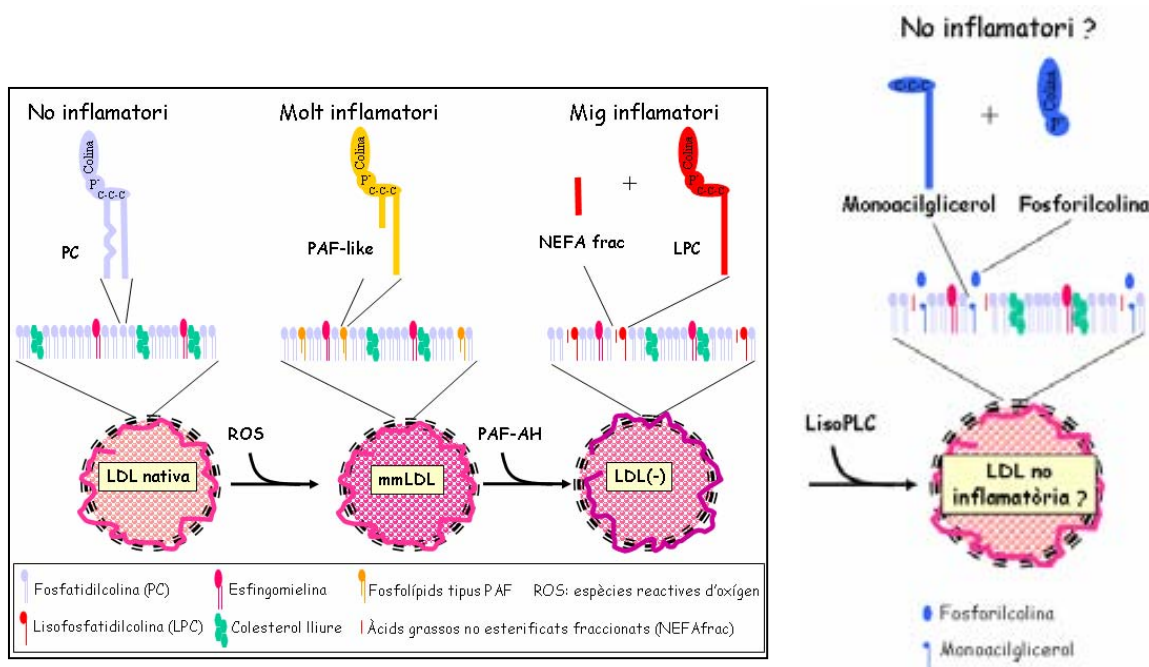


## 4.2. ACTIVITAT LISOPLC

Per altra banda, l'activitat fosfolipolítica lisoPLC podria modular la capacitat inflamatòria de l'LDL(-) conjuntament amb la PAF-AH. Prèviament, el nostre grup va descriure que la PAF-AH podia estar involucrada en l'activitat inflamatòria de l'LDL(-), exercint un efecte modulador (Benitez, Sanchez-Quesada et al. 2003; Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2005). El mecanisme proposat en aquest paper de la PAF-AH unida a LDL seria la formació de productes com LPC i àcids grassos de cadena curta els quals són coneguts promotors d'inflamació (Shi, Zhang et al. 2007), però amb menys potencial del que presenten els fosfolípids oxidats inicials amb activitat tipus PAF (POVPC, PGPC, PEIPC). Així, la PAF-AH podria modular el potencial inflamatori de la LDLmm.

Els resultats obtinguts en el treball de l'activitat fosfolipolítica de l'LDL(-) suposen un altre pas en la situació (Figura 13). Aquests resultats suggereixen que l'activitat lisoPLC present en l'LDL(-) podria anul·lar l'efecte de la LPC generada per la PAF-AH, promovent la seva degradació.

Figura 13. Possible acció protectora conjunta de la PAF-AH i la lisoPLC. Inicialment s'havia proposat la hipòtesi de l'acció protectora de la PAF-AH i ara se li ha afegit l'altra possible acció de la lisoPLC que acabaria convertint les LDL mig inflamatòries (LDL(-)) en LDL no inflamatòries. Figura adaptada de: (Sanchez-Quesada, Benitez et al. 2004).



L'acció de la lisoPLC podria tenir una funció protectora ja que els productes resultants de la seva activitat, la fosforilcolina i el monoacilglicerol, no se'ls ha relacionat amb processos inflamatoris. En conseqüència, l'acció complementària de la PAF-AH i de l'activitat lisoPLC, ambdues presents en l'LDL(-), podria atenuar l'activitat inflamatòria elevada de les LDL mínimament oxidades. També, l'efecte de l'LDL(-) sobre l'LDLox o l'LDL modificada amb PLA<sub>2</sub> degradant el seu contingut en LPC recolza el possible paper protector de l'LDL(-). Seran necessaris més estudis per tal de definir el paper de la possible coordinació entre la PAF-AH i l'activitat lisoPLC presents en l'LDL(-).

**CONCLUSIONS**

## CONCLUSIONS

1. L'LDL(-) promou un fenotip pro-inflamatori en cèl·lules endotelials de vena a través de la producció de citoquines (IL-6), quimioquines (IL8, MCP-1, GRO $\beta$  i GRO $\gamma$ ) i factors de creixement (GM-CSF). El contingut en àcids grassos no esterificats i lisofosfatidilcolina semblen ser en part responsables de l'acció inflamatòria de l'LDL(-).
2. L'acció inflamatòria de l'LDL(-) en cèl·lules endotelials d'origen arterial és semblant a la induïda a cèl·lules endotelials de vena, alliberant a més el factor de creixement PDGF-B i induint una major producció total de cada citoquina. La rellevància dels resultats recau en que la majoria de lesions ateroscleròtiques es donen en artèries.
3. L'LDL(-) promou la secreció de citoquines pro-inflamatòries (IL-6, IL-8, MCP-1, GRO $\beta$  i GRO $\gamma$ ) sobre monòcits i limfòcits, però també indueix l'alliberament de la citoquina anti-inflamatòria IL-10. La IL-10 modula l'acció inflamatòria disminuint la producció de citoquines pro-inflamatòries. L'efecte de la inducció de citoquines de l'LDL(-) és a través de secreció de proteïnes i a nivell transcripcional.
4. S'ha descrit una nova activitat fosfolipolítica tipus fosfolipasa C associada a l'LDL(-) que degrada eficientment fosfolípids amb colina. La degradació d'esfingomielina estaria involucrada en l'agregació augmentada de les partícules d'LDL(-). Per altra banda, la degradació de lisofosfatidilcolina podria suposar un mecanisme de regulació de l'activitat inflamatòria.
5. Una subpoblació de partícules d'LDL(-) té més afinitat d'unió a proteoglicans arterials, respecte a la forma nativa, fet que suggereix una major retenció subendotelial de la partícula que podria contribuir a la progressió de la placa d'ateroma.
6. Les partícules amb major afinitat d'unió a proteoglicans presenten una major activitat fosfolipolítica tipus fosfolipasa C i estan més agregades. Els resultats suggereixen que l'activitat fosfolipolítica podria ser la responsable de la major unió a proteoglicans, ja que promouria l'agregació de les partícules i n'augmentaria l'afinitat d'unió als proteoglicans.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abe, Y., M. Fornage, et al. (2007). "L5, the most electronegative subfraction of plasma LDL, induces endothelial vascular cell adhesion molecule 1 and CXC chemokines, which mediate mononuclear leukocyte adhesion." *Atherosclerosis* **192**(1): 56-66.
- Acton, S., A. Rigotti, et al. (1996). "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor." *Science* **271**(5248): 518-20.
- Aggerbeck, L. P., F. J. Kezdy, et al. (1976). "Enzymatic probes of lipoprotein structure. Hydrolysis of human serum low density lipoprotein-2 by phospholipase A2." *J Biol Chem* **251**(12): 3823-30.
- Aiello, R. J., P. A. Bourassa, et al. (1999). "Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(6): 1518-25.
- Ajuebor, M. N., A. M. Das, et al. (1999). "Regulation of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression and function by endogenous interleukin-10 in a model of acute inflammation." *Biochem Biophys Res Commun* **255**(2): 279-82.
- Akira, S., T. Hirano, et al. (1990). "Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF)." *Faseb J* **4**(11): 2860-7.
- American-Heart-Association <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=183>.
- Apostolopoulos, J., P. Davenport, et al. (1996). "Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(8): 1007-12.
- Aqel, N. M., R. Y. Ball, et al. (1985). "Identification of macrophages and smooth muscle cells in human atherosclerosis using monoclonal antibodies." *J Pathol* **146**(3): 197-204.
- Arai, T., K. Hiromatsu, et al. (1995). "Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during Salmonella infection." *Biochem Biophys Res Commun* **213**(2): 600-7.
- Asatryan, L., R. T. Hamilton, et al. (2005). "LDL phospholipid hydrolysis produces modified electronegative particles with an unfolded apoB-100 protein." *J Lipid Res* **46**(1): 115-22.
- Asmis, R., J. G. Begley, et al. (2005). "Lipoprotein aggregation protects human monocyte-derived macrophages from OxLDL-induced cytotoxicity." *J Lipid Res* **46**(6): 1124-32.
- Auerbach, B. J., J. S. Kiely, et al. (1992). "A spectrophotometric microtiter-based assay for the detection of hydroperoxy derivatives of linoleic acid." *Anal Biochem* **201**(2): 375-80.
- Avogaro, P., G. B. Bon, et al. (1988). "Presence of a modified low density lipoprotein in humans." *Arteriosclerosis* **8**(1): 79-87.
- Avogaro, P., G. Cazzolato, et al. (1991). "Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma." *Atherosclerosis* **91**(1-2): 163-71.
- Azumi, H., K. Hirata, et al. (2003). "Immunohistochemical localization of endothelial cell-derived lipase in atherosclerotic human coronary arteries." *Cardiovasc Res* **58**(3): 647-54.
- Balentien, E., J. H. Han, et al. (1990). "Recombinant expression, biochemical characterization, and biological activities of the human MGSA/gro protein." *Biochemistry* **29**(44): 10225-33.
- Bancells, C., S. Benítez, et al. (2006). "Efecto del contenido en lisofosfatidilcolina y ácidos grasos no esterificados de la LDL sobre la liberación de citoquinas en leucocitos". Santander, XIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. (Veure Annex)
- Barnholz, Y., A. Roitman, et al. (1966). "Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. II. Hydrolysis of sphingomyelin by an enzyme from rat brain." *J Biol Chem* **241**(16): 3731-7.
- Barrett, T. B. and E. P. Benditt (1988). "Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(8): 2810-4.
- Bartold, P. M. and R. C. Page (1985). "A microdetermination method for assaying glycosaminoglycans and proteoglycans." *Anal Biochem* **150**(2): 320-4.
- Basu, S. K., J. L. Goldstein, et al. (1976). "Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(9): 3178-82.

## Bibliografía

- Benitez, S., M. Camacho, et al. (2004). "Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL." *Atherosclerosis* **177**(2): 299-305.
- Benitez, S., J. Ordonez-Llanos, et al. (2004). "Effect of simvastatin in familial hypercholesterolemia on the affinity of electronegative low-density lipoprotein subfractions to the low-density lipoprotein receptor." *Am J Cardiol* **93**(4): 414-20.
- Benitez, S., J. L. Sanchez-Quesada, et al. (2002). "Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids." *Atherosclerosis* **160**(1): 223-32.
- Benitez, S., J. L. Sanchez-Quesada, et al. (2003). "Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction." *Circulation* **108**(1): 92-6.
- Benitez, S., V. Villegas, et al. (2004). "Impaired binding affinity of electronegative low-density lipoprotein (LDL) to the LDL receptor is related to nonesterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content." *Biochemistry* **43**(50): 15863-72.
- Bergmark, C., A. Dewan, et al. (2008). "A novel function of lipoprotein [a] as a preferential carrier of oxidized phospholipids in human plasma." *J Lipid Res* **49**(10): 2230-9.
- Bernfield, M., R. Kokenyesi, et al. (1992). "Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans." *Annu Rev Cell Biol* **8**: 365-93.
- Bhakdi, S., B. Dorweiler, et al. (1995). "On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety." *J Exp Med* **182**(6): 1959-71.
- Birbes, H., S. El Bawab, et al. (2001). "Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis." *Faseb J* **15**(14): 2669-79.
- Bittolo-Bon, G., G. Cazzolato, et al. (1994). "Probucol protects low-density lipoproteins from in vitro and in vivo oxidation." *Pharmacol Res* **29**(4): 337-44.
- Bjornheden, T., M. Levin, et al. (1999). "Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(4): 870-6.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol* **37**(8): 911-7.
- Boissonneault, G. A. and H. J. Heiniger (1984). "25-Hydroxycholesterol-induced elevation in <sup>45</sup>Ca uptake: correlation with depressed DNA synthesis." *J Cell Physiol* **120**(2): 151-6.
- Boisvert, W. A., R. Santiago, et al. (1998). "A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice." *J Clin Invest* **101**(2): 353-63.
- Bomalaski, J. S. and M. A. Clark (1993). "Phospholipase A2 and arthritis." *Arthritis Rheum* **36**(2): 190-8.
- Boren, J., I. Lee, et al. (1998). "Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100." *J Clin Invest* **101**(5): 1084-93.
- Boren, J., K. Olin, et al. (1998). "Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding." *J Clin Invest* **101**(12): 2658-64.
- Boring, L., J. Gosling, et al. (1998). "Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." *Nature* **394**(6696): 894-7.
- Boyanovsky, B. B., D. R. van der Westhuyzen, et al. (2005). "Group V secretory phospholipase A2-modified low density lipoprotein promotes foam cell formation by a SR-A- and CD36-independent process that involves cellular proteoglycans." *J Biol Chem* **280**(38): 32746-52.
- Boyum, A. (1968). "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g." *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**: 77-89.

- Brand, K., T. Eisele, et al. (1997). "Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(10): 1901-9.
- Braschi, S., D. Masson, et al. (1997). "Role of lipoprotein-bound NEFAs in enhancing the specific activity of plasma CETP in the nephrotic syndrome." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(11): 2559-67.
- Bretscher, M. S. and S. Munro (1993). "Cholesterol and the Golgi apparatus." *Science* **261**(5126): 1280-1.
- Brown, A. J. and W. Jessup (1999). "Oxysterols and atherosclerosis." *Atherosclerosis* **142**(1): 1-28.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1983). "Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis." *Annu Rev Biochem* **52**: 223-61.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science* **232**(4746): 34-47.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1999). "A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11041-8.
- Calvo, D., D. Gomez-Coronado, et al. (1998). "Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL." *J Lipid Res* **39**(4): 777-88.
- Camejo, G. (1982). "The interaction of lipids and lipoproteins with the intercellular matrix of arterial tissue: its possible role in atherogenesis." *Adv Lipid Res* **19**: 1-53.
- Camejo, G., E. Hurt-Camejo, et al. (1998). "Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis." *Atherosclerosis* **139**(2): 205-22.
- Camejo, G., U. Olsson, et al. (2002). "The extracellular matrix on atherogenesis and diabetes-associated vascular disease." *Atheroscler Suppl* **3**(1): 3-9.
- Campos, H., K. S. Arnold, et al. (1996). "Differences in receptor binding of LDL subfractions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(6): 794-801.
- Capsoni, F., F. Minonzio, et al. (1998). "Development of phagocytic function of cultured human monocytes is regulated by cell surface IL-10." *Cell Immunol* **189**(1): 51-9.
- Carr, A. C. (2001). "Hypochlorous acid-modified low-density lipoprotein inactivates the lysosomal protease cathepsin B: protection by ascorbic and lipoic acids." *Redox Rep* **6**(6): 343-9.
- Cathcart, M. K., A. K. McNally, et al. (1989). "Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin." *J Immunol* **142**(6): 1963-9.
- Cazzolato, G., P. Avogaro, et al. (1991). "Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC." *Free Radic Biol Med* **11**(3): 247-53.
- Cerf, M., D. Raidoo, et al. (1999). "Plasma kallikrein localisation in human blood vessels." *Immunopharmacology* **44**(1-2): 75-80.
- Cerretti, D. P., N. Nelson, et al. (1993). "The murine homologue of the human interleukin-8 receptor type B maps near the lty-Lsh-Bcg disease resistance locus." *Genomics* **18**(2): 410-3.
- Chang, Y. H., D. S. Abdalla, et al. (1997). "Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein." *Free Radic Biol Med* **23**(2): 202-14.
- Chappey, B., I. Myara, et al. (1995). "Characteristics of ten charge-differing subfractions isolated from human native low-density lipoproteins (LDL). No evidence of peroxidative modifications." *Biochim Biophys Acta* **1259**(3): 261-70.
- Charles, M. A., E. Eschwege, et al. (1997). "The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study." *Diabetologia* **40**(9): 1101-6.
- Chatterjee, S. (1999). "Neutral sphingomyelinase: past, present and future." *Chem Phys Lipids* **102**(1-2): 79-96.
- Chatterton, J. E., M. L. Phillips, et al. (1995). "Immunoelectron microscopy of low density lipoproteins yields a ribbon and bow model for the conformation of apolipoprotein B on the lipoprotein surface." *J Lipid Res* **36**(9): 2027-37.



## Bibliografia

- Chen, C. H., T. Jiang, et al. (2003). "Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription." *Circulation* **107**(16): 2102-8.
- Chen, C. Y., C. M. Lee, et al. (2007). "Proteomic approach to study the effects of various oxidatively modified low-density lipoprotein on regulation of protein expression in human umbilical vein endothelial cell." *Life Sci* **80**(26): 2469-80.
- Chen, H. H., B. D. Hosken, et al. (2007). "Electronegative LDLs from familial hypercholesterolemic patients are physicochemically heterogeneous but uniformly proapoptotic." *J Lipid Res* **48**(1): 177-84.
- Chen, X. P. and G. H. Du (2007). "Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: protein, ligands, expression and pathophysiological significance." *Chin Med J (Engl)* **120**(5): 421-6.
- Chen, X. P., K. L. Xun, et al. (2007). "Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of reactive oxygen species." *Vascul Pharmacol* **47**(1): 1-9.
- Cheng, Y., A. Nilsson, et al. (2002). "Purification, characterization, and expression of rat intestinal alkaline sphingomyelinase." *J Lipid Res* **43**(2): 316-24.
- Chien, M. W., C. S. Chien, et al. (2003). "OxLDL induces mitogen-activated protein kinase activation mediated via PI3-kinase/Akt in vascular smooth muscle cells." *J Lipid Res* **44**(9): 1667-75.
- Chomarat, P., J. Banchereau, et al. (2000). "IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages." *Nat Immunol* **1**(6): 510-4.
- Claise, C., M. Edeas, et al. (1996). "Oxidized low-density lipoprotein induces the production of interleukin-8 by endothelial cells." *FEBS Lett* **398**(2-3): 223-7.
- Cohen, S. B., J. B. Crawley, et al. (1997). "Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2." *Immunology* **92**(1): 1-5.
- Cowburn, A. S., J. Deighton, et al. (2004). "The survival effect of TNF-alpha in human neutrophils is mediated via NF-kappa B-dependent IL-8 release." *Eur J Immunol* **34**(6): 1733-43.
- Cushing, S. D., J. A. Berliner, et al. (1990). "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(13): 5134-8.
- Dai, L., Z. Zhang, et al. (1997). "A modified form of low-density lipoprotein with increased electronegative charge is present in rheumatoid arthritis synovial fluid." *Free Radic Biol Med* **22**(4): 705-10.
- Daugherty, A., B. S. Zweifel, et al. (1988). "Isolation of low density lipoprotein from atherosclerotic vascular tissue of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits." *Arteriosclerosis* **8**(6): 768-77.
- Davidson, M. H., M. A. Corson, et al. (2008). "Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines." *Am J Cardiol* **101**(12A): 51F-57F.
- Davidsson, P., J. Hulthe, et al. (2005). "A proteomic study of the apolipoproteins in LDL subclasses in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes." *J Lipid Res* **46**(9): 1999-2006.
- Davis, H. R., S. Glagov, et al. (1985). "Role of acid lipase in cholesteryl ester accumulation during atherogenesis. Correlation of enzyme activity with acid lipase-containing macrophages in rabbit and human lesions." *Atherosclerosis* **55**(2): 205-15.
- Dawber, T. R. (1980). *The Framingham Study: the epidemiology of atherosclerotic disease*. Cambridge MA, Harvard University Press.
- De Castellarnau, C., J. L. Sanchez-Quesada, et al. (2000). "Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(10): 2281-7.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, et al. (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." *J Exp Med* **174**(5): 1209-20.
- Demuth, K., I. Myara, et al. (1996). "A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(6): 773-83.

- Deng, D. X., A. Tsalenko, et al. (2006). "Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli." *Circ Res* **98**(2): 200-8.
- Driessler, F., K. Venstrom, et al. (2004). "Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50." *Clin Exp Immunol* **135**(1): 64-73.
- Edwards, I. J., J. D. Wagner, et al. (1999). "Glycation of plasma low density lipoproteins increases interaction with arterial proteoglycans." *Diabetes Res Clin Pract* **46**(1): 9-18.
- Edwards, I. J., H. Xu, et al. (1995). "Differentiated macrophages synthesize a heparan sulfate proteoglycan and an oversulfated chondroitin sulfate proteoglycan that bind lipoprotein lipase." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(3): 400-9.
- Endemann, G., L. W. Stanton, et al. (1993). "CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein." *J Biol Chem* **268**(16): 11811-6.
- Erren, M., H. Reinecke, et al. (1999). "Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(10): 2355-63.
- Esterbauer, H., M. Dieber-Rotheneder, et al. (1991). "Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein." *Am J Clin Nutr* **53**(1 Suppl): 314S-321S.
- Esterbauer, H., J. Gebicki, et al. (1992). "The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL." *Free Radic Biol Med* **13**(4): 341-90.
- Esterbauer, H., G. Jurgens, et al. (1987). "Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes." *J Lipid Res* **28**(5): 495-509.
- Feng, B. and I. Tabas (2002). "ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity." *J Biol Chem* **277**(45): 43271-80.
- Feng, B., P. M. Yao, et al. (2003). "The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages." *Nat Cell Biol* **5**(9): 781-92.
- Ferns, G. A., K. H. Sprugel, et al. (1990). "Relative platelet-derived growth factor receptor subunit expression determines cell migration to different dimeric forms of PDGF." *Growth Factors* **3**(4): 315-24.
- Flood, C., M. Gustafsson, et al. (2004). "Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(3): 564-70.
- Fong, L. G., S. Parthasarathy, et al. (1987). "Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100." *J Lipid Res* **28**(12): 1466-77.
- Forte, T. and A. V. Nichols (1972). "Application of electron microscopy to the study of plasma lipoprotein structure." *Adv Lipid Res* **10**: 1-41.
- Frostedgard, J., Y. H. Huang, et al. (1997). "Platelet-activating factor and oxidized LDL induce immune activation by a common mechanism." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(5): 963-8.
- Galis, Z. S., M. Z. Alavi, et al. (1992). "In situ ultrastructural characterization of chondroitin sulfate proteoglycans in normal rabbit aorta." *J Histochem Cytochem* **40**(2): 251-63.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1994). "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques." *J Clin Invest* **94**(6): 2493-503.
- Gelb, M. H., E. Valentin, et al. (2000). "Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A2." *J Biol Chem* **275**(51): 39823-6.
- Gerszten, R. E., E. A. Garcia-Zepeda, et al. (1999). "MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions." *Nature* **398**(6729): 718-23.
- Ghosh, N., R. Sabbadini, et al. (1998). "Identification, partial purification, and localization of a neutral sphingomyelinase in rabbit skeletal muscle: neutral sphingomyelinase in skeletal muscle." *Mol Cell Biochem* **189**(1-2): 161-8.

## Bibliografia

- Giambartolomei, G. H., V. A. Dennis, et al. (2002). "Autocrine and exocrine regulation of interleukin-10 production in THP-1 cells stimulated with *Borrelia burgdorferi* lipoproteins." *Infect Immun* **70**(4): 1881-8.
- Gimpl, G., K. Burger, et al. (1997). "Cholesterol as modulator of receptor function." *Biochemistry* **36**(36): 10959-74.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1983). *Familial hypercholesterolemia. The metabolic basis of inherited disease.* J. B. Stanbury, Wyngaarden, D. S. Fredrikson, J. L. Goldstein and M. S. Brown. New York, McGraw-Hill: 672-712.
- Goldstein, J. L., M. S. Brown, et al. (1985). "Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system." *Annu Rev Cell Biol* **1**: 1-39.
- Goldstein, J. L., Y. K. Ho, et al. (1979). "Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(1): 333-7.
- Gomez-Cambronero, J., J. Horn, et al. (2003). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway." *J Immunol* **171**(12): 6846-55.
- Gomez-Munoz, A. (1998). "Modulation of cell signalling by ceramides." *Biochim Biophys Acta* **1391**(1): 92-109.
- Goni, F. M. and A. Alonso (2002). "Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity." *FEBS Lett* **531**(1): 38-46.
- Gosling, J., S. Slaymaker, et al. (1999). "MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B." *J Clin Invest* **103**(6): 773-8.
- Greilberger, J., X. Wang, et al. (1999). "Presence of aldehydic epitopes on a minor low-density lipoprotein fraction." *Free Radic Biol Med* **26**(11-12): 1489-94.
- Groeneweg, M., E. Kanters, et al. (2006). "Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine macrophages is enhanced by prior exposure to oxLDL." *J Lipid Res* **47**(10): 2259-67.
- Gugliucci Ceriche, A. and A. J. Stahl (1993). "Glycation and oxidation of human low density lipoproteins reduces heparin binding and modifies charge." *Scand J Clin Lab Invest* **53**(2): 125-32.
- Haberland, M. E. and U. P. Steinbrecher (1992). *Modified low density lipoproteins: Diversity and biological relevance in atherogenesis. Molecular genetics of coronary artery disease. Candidate genes and processes in atherosclerosis.* A. J. Lusis, J. I. Rotter and R. S. Sparks, monogr Hum Genet: 36-61.
- Halvorsen, B., U. K. Aas, et al. (1998). "Proteoglycans in macrophages: characterization and possible role in the cellular uptake of lipoproteins." *Biochem J* **331** ( Pt 3): 743-52.
- Hannun, Y. A., C. Luberto, et al. (2001). "Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling." *Biochemistry* **40**(16): 4893-903.
- Hardwick, S. J., L. Hegyi, et al. (1996). "Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein." *J Pathol* **179**(3): 294-302.
- Hart, C. E. and A. W. Clowes (1997). "Platelet-derived growth factor and arterial response to injury." *Circulation* **95**(3): 555-6.
- Hasham, S. N. and S. Pillarisetti (2006). "Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis." *Clin Chim Acta* **372**(1-2): 179-83.
- Haug, C., C. Lenz, et al. (2004). "Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(10): 1823-9.
- Haust, M. D. (1971). "The morphogenesis and fate of potential and early atherosclerotic lesions in man." *Hum Pathol* **2**(1): 1-29.
- Havel, R. J., H. A. Eder, et al. (1955). "The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum." *J Clin Invest* **34**(9): 1345-53.

- Heeschen, C., S. Dimmeler, et al. (2003). "Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes." *Circulation* **107**(16): 2109-14.
- Heinecke, J. W., H. Rosen, et al. (1987). "The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells." *J Biol Chem* **262**(21): 10098-103.
- Heldin, C. H. and B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." *Physiol Rev* **79**(4): 1283-316.
- Herz, J., U. Hamann, et al. (1988). "Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor." *Embo J* **7**(13): 4119-27.
- Hevonoja, T., M. O. Pentikainen, et al. (2000). "Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL." *Biochim Biophys Acta* **1488**(3): 189-210.
- Higazi, A. A., T. Nassar, et al. (2000). "The alpha-defensins stimulate proteoglycan-dependent catabolism of low-density lipoprotein by vascular cells: a new class of inflammatory apolipoprotein and a possible contributor to atherogenesis." *Blood* **96**(4): 1393-8.
- Hiltunen, T. P. and S. Yla-Herttuala (1998). "Expression of lipoprotein receptors in atherosclerotic lesions." *Atherosclerosis* **137 Suppl**: S81-8.
- Hobbs, H. H., M. S. Brown, et al. (1992). "Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia." *Hum Mutat* **1**(6): 445-66.
- Hobbs, H. H., M. S. Brown, et al. (1986). "Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia." *J Biol Chem* **261**(28): 13114-20.
- Hodis, H. N., D. M. Krams, et al. (1994). "Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-)." *J Lipid Res* **35**(4): 669-77.
- Holopainen, J. M., M. I. Angelova, et al. (2000). "Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes." *Biophys J* **78**(2): 830-8.
- Holopainen, J. M., O. P. Medina, et al. (2000). "Sphingomyelinase activity associated with human plasma low density lipoprotein." *J Biol Chem* **275**(22): 16484-9.
- Holvoet, P., G. Perez, et al. (1995). "Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease." *J Clin Invest* **95**(6): 2611-9.
- Huang, H. W., E. M. Goldberg, et al. (1996). "Ceramide induces structural defects into phosphatidylcholine bilayers and activates phospholipase A2." *Biochem Biophys Res Commun* **220**(3): 834-8.
- Hurt-Camejo, E., G. Camejo, et al. (2001). "Phospholipase A(2) in vascular disease." *Circ Res* **89**(4): 298-304.
- Hurt-Camejo, E., G. Camejo, et al. (1990). "Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages." *J Lipid Res* **31**(8): 1387-98.
- Hussain, M. M. (2001). "Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family." *Front Biosci* **6**: D417-28.
- Hwang, P. L. (1992). "Inhibitors of protein and RNA synthesis block the cytotoxic effects of oxygenated sterols." *Biochim Biophys Acta* **1136**(1): 5-11.
- Ikeda, U., M. Ikeda, et al. (1992). "Interleukin 6 gene transcripts are expressed in atherosclerotic lesions of genetically hyperlipidemic rabbits." *Atherosclerosis* **92**(2-3): 213-8.
- Ikeda, U., T. Ito, et al. (2001). "Interleukin-6 and acute coronary syndrome." *Clin Cardiol* **24**(11): 701-4.
- Ip, J. H., V. Fuster, et al. (1990). "Exploration of the atherosclerotic plaque." *Biomed Pharmacother* **44**(7): 343-52.

## Bibliografia

- Isoda, K., E. Folco, et al. (2008). "Glycated LDL increases monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis." *Atherosclerosis* **198**(2): 307-12.
- Iverius, P. H. (1972). "The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans." *J Biol Chem* **247**(8): 2607-13.
- Iwase, M., K. Sonoki, et al. (2008). "Lysophosphatidylcholine contents in plasma LDL in patients with type 2 diabetes mellitus: relation with lipoprotein-associated phospholipase A2 and effects of simvastatin treatment." *Atherosclerosis* **196**(2): 931-6.
- Janes, P. W., S. C. Ley, et al. (1999). "Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor." *J Cell Biol* **147**(2): 447-61.
- Ji, Z. S., W. J. Brecht, et al. (1993). "Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells." *J Biol Chem* **268**(14): 10160-7.
- Jones, N. L., G. J. Heigenhauser, et al. (1980). "Fat metabolism in heavy exercise." *Clin Sci (Lond)* **59**(6): 469-78.
- Kaartinen, M., A. Penttila, et al. (1994). "Mast cells of two types differing in neutral protease composition in the human aortic intima. Demonstration of tryptase- and tryptase/chymase-containing mast cells in normal intimas, fatty streaks, and the shoulder region of atheromas." *Arterioscler Thromb* **14**(6): 966-72.
- Karabina, S. A., M. C. Elisaf, et al. (1996). "PAF-acetylhydrolase activity of Lp(a) before and during Cu(2+)-induced oxidative modification in vitro." *Atherosclerosis* **125**(1): 121-34.
- Karlsson, H., P. Leanderson, et al. (2005). "Lipoproteomics I: mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry." *Proteomics* **5**(2): 551-65.
- Kataoka, H., N. Kume, et al. (2001). "Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(6): 955-60.
- Khan, B. V., S. S. Parthasarathy, et al. (1995). "Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells." *J Clin Invest* **95**(3): 1262-70.
- Kinnunen, P. K. and J. M. Holopainen (2002). "Sphingomyelinase activity of LDL: a link between atherosclerosis, ceramide, and apoptosis?" *Trends Cardiovasc Med* **12**(1): 37-42.
- Kishikawa, H., T. Shimokama, et al. (1993). "Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **423**(6): 433-42.
- Kita, T., M. S. Brown, et al. (1982). "Delayed clearance of very low density and intermediate density lipoproteins with enhanced conversion to low density lipoprotein in WHHL rabbits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(18): 5693-7.
- Kleinman, Y., E. S. Krul, et al. (1988). "Lipolysis of LDL with phospholipase A2 alters the expression of selected apoB-100 epitopes and the interaction of LDL with cells." *J Lipid Res* **29**(6): 729-43.
- Klouche, M., S. Gottschling, et al. (1998). "Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(9): 1376-85.
- Klouche, M., S. Rose-John, et al. (2000). "Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation." *Circulation* **101**(15): 1799-805.
- Knolle, P. A., A. Uhrig, et al. (1998). "Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells." *Hepatology* **27**(1): 93-9.
- Kohler, N. and A. Lipton (1974). "Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity." *Exp Cell Res* **87**(2): 297-301.

- Kolesnick, R. N., F. M. Goni, et al. (2000). "Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects." *J Cell Physiol* **184**(3): 285-300.
- Kolset, S. O. and J. T. Gallagher (1990). "Proteoglycans in haemopoietic cells." *Biochim Biophys Acta* **1032**(2-3): 191-211.
- Kovanen, P. T. (1993). "The mast cell--a potential link between inflammation and cellular cholesterol deposition in atherogenesis." *Eur Heart J* **14 Suppl K**: 105-17.
- Kronke, M. (1999). "Involvement of sphingomyelinases in TNF signaling pathways." *Chem Phys Lipids* **102**(1-2): 157-66.
- Ku, G., C. E. Thomas, et al. (1992). "Induction of interleukin 1 beta expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxyoctadecadienoic acid." *J Biol Chem* **267**(20): 14183-8.
- Kugiyama, K., Y. Ota, et al. (2000). "Prognostic value of plasma levels of secretory type II phospholipase A2 in patients with unstable angina pectoris." *Am J Cardiol* **86**(7): 718-22.
- Kuhn, R., J. Lohler, et al. (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." *Cell* **75**(2): 263-74.
- Kume, N., M. I. Cybulsky, et al. (1992). "Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells." *J Clin Invest* **90**(3): 1138-44.
- Lam, T. K., A. Carpentier, et al. (2003). "Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(5): E863-73.
- Lauderkind, S. J., A. Bielawska, et al. (1995). "Ceramide induces interleukin 6 gene expression in human fibroblasts." *J Exp Med* **182**(2): 599-604.
- Leake, D. S. (1997). "Does an acidic pH explain why low density lipoprotein is oxidised in atherosclerotic lesions?" *Atherosclerosis* **129**(2): 149-57.
- Lee, H., W. Shi, et al. (2000). "Role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in oxidized phospholipid-induced synthesis of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells." *Circ Res* **87**(6): 516-21.
- Leonarduzzi, G., M. C. Arkan, et al. (2000). "Lipid oxidation products in cell signaling." *Free Radic Biol Med* **28**(9): 1370-8.
- Leventhal, A. R., W. Chen, et al. (2001). "Acid sphingomyelinase-deficient macrophages have defective cholesterol trafficking and efflux." *J Biol Chem* **276**(48): 44976-83.
- Lewis, K. E., E. A. Kirk, et al. (2004). "Increase in serum amyloid A evoked by dietary cholesterol is associated with increased atherosclerosis in mice." *Circulation* **110**(5): 540-5.
- Li, D., L. Liu, et al. (2003). "LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells." *Circulation* **107**(4): 612-7.
- Li, D. and J. L. Mehta (2000). "Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(4): 1116-22.
- Li, Y., R. F. Schwabe, et al. (2005). "Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis." *J Biol Chem* **280**(23): 21763-72.
- Lin, S. J., H. T. Yen, et al. (2003). "Expression of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist in oxLDL-treated human aortic smooth muscle cells and in the neointima of cholesterol-fed endothelia-denuded rabbits." *J Cell Biochem* **88**(4): 836-47.
- Linden, T., G. Bondjers, et al. (1989). "Affinity of LDL to a human arterial proteoglycan among male survivors of myocardial infarction." *Eur J Clin Invest* **19**(1): 38-44.
- Lindmark, E., T. Tenno, et al. (1998). "IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood." *Br J Haematol* **102**(2): 597-604.

## Bibliografia

- Liscum, L. and N. J. Munn (1999). "Intracellular cholesterol transport." *Biochim Biophys Acta* **1438**(1): 19-37.
- Liu, H., D. G. Scraba, et al. (1993). "Prevention of phospholipase-C induced aggregation of low density lipoprotein by amphipathic apolipoproteins." *FEBS Lett* **316**(1): 27-33.
- Liu, P., Y. Ying, et al. (1996). "Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae." *J Biol Chem* **271**(17): 10299-303.
- Liu, Y., D. Li, et al. (2006). "Inhibition of atherosclerosis in LDLR knockout mice by systemic delivery of adeno-associated virus type 2-hIL-10." *Atherosclerosis* **188**: 19-27.
- Llorente-Cortes, V. and L. Badimon (2005). "LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(3): 497-504.
- Llorente-Cortes, V., P. Costales, et al. (2006). "Sterol regulatory element-binding protein-2 negatively regulates low density lipoprotein receptor-related protein transcription." *J Mol Biol* **359**(4): 950-60.
- Llorente-Cortes, V., J. Martinez-Gonzalez, et al. (2000). "LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(6): 1572-9.
- Lobley, A., L. Whitmore, et al. (2002). "DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra." *Bioinformatics* **18**(1): 211-2.
- Loidl, A., R. Claus, et al. (2004). "Role of ceramide in activation of stress-associated MAP kinases by minimally modified LDL in vascular smooth muscle cells." *Biochim Biophys Acta* **1690**(2): 150-8.
- Lopez, S., L. Vila, et al. (1993). "Interleukin-1 increases 15-hydroxyeicosatetraenoic acid formation in cultured human endothelial cells." *Biochim Biophys Acta* **1170**(1): 17-24.
- Lougheed, M., E. D. Moore, et al. (1999). "Uptake of oxidized LDL by macrophages differs from that of acetyl LDL and leads to expansion of an acidic endolysosomal compartment." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(8): 1881-90.
- Lu, J., W. Jiang, et al. (2008). "Electronegative LDL impairs vascular endothelial cell integrity in diabetes by disrupting fibroblast growth factor 2 (FGF2) autoregulation." *Diabetes* **57**(1): 158-66.
- Lu, J., J. H. Yang, et al. (2009). "Mediation of Electronegative Low-Density Lipoprotein Signaling by LOX-1. A Possible Mechanism of Endothelial Apoptosis." *Circ Res*.
- Lund-Katz, S., P. M. Laplaud, et al. (1998). "Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies: implication for LDL receptor interaction." *Biochemistry* **37**(37): 12867-74.
- Lund-Katz, S. and M. C. Phillips (1986). "Packing of cholesterol molecules in human low-density lipoprotein." *Biochemistry* **25**(7): 1562-8.
- Lyons, T. J. and A. J. Jenkins (1997). "Lipoprotein glycation and its metabolic consequences." *Curr Opin Lipidol* **8**(3): 174-80.
- Mackay, J. and G. Mensah (2004). *The atlas of heart disease and stroke*. Geneva, World Health Organization.
- MacPhee, C. H., K. E. Moores, et al. (1999). "Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor." *Biochem J* **338** ( Pt 2): 479-87.
- Mahley, R. W., K. H. Weisgraber, et al. (1979). "Interaction of plasma lipoproteins containing apolipoproteins B and E with heparin and cell surface receptors." *Biochim Biophys Acta* **575**(1): 81-91.
- Malik, A. B. and S. K. Lo (1996). "Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation." *Pharmacol Rev* **48**(2): 213-29.
- Mallat, Z., C. Heymes, et al. (1999). "Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(3): 611-6.

- Maor, I., T. Hayek, et al. (2000). "Macrophage-released proteoglycans enhance LDL aggregation: studies in aorta from apolipoprotein E-deficient mice." *Atherosclerosis* **150**(1): 91-101.
- Marathe, S., G. Kuriakose, et al. (1999). "Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(11): 2648-58.
- Marathe, S., S. L. Schissel, et al. (1998). "Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling." *J Biol Chem* **273**(7): 4081-8.
- Mathias, S., L. A. Pena, et al. (1998). "Signal transduction of stress via ceramide." *Biochem J* **335** (Pt 3): 465-80.
- Matsuo, Y., A. Yamada, et al. (1996). "A distant evolutionary relationship between bacterial sphingomyelinase and mammalian DNase I." *Protein Sci* **5**(12): 2459-67.
- May, A. E., R. Schmidt, et al. (2005). "Plasminogen and matrix metalloproteinase activation by enzymatically modified low density lipoproteins in monocytes and smooth muscle cells." *Thromb Haemost* **93**(4): 710-5.
- Maziere, C., M. Auclair, et al. (1996). "Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF kappa B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells." *Biochem Mol Biol Int* **39**(6): 1201-7.
- McNamara, J. R., D. M. Small, et al. (1996). "Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein B." *J Lipid Res* **37**(9): 1924-35.
- Menschikowski, M., M. Kasper, et al. (1995). "Secretory group II phospholipase A2 in human atherosclerotic plaques." *Atherosclerosis* **118**(2): 173-81.
- Merkel, M., Y. Kako, et al. (1998). "Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13841-6.
- Miller, Y. I., S. Viriyakosol, et al. (2005). "Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(6): 1213-9.
- Mizia-Stec, K., Z. Gasior, et al. (2003). "Serum tumour necrosis factor-alpha, interleukin-2 and interleukin-10 activation in stable angina and acute coronary syndromes." *Coron Artery Dis* **14**(6): 431-8.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* **19**: 683-765.
- Moro, E., P. Alessandrini, et al. (1999). "Is glycation of low density lipoproteins in patients with Type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition?" *Diabet Med* **16**(8): 663-9.
- Moro, E., C. Zambon, et al. (1998). "Electronegative low density lipoprotein subform (LDL-) is increased in type 2 (non-insulin-dependent) microalbuminuric diabetic patients and is closely associated with LDL susceptibility to oxidation." *Acta Diabetol* **35**(3): 161-4.
- Moser, B., C. Schumacher, et al. (1991). "Neutrophil-activating peptide 2 and gro/melanoma growth-stimulatory activity interact with neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 receptors on human neutrophils." *J Biol Chem* **266**(16): 10666-71.
- Movat, H. Z., M. D. Haust, et al. (1959). "The morphologic elements in the early lesions of arteriosclerosis." *Am J Pathol* **35**(1): 93-101.
- Muñoz, C., D. Pascual-Salcedo, et al. (1996). "Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity." *Blood* **88**(9): 3482-90.
- Mysliwska, J., K. Zorena, et al. (2005). "High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients." *Eur Cytokine Netw* **16**(2): 117-22.
- Nabata, T., S. Morimoto, et al. (1990). "Interleukin-6 stimulates c-myc expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells." *Biochem Int* **20**(3): 445-53.



## Bibliografia

- Naghavi, M., R. John, et al. (2002). "pH Heterogeneity of human and rabbit atherosclerotic plaques; a new insight into detection of vulnerable plaque." *Atherosclerosis* **164**(1): 27-35.
- Naseem, K. M. (2005). "The role of nitric oxide in cardiovascular diseases." *Mol Aspects Med* **26**(1-2): 33-65.
- Nelken, N. A., S. R. Coughlin, et al. (1991). "Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques." *J Clin Invest* **88**(4): 1121-7.
- Nevalainen, T. J. (1993). "Serum phospholipases A2 in inflammatory diseases." *Clin Chem* **39**(12): 2453-9.
- Newby, A. C. (2000). "An overview of the vascular response to injury: a tribute to the late Russell Ross." *Toxicol Lett* **112-113**: 519-29.
- Ni, W., K. Egashira, et al. (2001). "New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice." *Circulation* **103**(16): 2096-101.
- Nichols, A. V., R. M. Krauss, et al. (1986). "Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis." *Methods Enzymol* **128**: 417-31.
- Nigon, F., P. Lesnik, et al. (1991). "Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor." *J Lipid Res* **32**(11): 1741-53.
- Nilsson, A. and R. D. Duan (1999). "Alkaline sphingomyelinases and ceramidases of the gastrointestinal tract." *Chem Phys Lipids* **102**(1-2): 97-105.
- Nordestgaard, B. G., R. Wootton, et al. (1995). "Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits in vivo. Molecular size as a determinant of fractional loss from the intima-inner media." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(4): 534-42.
- Noto, H., P. Chitkara, et al. (2006). "The role of lipoprotein-associated phospholipase A(2) in the metabolic syndrome and diabetes." *J Diabetes Complications* **20**(6): 343-8.
- Nyssonen, K., J. Kaikkonen, et al. (1996). "Characterization and determinants of an electronegatively charged low-density lipoprotein in human plasma." *Scand J Clin Lab Invest* **56**(8): 681-9.
- O'Brien, K. D., K. L. Olin, et al. (1998). "Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins." *Circulation* **98**(6): 519-27.
- O'Brien, K. D., S. Vuletic, et al. (2003). "Cell-associated and extracellular phospholipid transfer protein in human coronary atherosclerosis." *Circulation* **108**(3): 270-4.
- O'Garra, A., P. L. Vieira, et al. (2004). "IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage." *J Clin Invest* **114**(10): 1372-8.
- Ohanian, J. and V. Ohanian (2001). "Sphingolipids in mammalian cell signalling." *Cell Mol Life Sci* **58**(14): 2053-68.
- Olin-Lewis, K., R. M. Krauss, et al. (2002). "ApoC-III content of apoB-containing lipoproteins is associated with binding to the vascular proteoglycan biglycan." *J Lipid Res* **43**(11): 1969-77.
- Olsson, U., G. Camejo, et al. (1997). "Possible functional interactions of apolipoprotein B-100 segments that associate with cell proteoglycans and the ApoB/E receptor." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(1): 149-55.
- Olsson, U., G. Ostergren-Lunden, et al. (2001). "Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction." *Glycoconj J* **18**(10): 789-97.
- Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." *Cell Signal* **12**(1): 1-13.
- Oorni, K., J. K. Hakala, et al. (1998). "Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles. Two distinct mechanisms leading to increased binding strength of LDL to human aortic proteoglycans." *J Biol Chem* **273**(44): 29127-34.

- Oorni, K., M. O. Pentikainen, et al. (2000). "Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions." *J Lipid Res* **41**(11): 1703-14.
- Oorni, K., M. O. Pentikainen, et al. (1997). "Oxidation of low density lipoprotein particles decreases their ability to bind to human aortic proteoglycans. Dependence on oxidative modification of the lysine residues." *J Biol Chem* **272**(34): 21303-11.
- Oorni, K., P. Posio, et al. (2005). "Sphingomyelinase induces aggregation and fusion of small very low-density lipoprotein and intermediate-density lipoprotein particles and increases their retention to human arterial proteoglycans." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(8): 1678-83.
- Oorni, K., M. Sneek, et al. (2004). "Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro." *J Biol Chem* **279**(33): 34776-84.
- Osterud, B. and E. Bjorklid (2003). "Role of monocytes in atherogenesis." *Physiol Rev* **83**(4): 1069-112.
- Paananen, K. and P. T. Kovanen (1994). "Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles independently strengthen their binding to exocytosed mast cell granules." *J Biol Chem* **269**(3): 2023-31.
- Paananen, K., J. Saarinen, et al. (1995). "Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles strengthen their binding to human aortic proteoglycans." *J Biol Chem* **270**(20): 12257-62.
- Papadopoulou, C., V. Corrigan, et al. (2008). "The role of the chemokines MCP-1, GRO-alpha, IL-8 and their receptors in the adhesion of monocytic cells to human atherosclerotic plaques." *Cytokine* **43**(2): 181-6.
- Parasassi, T., G. Bittolo-Bon, et al. (2001). "Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-)." *Free Radic Biol Med* **31**(1): 82-9.
- Patton, G. M. and S. J. Robins (1998). Separation and quantitation of phospholipid classes by HPLC. Totowa, New Jersey, Humana Press.
- Peng, S. K., C. B. Taylor, et al. (1985). "Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage." *Atherosclerosis* **54**(2): 121-33.
- Pentikainen, M. O., E. M. Lehtonen, et al. (1996). "Aggregation and fusion of modified low density lipoprotein." *J Lipid Res* **37**(12): 2638-49.
- Perregaux, D. G., D. Dean, et al. (1995). "Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence." *Mol Pharmacol* **48**(3): 433-42.
- Pinderski Oslund, L. J., C. C. Hedrick, et al. (1999). "Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(12): 2847-53.
- Pitas, R. E. (1990). "Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells. Up-regulation by phorbol esters." *J Biol Chem* **265**(21): 12722-7.
- Plenz, G., S. Reichenberg, et al. (1999). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) modulates the expression of type VIII collagen mRNA in vascular smooth muscle cells and both are codistributed during atherogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(7): 1658-68.
- Podrez, E. A., D. Schmitt, et al. (1999). "Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro." *J Clin Invest* **103**(11): 1547-60.
- Polacek, D., R. E. Byrne, et al. (1988). "Modification of low density lipoproteins by polymorphonuclear cell elastase leads to enhanced uptake by human monocyte-derived macrophages via the low density lipoprotein receptor pathway." *J Lipid Res* **29**(6): 797-808.
- Pollard, H., A. M. Scanu, et al. (1969). "On the geometrical arrangement of the protein subunits of human serum low-density lipoprotein: evidence for a dodecahedral model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **64**(1): 304-10.
- Potteaux, S., B. Esposito, et al. (2004). "Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(8): 1474-8.

## Bibliografia

- Prinz, W. (2002). "Cholesterol trafficking in the secretory and endocytic systems." *Semin Cell Dev Biol* **13**(3): 197-203.
- Radding, C. M. and D. Steinberg (1960). "Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices." *J Clin Invest* **39**: 1560-9.
- Rahimi, A. A., K. Gee, et al. (2005). "STAT-1 mediates the stimulatory effect of IL-10 on CD14 expression in human monocytic cells." *J Immunol* **174**(12): 7823-32.
- Raines, E. W. (2004). "PDGF and cardiovascular disease." *Cytokine Growth Factor Rev* **15**(4): 237-54.
- Raines, E. W., D. F. Bowen-Pope, et al. (1990). Platelet-derived growth factor. *Handbook of Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factors and their Receptors I*. M. B. Sporn and A. B. Roberts. Springer, New York. **vol. 95/I**: 173–262.
- Ramsamy, T. A., T. A. Neville, et al. (2000). Apolipoprotein A-I regulates lipid hydrolysis by hepatic lipase. *J Biol Chem*. **275**: 33480-6.
- Ramstedt, B. and J. P. Slotte (1999). "Interaction of cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: a comparative study of the effect of the chain length." *Biophys J* **76**(2): 908-15.
- Rao, G. N., R. W. Alexander, et al. (1995). "Linoleic acid and its metabolites, hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulate c-Fos, c-Jun, and c-Myc mRNA expression, mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells." *J Clin Invest* **96**(2): 842-7.
- Reagan, J. W., Jr., M. L. Hubbert, et al. (2000). "Posttranslational regulation of acid sphingomyelinase in niemann-pick type C1 fibroblasts and free cholesterol-enriched chinese hamster ovary cells." *J Biol Chem* **275**(48): 38104-10.
- Reape, T. J. and P. H. Groot (1999). "Chemokines and atherosclerosis." *Atherosclerosis* **147**(2): 213-25.
- Ricchetti, G. A., L. M. Williams, et al. (2004). "Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide." *J Leukoc Biol* **76**(3): 719-26.
- Ridker, P. M. (2003). "Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention." *Circulation* **107**(3): 363-9.
- Ridker, P. M., N. Rifai, et al. (2000). "Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men." *Circulation* **101**(15): 1767-72.
- Roebuck, K. A., L. R. Carpenter, et al. (1999). "Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF-kappaB." *J Leukoc Biol* **65**(3): 291-8.
- Rong, J. X., J. W. Berman, et al. (2002). "Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(10): 1617-23.
- Rosenfeld, M. E., P. Polinsky, et al. (2000). "Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(12): 2587-92.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." *Nature* **362**(6423): 801-9.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* **340**(2): 115-26.
- Ross, R., D. F. Bowen-Pope, et al. (1990). "Platelet-derived growth factor and its role in health and disease." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **327**(1239): 155-69.
- Ross, R. and J. A. Glomset (1976). "The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)." *N Engl J Med* **295**(7): 369-77.
- Ross, R., J. Masuda, et al. (1990). "Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis." *Science* **248**(4958): 1009-12.
- Ross, R., E. W. Raines, et al. (1986). "The biology of platelet-derived growth factor." *Cell* **46**(2): 155-69.

- Rott, D., J. Zhu, et al. (2003). "IL-6 is produced by splenocytes derived from CMV-infected mice in response to CMV antigens, and induces MCP-1 production by endothelial cells: a new mechanistic paradigm for infection-induced atherogenesis." *Atherosclerosis* **170**(2): 223-8.
- Rus, H. G., R. Vlaicu, et al. (1996). "Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall." *Atherosclerosis* **127**(2): 263-71.
- Ruvolo, P. P. (2003). "Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites." *Pharmacol Res* **47**(5): 383-92.
- Ryoo, S. W., D. U. Kim, et al. (2004). "Native LDL induces interleukin-8 expression via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, p38 Kinase, and activator protein-1 in human aortic smooth muscle cells." *Cardiovasc Res* **62**(1): 185-93.
- Sakai, M., S. Kobori, et al. (2000). "Macrophage proliferation in atherosclerosis." *Curr Opin Lipidol* **11**(5): 503-9.
- Samet, D. and Y. Barenholz (1999). "Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells." *Chem Phys Lipids* **102**(1-2): 65-77.
- Sanchez-Quesada, J. L., S. Benitez, et al. (2004). "Electronegative low-density lipoprotein." *Curr Opin Lipidol* **15**(3): 329-35.
- Sanchez-Quesada, J. L., S. Benitez, et al. (2002). "Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects." *J Lipid Res* **43**(5): 699-705.
- Sanchez-Quesada, J. L., S. Benitez, et al. (2005). "The inflammatory properties of electronegative low-density lipoprotein from type 1 diabetic patients are related to increased platelet-activating factor acetylhydrolase activity." *Diabetologia* **48**(10): 2162-9.
- Sanchez-Quesada, J. L., M. Camacho, et al. (2003). "Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells." *Atherosclerosis* **166**(2): 261-70.
- Sanchez-Quesada, J. L., R. Homs-Serradesanferm, et al. (1995). "Increase of LDL susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration aerobic exercise." *Atherosclerosis* **118**(2): 297-305.
- Sanchez-Quesada, J. L., C. Ota-Entraigas, et al. (1999). "Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia." *Am J Cardiol* **84**(6): 655-9.
- Sanchez-Quesada, J. L., A. Perez, et al. (1996). "Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control." *Diabetologia* **39**(12): 1469-76.
- Sanchez-Quesada, J. L., A. Perez, et al. (2001). "Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(7): 3243-9.
- Santamarina-Fojo, S., C. Haudenschild, et al. (1998). "The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis." *Curr Opin Lipidol* **9**(3): 211-9.
- Sartipy, P., G. Bondjers, et al. (1998). "Phospholipase A2 type II binds to extracellular matrix biglycan: modulation of its activity on LDL by colocalization in glycosaminoglycan matrixes." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(12): 1934-41.
- Sartipy, P., G. Camejo, et al. (1999). "Phospholipase A(2) modification of low density lipoproteins forms small high density particles with increased affinity for proteoglycans and glycosaminoglycans." *J Biol Chem* **274**(36): 25913-20.
- Sato, K., H. Nagayama, et al. (1999). "Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells." *J Immunol* **162**(7): 3865-72.
- Savenkova, M. L., D. M. Mueller, et al. (1994). "Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein." *J Biol Chem* **269**(32): 20394-400.

## Bibliografia

- Schenck, M., A. Carpinteiro, et al. (2007). "Ceramide: physiological and pathophysiological aspects." *Arch Biochem Biophys* **462**(2): 171-5.
- Schieffer, B., E. Schieffer, et al. (2000). "Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability." *Circulation* **101**(12): 1372-8.
- Schissel, S. L., G. A. Keesler, et al. (1998). "The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene." *J Biol Chem* **273**(29): 18250-9.
- Schissel, S. L., E. H. Schuchman, et al. (1996). "Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene." *J Biol Chem* **271**(31): 18431-6.
- Schissel, S. L., J. Tweedie-Hardman, et al. (1996). "Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins." *J Clin Invest* **98**(6): 1455-64.
- Schmid, W., A. Lee, et al. (2008). "Hypochlorite-oxidized low density lipoproteins reduce production and bioavailability of nitric oxide in RAW 264.7 macrophages by distinct mechanisms." *Life Sci* **83**(1-2): 50-8.
- Schwartz, D., A. Andalibi, et al. (1994). "Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to MM-LDL-stimulated endothelium." *J Clin Invest* **94**(5): 1968-73.
- Segrest, J. P., M. K. Jones, et al. (1994). "apoB-100 has a pentapartite structure composed of three amphipathic alpha-helical domains alternating with two amphipathic beta-strand domains. Detection by the computer program LOCATE." *Arterioscler Thromb* **14**(10): 1674-85.
- Sevanian, A., G. Bittolo-Bon, et al. (1997). "LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein." *J Lipid Res* **38**(3): 419-28.
- Sevanian, A., H. N. Hodis, et al. (1995). "Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL." *J Lipid Res* **36**(9): 1971-86.
- Sevanian, A., J. Hwang, et al. (1996). "Contribution of an in vivo oxidized LDL to LDL oxidation and its association with dense LDL subpopulations." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(6): 784-93.
- Shamir, R., W. J. Johnson, et al. (1996). "Pancreatic carboxyl ester lipase: a circulating enzyme that modifies normal and oxidized lipoproteins in vitro." *J Clin Invest* **97**(7): 1696-704.
- Shi, Y., C. H. Liu, et al. (2006). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know." *Cell Res* **16**(2): 126-33.
- Shi, Y., P. Zhang, et al. (2007). "Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses." *Atherosclerosis* **191**(1): 54-62.
- Shimano, H., N. Yamada, et al. (1991). "Oxidation-labile subfraction of human plasma low density lipoprotein isolated by ion-exchange chromatography." *J Lipid Res* **32**(5): 763-73.
- Shuvaev, V. V., I. Laffont, et al. (1999). "Kinetics of apolipoprotein E isoforms-binding to the major glycosaminoglycans of the extracellular matrix." *FEBS Lett* **459**(3): 353-7.
- Sigal, E., C. W. Laughton, et al. (1994). "Oxidation, lipoxygenase, and atherogenesis." *Ann N Y Acad Sci* **714**: 211-24.
- Siggins, S., M. Jauhiainen, et al. (2003). "PLTP secreted by HepG2 cells resembles the high-activity PLTP form in human plasma." *J Lipid Res* **44**(9): 1698-704.
- Simionescu, M. and N. Simionescu (1993). "Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration." *Faseb J* **7**(14): 1359-66.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* **387**(6633): 569-72.
- Skalen, K., M. Gustafsson, et al. (2002). "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis." *Nature* **417**(6890): 750-4.
- Smith, D. F., E. Galkina, et al. (2005). "GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(5): H1976-84.

- Smith, E. B., L. Crosbie, et al. (1996). "Prothrombin-related antigens in human aortic intima." *Semin Thromb Hemost* **22**(4): 347-50.
- Smith, S. C., Jr., J. Allen, et al. (2006). "AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update: endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute." *Circulation* **113**(19): 2363-72.
- Sneck, M., P. T. Kovanen, et al. (2005). "Decrease in pH strongly enhances binding of native, proteolyzed, lipolyzed, and oxidized low density lipoprotein particles to human aortic proteoglycans." *J Biol Chem* **280**(45): 37449-54.
- Sonoki, K., M. Iwase, et al. (2003). "Atherogenic role of lysophosphatidylcholine in low-density lipoprotein modified by phospholipase A2 and in diabetic patients: protection by nitric oxide donor." *Metabolism* **52**(3): 308-14.
- Sparrow, C. P. and J. Olszewski (1993). "Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions." *J Lipid Res* **34**(7): 1219-28.
- Springer, T. A. (1994). "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm." *Cell* **76**(2): 301-14.
- Srinivasan, S. R., P. Vijayagopal, et al. (1986). "Low density lipoprotein retention by aortic tissue. Contribution of extracellular matrix." *Atherosclerosis* **62**(3): 201-8.
- Stafforini, D. M., T. M. McIntyre, et al. (1997). "Platelet-activating factor acetylhydrolases." *J Biol Chem* **272**(29): 17895-8.
- Staiger, H., K. Staiger, et al. (2004). "Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells." *Diabetes* **53**(12): 3209-16.
- Steinberg, D. (1999). "At last, direct evidence that lipoxygenases play a role in atherogenesis." *J Clin Invest* **103**(11): 1487-8.
- Steinberg, D., S. Parthasarathy, et al. (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." *N Engl J Med* **320**(14): 915-24.
- Steinbrecher, U. P. (1987). "Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products." *J Biol Chem* **262**(8): 3603-8.
- Steinbrecher, U. P. (1988). "Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins." *Biochim Biophys Acta* **959**(1): 20-30.
- Steinbrecher, U. P., M. Lougheed, et al. (1989). "Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation." *J Biol Chem* **264**(26): 15216-23.
- Steinbrecher, U. P., J. L. Witztum, et al. (1987). "Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism." *Arteriosclerosis* **7**(2): 135-43.
- Stephan, Z. F. and E. C. Yurachek (1993). "Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by Dil-labeled LDL." *J Lipid Res* **34**(2): 325-30.
- Stokes, I. J. (1988). *Dyslipemia as cardiovascular risk and precocious death: the Framingham Study*. 1988.
- Subbanagounder, G., J. W. Wong, et al. (2002). "Epoxyisoprostone and epoxycyclopentenone phospholipids regulate monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 synthesis. Formation of these oxidized phospholipids in response to interleukin-1beta." *J Biol Chem* **277**(9): 7271-81.
- Suits, A. G., A. Chait, et al. (1989). "Phagocytosis of aggregated lipoprotein by macrophages: low density lipoprotein receptor-dependent foam-cell formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2713-7.
- Sukhova, G. K., G. P. Shi, et al. (1998). "Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells." *J Clin Invest* **102**(3): 576-83.

## Bibliografia

- Sukovich, D. A., K. Kauser, et al. (1998). "Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17beta-estradiol." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(9): 1498-505.
- Suriyaphol, P., D. Fenske, et al. (2002). "Enzymatically modified nonoxidized low-density lipoprotein induces interleukin-8 in human endothelial cells: role of free fatty acids." *Circulation* **106**(20): 2581-7.
- Suttles, J., D. M. Milhorn, et al. (1999). "CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action." *J Biol Chem* **274**(9): 5835-42.
- Tabas, I. (1999). "Secretory sphingomyelinase." *Chem Phys Lipids* **102**(1-2): 123-30.
- Tailleux, A., G. Torpier, et al. (1993). "Immunological properties of apoB-containing lipoprotein particles in human atherosclerotic arteries." *J Lipid Res* **34**(5): 719-28.
- Takabe, W., Y. Kanai, et al. (2004). "Lysophosphatidylcholine enhances cytokine production of endothelial cells via induction of L-type amino acid transporter 1 and cell surface antigen 4F2." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(9): 1640-5.
- Takahara, N., A. Kashiwagi, et al. (1996). "Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells." *Metabolism* **45**(5): 559-64.
- Takeya, M., T. Yoshimura, et al. (1993). "Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody." *Hum Pathol* **24**(5): 534-9.
- Tanaka, Y. (2000). "Integrin activation by chemokines: relevance to inflammatory adhesion cascade during T cell migration." *Histol Histopathol* **15**(4): 1169-76.
- Tang, D., J. Lu, et al. (2008). "Electronegative LDL circulating in smokers impairs endothelial progenitor cell differentiation by inhibiting Akt phosphorylation via LOX-1." *J Lipid Res* **49**(1): 33-47.
- Terkeltaub, R., C. L. Banka, et al. (1994). "Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity." *Arterioscler Thromb* **14**(1): 47-53.
- Terkeltaub, R., W. A. Boisvert, et al. (1998). "Chemokines and atherosclerosis." *Curr Opin Lipidol* **9**(5): 397-405.
- Terkeltaub, R. A. (1999). "IL-10: An "immunologic scalpel" for atherosclerosis?" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(12): 2823-5.
- Tertov, V. V., G. Bittolo-Bon, et al. (1995). "Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions." *Exp Mol Pathol* **62**(3): 166-72.
- Tew, D. G., C. Southan, et al. (1996). "Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(4): 591-9.
- Thurberg, B. L. and T. Collins (1998). "The nuclear factor-kappa B/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis." *Curr Opin Lipidol* **9**(5): 387-96.
- Titball, R. W. (1993). "Bacterial phospholipases C." *Microbiol Rev* **57**(2): 347-66.
- Tjoelker, L. W., C. Wilder, et al. (1995). "Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase." *Nature* **374**(6522): 549-53.
- Tomasik, A., W. Jachec, et al. (2003). "Circulating electronegatively charged low-density lipoprotein in patients with angiographically documented coronary artery disease." *Scand J Clin Lab Invest* **63**(4): 259-65.
- Torzewski, M. and K. J. Lackner (2006). "Initiation and progression of atherosclerosis--enzymatic or oxidative modification of low-density lipoprotein?" *Clin Chem Lab Med* **44**(12): 1389-94.
- Tselepis, A. D. and M. John Chapman (2002). "Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase." *Atheroscler Suppl* **3**(4): 57-68.

- Tsimikas, S., L. D. Tsironis, et al. (2007). "New insights into the role of lipoprotein(a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis and cardiovascular disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(10): 2094-9.
- Underwood, K. W., N. L. Jacobs, et al. (1998). "Evidence for a cholesterol transport pathway from lysosomes to endoplasmic reticulum that is independent of the plasma membrane." *J Biol Chem* **273**(7): 4266-74.
- Uyemura, K., L. L. Demer, et al. (1996). "Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis." *J Clin Invest* **97**(9): 2130-8.
- van den Berg, J. J., C. C. Winterbourn, et al. (1993). "Hypochlorous acid-mediated modification of cholesterol and phospholipid: analysis of reaction products by gas chromatography-mass spectrometry." *J Lipid Res* **34**(11): 2005-12.
- Varadhachary, A. S., M. Monestier, et al. (2001). "Reciprocal induction of IL-10 and IL-12 from macrophages by low-density lipoprotein and its oxidized forms." *Cell Immunol* **213**(1): 45-51.
- Vedie, B., X. Jeunemaitre, et al. (1998). "Charge heterogeneity of LDL in asymptomatic hypercholesterolemic men is related to lipid parameters and variations in the ApoB and CIII genes." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(11): 1780-9.
- Vedie, B., I. Myara, et al. (1991). "Fractionation of charge-modified low density lipoproteins by fast protein liquid chromatography." *J Lipid Res* **32**(8): 1359-69.
- Viedt, C., J. Vogel, et al. (2002). "Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(6): 914-20.
- Wang, G., Z. Deng, et al. (1996). "[Effects of oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein on the expression of MCP-1 by monocytes]." *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* **25**(4): 220-3.
- Wang, N., I. Tabas, et al. (1996). "Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma." *J Biol Chem* **271**(15): 8837-42.
- Wang, P., P. Wu, et al. (1994). "IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells." *J Immunol* **153**(2): 811-6.
- Weisgraber, K. H., S. C. Rall, Jr., et al. (1986). "Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3." *J Biol Chem* **261**(5): 2068-76.
- Whitmore, L. and B. A. Wallace (2004). "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data." *Nucleic Acids Res* **32**(Web Server issue): W668-73.
- Wielkoszynski, T., K. Gawron, et al. (2006). "Cellular toxicity of oxysterols." *Bioessays* **28**(4): 387-98.
- Wight, T. N. (1989). "Cell biology of arterial proteoglycans." *Arteriosclerosis* **9**(1): 1-20.
- Williams, K. J. (2001). "Arterial wall chondroitin sulfate proteoglycans: diverse molecules with distinct roles in lipoprotein retention and atherogenesis." *Curr Opin Lipidol* **12**(5): 477-87.
- Williams, K. J. and I. Tabas (1995). "The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**(5): 551-61.
- Williams, K. J. and I. Tabas (1998). "The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced." *Curr Opin Lipidol* **9**(5): 471-4.
- Wissler, R. W. and D. Vesselinovitch (1990). "Can atherosclerotic plaques regress? Anatomic and biochemical evidence from nonhuman animal models." *Am J Cardiol* **65**(12): 33F-40F.
- Wooton-Kee, C. R., B. B. Boyanovsky, et al. (2004). "Group V sPLA2 hydrolysis of low-density lipoprotein results in spontaneous particle aggregation and promotes macrophage foam cell formation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(4): 762-7.
- Xu, X. P., S. R. Meisel, et al. (1999). "Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages." *Circulation* **99**(8): 993-8.



## Bibliografia

- Xu, X. X. and I. Tabas (1991). "Sphingomyelinase enhances low density lipoprotein uptake and ability to induce cholesteryl ester accumulation in macrophages." *J Biol Chem* **266**(36): 24849-58.
- Yang, C. Y., H. H. Chen, et al. (2007). "Pro-apoptotic low-density lipoprotein subfractions in type II diabetes." *Atherosclerosis* **193**(2): 283-91.
- Yang, C. Y., J. L. Raya, et al. (2003). "Isolation, characterization, and functional assessment of oxidatively modified subfractions of circulating low-density lipoproteins." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(6): 1083-90.
- Yeagle, P. L. (1991). "Modulation of membrane function by cholesterol." *Biochimie* **73**(10): 1303-10.
- Yeh, M., N. Leitinger, et al. (2001). "Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF-alpha and oxidized phospholipids." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(10): 1585-91.
- Yla-Herttuala, S., B. A. Lipton, et al. (1991). "Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12): 5252-6.
- Yla-Herttuala, S., W. Palinski, et al. (1989). "Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man." *J Clin Invest* **84**(4): 1086-95.
- Zhang, B., T. Kaneshi, et al. (2005). "Relation between insulin resistance and fast-migrating LDL subfraction as characterized by capillary isotachopheresis." *J Lipid Res* **46**(10): 2265-77.
- Zhang, B., N. Maeda, et al. (2006). "Association between fast-migrating low-density lipoprotein subfraction as characterized by capillary isotachopheresis and intima-media thickness of carotid artery." *Atherosclerosis* **187**(1): 205-12.
- Zhang, B., S. Miura, et al. (2008). "Reduction of charge-modified LDL by statin therapy in patients with CHD or CHD risk factors and elevated LDL-C levels: the SPECIAL Study." *Atherosclerosis* **201**(2): 353-9.
- Zhang, H., Y. Yang, et al. (1993). "Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages." *J Biol Chem* **268**(8): 5535-42.
- Zhang, W. Y., P. M. Gaynor, et al. (1997). "Aggregated low density lipoprotein induces and enters surface-connected compartments of human monocyte-macrophages. Uptake occurs independently of the low density lipoprotein receptor." *J Biol Chem* **272**(50): 31700-6.
- Ziouzenkova, O., L. Asatryan, et al. (1999). "Oxidative cross-linking of ApoB100 and hemoglobin results in low density lipoprotein modification in blood. Relevance to atherogenesis caused by hemodialysis." *J Biol Chem* **274**(27): 18916-24.
- Ziouzenkova, O., L. Asatryan, et al. (2003). "Dual roles for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low density lipoprotein." *J Biol Chem* **278**(41): 39874-81.
- Ziouzenkova, O. and A. Sevanian (2000). "Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) in HD patients: role in electronegative LDL formation." *Blood Purif* **18**(3): 169-76.

## **AGRAÏMENTS**

## AGRAÏMENTS

Al final, he aconseguit fer una tesi.

Ha estat possible amb uns quants anys, molta paciència i l'ajuda de molta gent.

Però, el millor de tot han estat les moltes experiències que he viscut mentre ho aconseguia.

Gràcies a tots els companys del prefabricat de Lípids:

per haver-me ensenyat de què va el món de la investigació,  
per tota l'ajuda, tant de temes del laboratori com de la vida mateixa,  
i per tants moments compartits. Entre tots heu fet que hi haguessin molts bons moments i que els dolents passessin més bé.

Dia rera dia hem compartit experiments, hores al menjador, estones de sol...

i de tant en tant, alguna broma, pica-piques, gent nova i amics que marxen.

Els congressos, per desconnectar del laboratori i connectar amb altres investigadors.

Les estades, han estat molt més que una col·laboració de recerca, hi ha hagut grans moments!

Tot sembla molt maco, però, també hi ha hagut coses negatives, com:

experiments que no es repeteixen,

hores avorrides fent *pools* i ELISAs,

enrabiades per coses que no surten tal com vols,

injustícies per ser becari

i, també, com a cosa negativa: l'LDL electronegativa! A veure si al final serà important i tot!!

Gràcies especialment als meus dos directors de tesi, per haver-me guiat, ensenyat quasi tot el que sé de la recerca i haver estat en tot moment al meu costat.

Gràcies a la meva directora i gran amiga per TOT! Tot és molt fàcil i encantador al teu costat.

Gràcies al *jefe* del meu grup i tutor d'aquesta tesi per haver-me permès formar part d'aquest grup d'investigació, haver posat a la meva disposició els medis necessaris per fer recerca i per tenir-me en compte. Gràcies al *jefe* dels veïns pel suport proporcionat al nostre grup.

Gràcies als grups que han col·laborat en els treballs publicats d'aquesta tesi.

## Agraïments

Gràcies també als genials constructors de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau per alegrar-nos la vista cada dia amb els seus preciosos edificis.

Gràcies a tots els meus amics, que quan els mig explico què faig al laboratori, em miren amb cara de no entendre res i de fascinació alhora.

Amb vosaltres passo les millors hores de la meva vida, anant d'excursió, ballant, fent el got,... xerrant.

També als amics Bioquímics! Que compartim el mateix estil de vida i ens comprenem mútuament.

A les companyes de piset, que compartim més que 4 parets.

Gràcies als meus pares i germans, que sempre m'han recolzat en tot el què he volgut fer i em cuiden tant. I a la resta de la meva gran família, amb tantes tietes encantadores i cosins que són més que amics.

Gràcies a les persones especials per mi i jo per elles.

En conjunt,

Gràcies a tothom que, d'alguna manera, ha contribuït en aquesta tesi.

**ANNEX**

# Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array

Sònia Benítez <sup>a</sup>, Mercedes Camacho <sup>b</sup>, Cristina Bancells <sup>a</sup>, Luis Vila <sup>b</sup>,  
José Luis Sánchez-Quesada <sup>a</sup>, Jordi Ordóñez-Llanos <sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Inflammation Mediators Laboratory, Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 20 September 2005; received in revised form 17 March 2006; accepted 27 March 2006

Available online 1 April 2006

## Abstract

Electronegative low-density lipoprotein (LDL<sup>(-)</sup>) is a modified subfraction of LDL present in plasma able to induce the release of interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). To ascertain whether further inflammation mediator release could be induced by LDL<sup>(-)</sup>, a protein array system was used to measure 42 cytokines and related compounds. Native LDL and LDL<sup>(-)</sup> isolated from normolipemic subjects were incubated for 24 h with HUVEC and culture supernatants were used to measure inflammation mediator release. The protein array revealed that IL-6, granulocyte/monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) and growth-related oncogene (GRO) release were increased by cultured HUVEC in response to LDL<sup>(-)</sup>. LDL<sup>(-)</sup> enhanced production of IL-6 (4-fold vs. LDL<sup>(+)</sup>), GM-CSF (4-fold), GRO $\beta$  (2-fold) and GRO $\gamma$  (7-fold) was confirmed by ELISA. Time-course experiments revealed that IL-6 was released earlier than the other inflammation mediators, suggesting a first-wave cytokine action. However, the addition of IL-6 alone did not stimulate the production of IL-8, MCP-1 or GM-CSF. Moreover, IL-8, MCP-1 or GM-CSF alone did not promote the release of the other inflammatory molecules. Modification of LDL<sup>(+)</sup> by phospholipase A<sub>2</sub>-mediated lipolysis or by loading with non-esterified fatty acids (NEFA) reproduced the action of LDL<sup>(-)</sup>, thereby suggesting the involvement of NEFA and/or lysophosphatidylcholine in the release of these molecules. Our results indicate that LDL<sup>(-)</sup> promotes a proinflammatory phenotype in endothelial cells through the production of cytokines, chemokines and growth factors.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Electronegative LDL; Interleukin 6; Granulocyte/monocyte colony-stimulating factor; GRO; Inflammation

## 1. Introduction

Electronegative low-density lipoprotein (LDL<sup>(-)</sup>) is a modified LDL subfraction present in plasma accounting for 1–5% of total LDL in healthy subjects [1–3] but up to 20% of total LDL in diseases with increased cardiovascular risk such as familial hypercholesterolemia or diabetes [4,5]. Several studies suggest an atherogenic and proinflammatory role for LDL<sup>(-)</sup> [6]. This lipoprotein enhances the production of proinflammatory molecules involved in atherogenesis, such as interleukin-

8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) [7,8] and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-induced vascular cell adhesion molecule (VCAM) [9]. Moreover, LDL<sup>(-)</sup> could induce cytotoxic [10,11] and apoptotic [12] processes that frequently appear in atherosclerotic lesions. However, the number of inflammation mediators that could be involved in atherogenesis is high and increasing; therefore, methodological approaches permitting measurement of the maximum number of such molecules are necessary. The recent development of protein array systems permits the simultaneous measurement of a wide range of cytokines, chemokines and related compounds involved in atherogenesis. Thus, our aim was to further evaluate the inflammatory effect of LDL<sup>(-)</sup> by simultaneously measuring forty-two molecules from the culture supernatants of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The effect of LDL modified in vitro by secretory

\* Corresponding author. Servei Bioquímica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932919451; fax: +34 932919196.

E-mail address: [jordonez@hsp.santpau.es](mailto:jordonez@hsp.santpau.es) (J. Ordóñez-Llanos).

phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) lipolysis or by non-esterified fatty acid (NEFA) loading, known to reproduce the inflammatory action of LDL(-) [13], was also studied. In addition to the previously described increased release of IL-8 and MCP-1 [7,8], LDL(-), PLA<sub>2</sub>-LDL and NEFA-LDL enhanced the release of IL-6, granulocyte/monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) and growth-related oncogene (GRO), cytokines known to stimulate multiple inflammatory pathways and thereby promote a broad proinflammatory phenotype in endothelial cells.

## 2. Methods

### 2.1. Lipoprotein isolation

Plasma EDTA was obtained from normolipemic, normoglycemic and non-smoker volunteers and pooled to isolate LDL subfractions, as described [8]. Total LDL (1.019–1.050 g/mL) was isolated by sequential ultracentrifugation and LDL was then subfractionated into LDL(+) (non-modified LDL) and LDL(-) by anion exchange chromatography [8]. LDL subfractions were chemically characterized and differences in electronegativity were confirmed by agarose gel electrophoresis [7,8]. The investigation conformed with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Hospital Ethics Committee and all subjects gave written informed consent.

### 2.2. LDL modification

LDL(+) subfraction was modified by sPLA<sub>2</sub> lipolysis or by NEFA loading, as described [13]. Briefly, LDL(+) (0.5 g apoB/L) was incubated with sPLA<sub>2</sub> (5 and 20 µg/L) for 2 h at 37 °C, or with a mixture of NEFA (2 mmol/L) for 4 h at 37 °C and re-isolated by ultracentrifugation. Lysophosphatidylcholine (LPC) and NEFA content in modified LDL was determined as previously described [13]. In order to rule out a possible sPLA<sub>2</sub> contamination of LDL, the enzymatic activity of sPLA<sub>2</sub> was measured after LDL re-isolation as described [13]. No sPLA<sub>2</sub> activity was detected in re-isolated LDL (data not shown).

### 2.3. Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were isolated by collagenase digestion and cultured in 199 medium containing 20% fetal calf serum (FCS), 2 mmol/L glutamine, 20 mmol/L HEPES, 0.1 IU/L penicillin, 100 mg/L streptomycin, 30 mg/L endothelial cell growth supplement (ECGS) and 10,000 USP/L heparin (growth medium) as described [8]. Cells in confluent state (1–2 passages) were seeded in six-well plates at 10,000 cells/cm<sup>2</sup>. When cells reached confluence, LDLs were added for a subsequent 24 h at 150 mg apoB/L in 199 medium containing 1% FCS without heparin and ECGS. LDLs were previously dialyzed against 199 medium and filtered through 0.22 µm. Interleukin-1β (IL-1β) (200 ng/L) was used as a positive control in all experiments. To explore the possibility that any of the inflammation mediators released by LDL(-) could act as a first-wave cytokine inducing production of the other molecules, time-course experiments were developed. In addition, in some experiments IL-6 (at 1, 10 and 100 kIU/L), MCP-1 (at 1, 10 and 100 µg/L), IL-8 (at 1, 10 and 100 µg/L) and GM-CSF (at 1, 10 and 100 µg/L) were added to the cells. Finally, an antibody anti-IL-6 receptor (Sigma, clone UV4, at 1 and 10 mg/L) was added 1 h prior to the experiment when IL-6 was used to stimulate endothelial cells. Culture supernatants were stored at -80 °C until protein array analysis. The possibility that LDL subfractions could be oxidized during incubation with cells was explored by measuring 9- and 13-HODE content [8], electrophoretic mobility in agarose gel and apoB integrity by SDS-PAGE in 2 independent experiments. After incubation of LDLs with HUVEC, these parameters were unchanged (data not shown).

### 2.4. Protein array

The RayBio™ Human Cytokine Array III (Ray Biotech) was used. This system permits the measurement of 42 cytokines, chemokines and related

molecules, as shown in Fig. 1A. Conditioned culture media were used at a dilution of 1/5 (data not shown) and undiluted (Fig. 1B), with better results being obtained with undiluted media. Arrays were incubated and developed following the manufacturer's instructions.

### 2.5. ELISA

Positive spots observed in the protein array were confirmed and quantified by ELISA. IL-6 and GM-CSF were measured using Module Set antibody pairs (Bender MedSystems). GROγ and GROβ were measured by a lab-made ELISA using unlabeled and biotinylated polyclonal antibodies (PeproTech) and following the instructions of the manufacturer. The same procedure was used for both chemokines. Briefly, unlabeled polyclonal antibody from rabbit (25 ng) was coated to 96-well plates by overnight incubation at room temperature. Cell supernatants were incubated for 2 h, washed four times and biotinylated anti-GROγ or GROβ antibody (25 ng) was then added and incubated for 2 h. After four more washes, streptavidin-conjugated peroxidase (Sigma A-7419, dilution 1:2000) was added for 30 min, washed and revealed with TMB substrate for ELISA (Calbiochem). Absorbance was quantified at 450 nm. IL-8 and MCP-1 were also measured by ELISA (Bender MedSystems). Culture supernatants of HUVEC incubated with LDLs were diluted 1/30 for IL-6 and 1/5 for GM-CSF, GROγ or GROβ. Supernatants from cells incubated with IL-1β (positive control) were diluted 10-fold more than those of cells incubated with LDLs.

### 2.6. LDL association to HUVEC

LDL subfractions were labeled with the fluorescent probe 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI; Molecular probes), as described [14]. HUVEC, cultured in the same conditions described above, were incubated for 24 h at 37 °C with 25 or 150 mg apoB/L of DiI-labeled subfractions (total association). In some wells incubated with 25 mg apoB/L of labeled LDL, non-specific association was determined by adding 10-fold excess of unlabeled LDL. Specific cell association was measured by quantifying fluorescence incorporated to cells and subtracting non-specific from total association, as described [15].

### 2.7. Statistical analysis

Results are expressed as mean S.D. SPSS 11.5.2 statistical package was used. Differences between groups were tested with Wilcoxon's *t* test (for paired data) and Mann-Whitney *U* test (for unpaired data). A *P* value < 0.05 was considered significant.

## 3. Results

Physicochemical characteristics of LDL(+) and LDL(-) did not differ from those previously described [7,8,13,14]. Briefly, LDL(-) presented significant increases in NEFA, apoE, apoC-III, free cholesterol and triglyceride and decreased apoB content compared with LDL(+) (data not shown). Results obtained with the protein array are shown in Fig. 1. Control cells (incubated in absence of IL-1β or LDL) showed a basal production of IL-8 under the culture conditions used; however, no other inflammatory molecule was detected by the protein array. LDL(+) slightly increased IL-8 release and also induced the release of low amounts of MCP-1. The detected spots of these molecules were clearly enhanced when HUVEC were incubated with LDL(-). Moreover, LDL(-) produced intense spots of IL-6 and lower, but detectable, signals of GRO and GM-CSF. LDL(-) induced similar signal-responses on proinflammatory molecules to those of IL-1β (positive control). Beyond the positive induction of inflammatory molecules by LDL(-), negative results rule

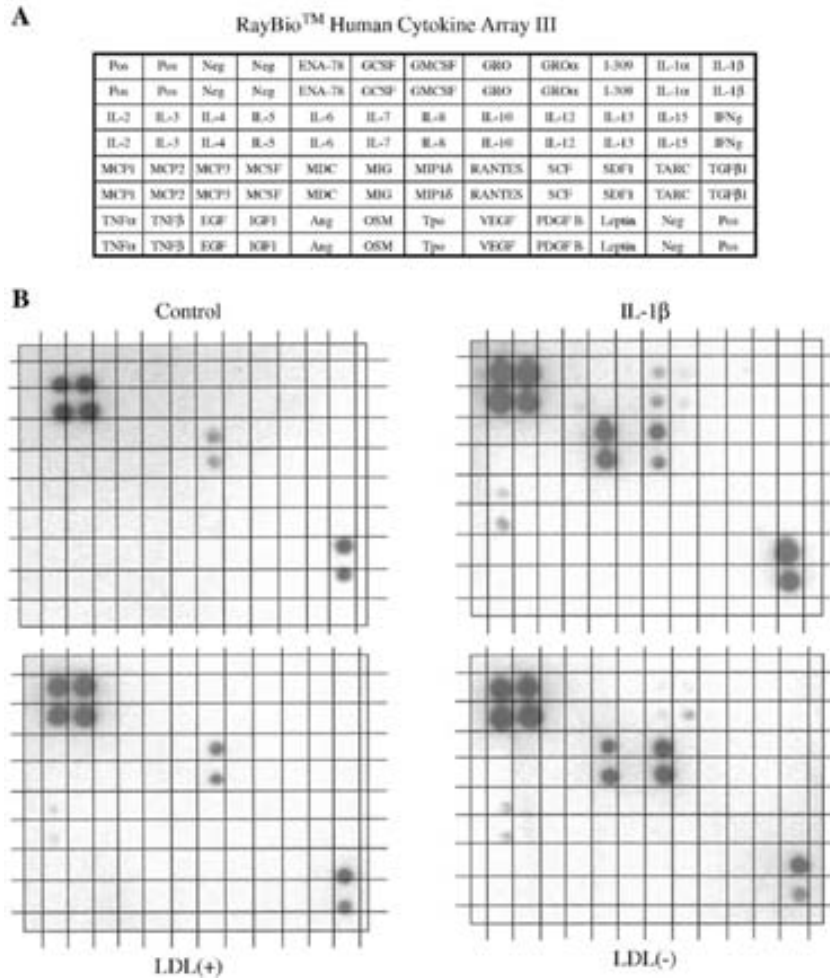


Fig. 1. Simultaneous detection of multiple cytokines and related molecules using the RayBio™ Human Cytokine Array III. (A) Distribution of spots in the protein array membrane. Grey cells indicate positive spots in the membrane incubated with LDL(-) (lower panel). (B) Membranes incubated with culture supernatants of cells unstimulated (control cells) or stimulated with LDL(+) (150 mg/L), LDL(-) (150 mg/L) and IL-1 $\beta$  (10  $\mu$ g/L) under the conditions described in Methods. Membranes were incubated with undiluted media and revealed as described by the manufacturer.

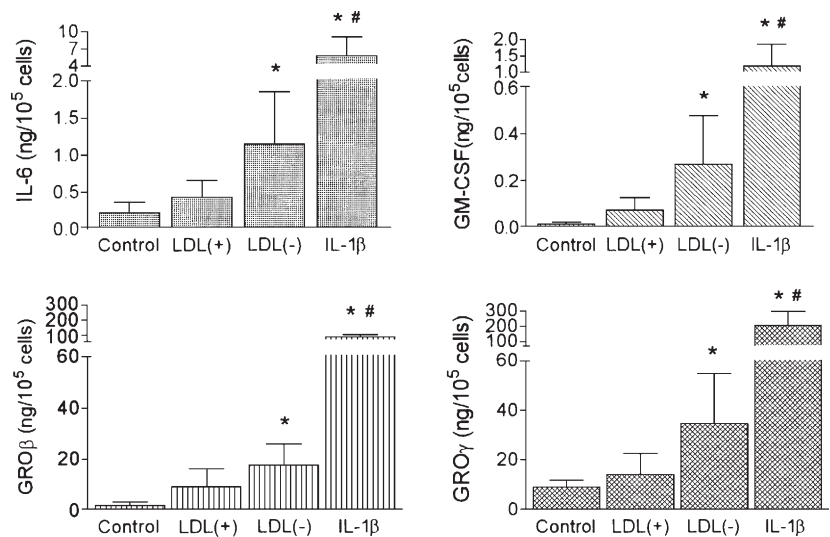


Fig. 2. Release of IL-6, GM-CSF, GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  induced by LDLs in HUVEC. Confluent cells were incubated with LDL(+) (150 mg/L), LDL(-) (150 mg/L) and IL-1 $\beta$  (10  $\mu$ g/L) or without stimuli (control cells) and the release of cytokines to the culture medium was measured by ELISA, as described in Methods. Data are the mean  $\pm$  S.D. of 21 independent experiments. \* $P$ <0.05 vs. LDL(+); # $P$ <0.05 vs. LDL(-).



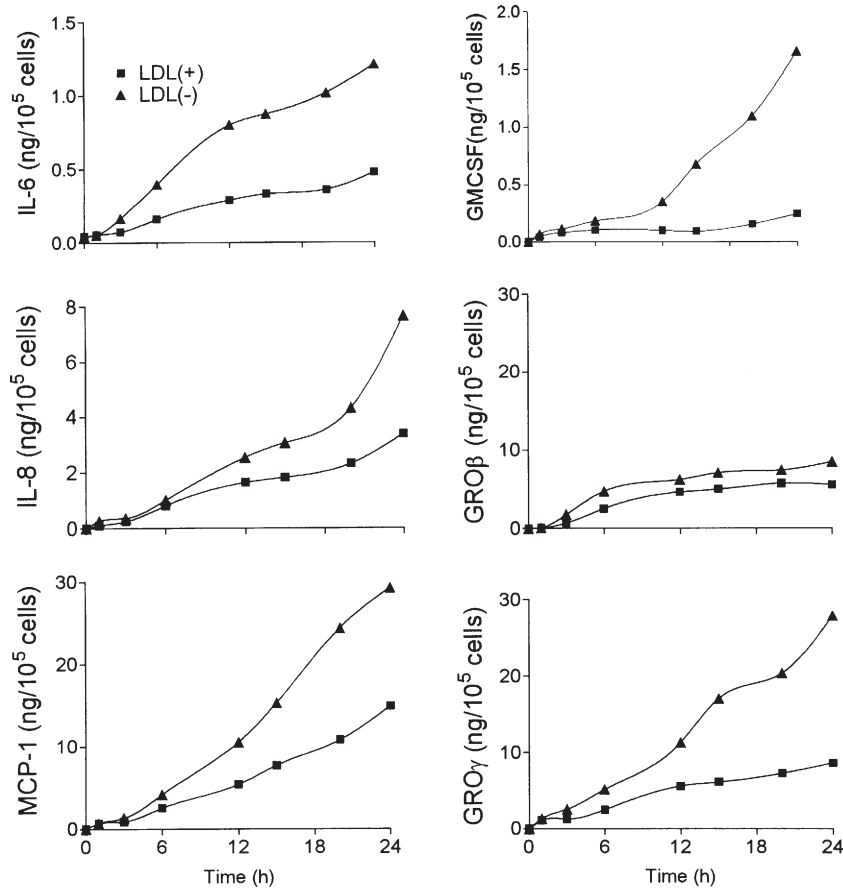


Fig. 3. Time-course release of MCP-1, IL-8, IL-6, GM-CSF, GROβ and GROγ by HUVEC incubated with LDL(+) (150 mg/L) or LDL(-) (150 mg/L). Aliquots of culture medium were taken at 1, 3, 6, 10, 15, 20 and 24 h and kept frozen at - 80 °C until analysis. The Figure shows a representative of 3 independent experiments.

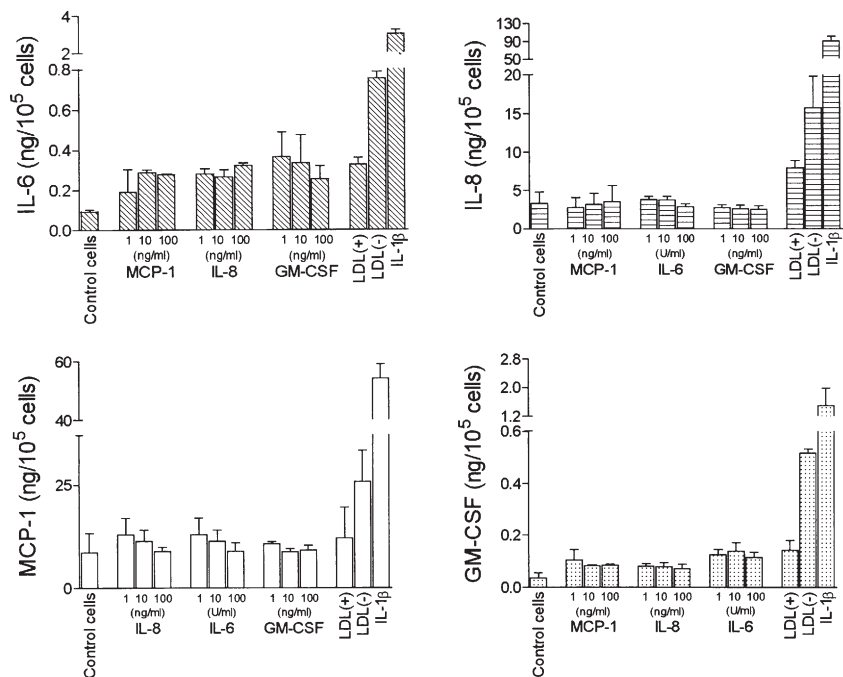


Fig. 4. Effect of the addition of MCP-1, IL-8, IL-6 and GM-CSF on the release of the other cytokines. HUVEC were incubated with LDL(+) (150 mg/L), LDL(-) (150 mg/L), IL-1β (10 μg/L) or with increasing concentrations (1–100 μg/L or 1–100 U/mL for IL-6) of MCP-1, IL-8, IL-6 and GM-CSF. The release of cytokines to the culture medium was measured by ELISA, as described in Methods. Data are the mean ± S.D. of 3 independent experiments.

Table 1

Effect of the modification of LDL(+) by secretory phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>)-mediated lipolysis or non-esterified fatty acids (NEFA) loading on the content of lysophosphatidylcholine (LPC) and NEFA

	LPC (mol/mol apoB)	NEFA (mol/mol apoB)
LDL(+)	23.5±11.5	11.0±2.0
LDL(-)	53.2±7.9 <sup>a</sup>	37.9±11.2 <sup>a</sup>
LDL(+)+2 mmol/L NEFA	ND	112.8±45.3 <sup>a</sup>
LDL(+)+5 µg/L sPLA <sub>2</sub>	45.5±20.3 <sup>a</sup>	46.8±10.6 <sup>a</sup>
LDL(+)+20 µg/L sPLA <sub>2</sub>	103.8±16.7 <sup>a</sup>	64.6±11.8 <sup>a</sup>

ND: not determined. Data are the mean±S.D. of 3 independent experiments.

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs. LDL(+).

out a number of cytokines and related molecules whose release from HUVEC was not induced by LDL(-), at least at a concentration detectable by this protein array assay.

ELISA was used to quantify the release of IL-6, GM-CSF and GRO induced by LDL(-) in HUVEC. A total of 21 independent experiments were quantified (Fig. 2). LDL(-) induced 4-fold the release of IL-6 (Fig. 2A) and GM-CSF (Fig. 2B) compared to LDL(+). Concerning GRO, protein array data indicated that GRO production, but not GRO $\alpha$ , was induced by LDL(-). Since the GRO family is composed of 3 different proteins [16], GRO $\alpha$ , GRO $\beta$  and GRO $\gamma$ , array results suggested that GRO $\beta$  and/or GRO $\gamma$  should be the molecules induced by LDL(-). Therefore, ELISA methods specific for GRO $\beta$  or GRO $\gamma$  quantitation were

developed. LDL(-) induced GRO $\beta$  2-fold and GRO $\gamma$  7-fold compared to LDL(+) (Figs. 2C and D). In all cases, the increment induced by LDL(-) compared to LDL(+) was considered after subtraction of the control.

Time-course experiments indicated that the release of IL-6 was slightly advanced (2.5-fold increased at 6 h of incubation) to that of IL-8, MCP-1, GM-CSF, GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  (Fig. 3), which suggests that IL-6 could play a role in the production of these molecules as a first-wave cytokine. In this context, it has recently been reported that IL-6 was able to induce MCP-1 production in endothelial cells [17]. In turn, MCP-1 induced IL-6 production in human smooth muscle cells [18]. In addition, GM-CSF was also reported to induce IL-8 synthesis in neutrophils [19]. Since cytokines are known to interact between them, the possibility that under our culture conditions IL-6, IL-8, GM-CSF and/or MCP-1 could mutually potentiate their release was examined. The effect of GRO was not evaluated since these chemokines bind to CXCR2, the same receptor as IL8, and stimulate the same signaling pathway [20]. Fig. 4 shows that no mutual interaction between IL-8, MCP-1 GM-CSF or IL-6 was observed, thereby suggesting that the enhanced release of these inflammatory mediators was directly exerted by LDL(-). Moreover, the action of IL-6 as a first-wave cytokine was ruled out since pre-incubation of cells with antibody anti-IL-6 receptor did not inhibit the LDL(-)-mediated release of IL-8, MCP-1 or GM-CSF (data not shown).

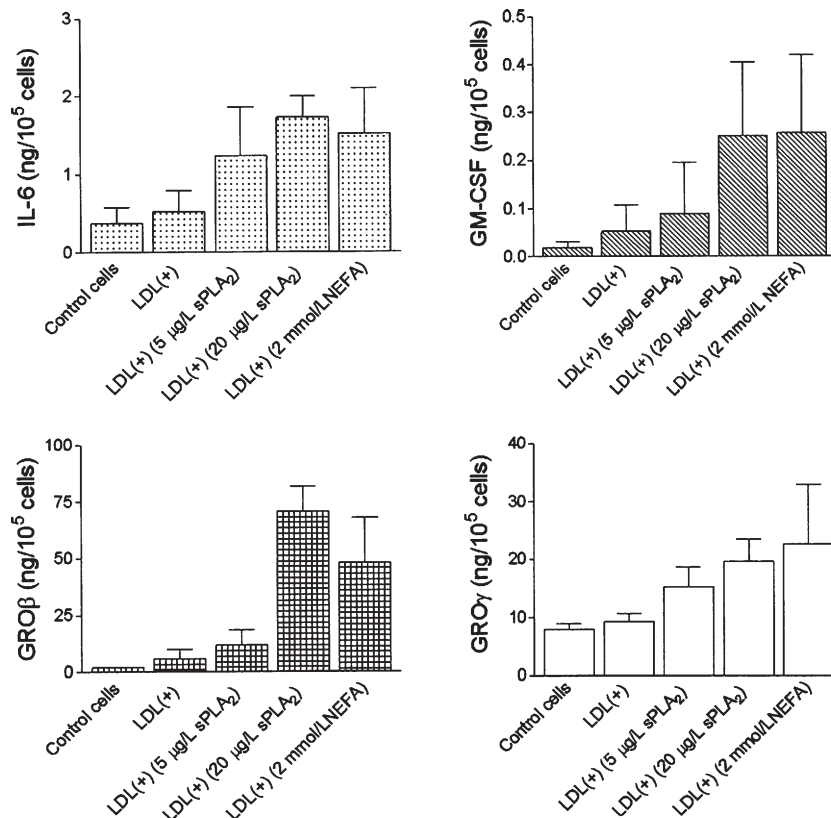


Fig. 5. Release of IL-6, GM-CSF, GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  by modified LDLs in cultured HUVEC. LDL(+) was modified by secretory phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>)-mediated lipolysis or non-esterified fatty acids (NEFA) loading as described in Methods. Confluent cells were incubated with modified LDLs and the release of cytokines to the culture medium was measured by ELISA, as described in Methods. Data are the mean±S.D. of 3 independent experiments.

The possibility that increased inflammatory action of LDL(−) could be due to a differential uptake of both LDL subfractions by HUVEC was explored by measuring the association of DiI-labeled LDL subfractions to cells. No difference was observed between LDL(+) and LDL(−) subfractions, either at 25 mg/L (total association of LDL(+):  $54.2 \pm 31.5$   $\mu\text{g LDL/L}$ , LDL(−):  $69.5 \pm 19.3$   $\mu\text{g LDL/L}$ ; specific association of LDL(+):  $27.9 \pm 12.3$   $\mu\text{g LDL/L}$ , LDL(−):  $30.3 \pm 15.2$   $\mu\text{g LDL/L}$ ;  $n=6$ ) or 150 mg/L (total association of LDL(+):  $233.7 \pm 109.0$   $\mu\text{g LDL/L}$ , LDL(−):  $227.7 \pm 119.8$   $\mu\text{g LDL/L}$ ;  $n=4$ ).

In vitro modification of LDL(+) by sPLA<sub>2</sub> or NEFA loading enhanced its electronegativity [13,14] and resulted in the increase in LPC and/or NEFA associated with the LDL particle (Table 1). sPLA<sub>2</sub> or NEFA-modified LDLs induced the release of IL-6, GM-CSF, GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  (Fig. 5), suggesting that LPC and NEFA are involved in the production of these cytokines, as previously demonstrated in IL-8 and MCP-1 release [13].

#### 4. Discussion

Current results provide evidence of a broad inflammatory action of LDL(−) on endothelial cells. Recruitment of leukocytes to injured areas of the vessel wall, one of the first events in atherogenesis, could be exacerbated by LDL(−) through the induced release of chemotactic factors by endothelial cells. The induced release of GRO, a well-characterized family of C-X-C chemokines [16], adds to the involvement of LDL(−) in the recruitment and adhesion of leukocytes mediated by IL-8 and MCP-1 [21]. In addition, GM-CSF has recently been described as a chemoattractant cytokine for human neutrophils [22]. Thus, current results suggest that T-cell (attracted by IL-8), neutrophil (attracted by GRO, GM-CSF and IL-8) and monocyte (attracted by IL-8 and MCP-1) recruitment can be stimulated by LDL(−) through the production of different chemokines by endothelial cells. The effect of LDL(−) on the release of multiple chemokines concurs with a recent study reporting increased mononuclear cell adhesion to HUVEC stimulated with LDL(−) [23].

Beyond the LDL(−)-mediated increased expression of molecules involved in leukocyte recruitment, further inflammatory actions could be attributed to LDL(−) through its effects on different molecules. GM-CSF plays a major role in granulocyte/macrophage differentiation and colony formation [24], with this proliferation being an early step in the accumulation of foam cells in atherosclerotic plaques. In addition, GM-CSF plays other roles involved in atherogenesis. As noted above, it acts as a chemokine for neutrophils [22]. GM-CSF modulates type VIII collagen expression in smooth muscle cells [25] that may influence processes such as cell movement, plaque stability and thrombus organization. Myeloperoxidase, a pro-oxidant enzyme highly expressed by macrophages and involved in the oxidative modification of lipoproteins [26], is also up-regulated by GM-CSF [27]. Thus, the interaction of LDL(−) with endothelial cells and the consequent release of GM-CSF could contribute to increasing the formation of foam cells, increasing oxidative stress in the intima and modifying the characteristics and composition of extracellular matrix in atheromatous plaques.

IL-6, the pleiotropic cytokine that promotes antibody production, is a central mediator of the acute-phase response being the main determinant of C-reactive protein (CRP) synthesis. Therefore, increased LDL(−)-mediated production of IL-6 could contribute to the systemic proinflammatory status characteristic of different settings of coronary artery disease reflected by increased plasma levels of CRP [28]. Interestingly, IL-6, IL-8, MCP-1 and GM-CSF plasma levels are increased in diseases with high cardiovascular risk such as hyperlipemia [29–31] or diabetes [32,33], which also share increased LDL(−) proportion [5,34–36]. These observations suggest that a high proportion of LDL(−) in blood could impair endothelium function, leading to the enhancement of several inflammatory mechanisms involved in different stages of atherosclerosis development.

Time-course experiments suggested that IL-6 could play a role in the production of the other cytokines by acting as a first-wave cytokine, since its release was slightly advanced (2.5-fold increased at 6 h of incubation) compared to that of IL-8, MCP-1, GM-CSF, GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  (Fig. 3). However, the lack of effect of IL-6 alone and of the antibody against IL-6 receptor in the release of the other cytokines, shown by current results, rules out this possibility.

The increased inflammatory action of LDL(−) was not related to increased uptake of this subfraction compared to LDL(+) since it was similar for both LDL subfractions. Since it has been previously reported that LDL(−) shows lower binding affinity to the LDL receptor in cultured fibroblasts [14], this observation suggests that LDL(−) would present alternative uptake pathways in HUVEC other than the LDL receptor pathway. Moreover, the lack of differences in the cellular uptake between LDL(+) and LDL(−) suggests that increased inflammatory activity of LDL(−) vs. LDL(+) could be due to the differential content of some molecules in these lipoproteins. In agreement with that, increased LPC and NEFA content in LDL(−) had previously been reported as responsible for IL-8 and MCP-1 release [13]. We present evidence that these polar lipids are also involved in the release of IL-6, GM-CSF, GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  since modification of LDL(+) by sPLA<sub>2</sub> lipolysis or NEFA loading induces release of these inflammatory mediators to a similar extent to that of LDL(−). The origin of increased LPC and NEFA in LDL(−) might be related to the high platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity, increased 5-fold in LDL(−) compared to LDL(+) [37]. Nevertheless, since the substrate of this enzyme are oxidized phospholipids, the involvement of oxidative processes in the generation and inflammatory properties of LDL(−) cannot be definitively ruled out.

In summary, current findings suggest a multiple inflammatory effect of LDL(−) in stimulating endothelial cells to produce cytokines, chemokines and growth factors that play major roles in several stages of atherosclerosis development such as leukocyte recruitment, cell proliferation and induction of a systemic proinflammatory status. Further studies are required to elucidate the molecular mechanisms and signaling pathways involved in the activation of endothelial cells by LDL(−) and to gain insight into the processes promoting the formation of LDL(−).

## Acknowledgments

This work was supported by grants from CICYT SAF98/0125 and MCYT SAF2001-0480 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and C03/01, C03/08 and PI030885 from FIS. The authors are grateful to Sonia Alcolea and Esther Gerbolés for excellent technical assistance and to Christine O'Hara for excellent editorial assistance.

## References

- [1] P. Avogaro, G. Bittolo-Bon, G. Cazzolato, Presence of a modified low density lipoprotein in humans, *Arteriosclerosis* 8 (1988) 79–87.
- [2] H. Shimano, N. Yamada, S. Ishibashi, H. Mokuno, N. Mori, T. Gotoda, K. Harada, Y. Akamura, T. Murasa, Y. Yazaki, F. Takaku, Oxidation-labile subfraction of human plasma low-density lipoprotein isolated by ion-exchange chromatography, *J. Lipid Res.* 32 (1991) 763–773.
- [3] K. Nyyssönen, J. Kaikkonen, J.T. Salonen, Characterization and determinants of an electronegatively-charged low-density lipoprotein in human plasma, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56 (1996) 681–689.
- [4] J.L. Sánchez-Quesada, C. Otal-Entraigas, M. Franco, O. Jorba, F. González-Sastre, F. Blanco-Vaca, J. Ordóñez-Llanos, Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with familial hypercholesterolemia, *Am. J. Cardiol.* 84 (1999) 655–659.
- [5] J.L. Sánchez-Quesada, A. Pérez, A. Caixàs, M. Rigla, A. Payés, S. Benítez, J. Ordóñez-Llanos, Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: nonenzymatic glycosylation and oxidative modifications, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 3243–3249.
- [6] J.L. Sánchez-Quesada, S. Benítez, J. Ordóñez-Llanos, Electronegative low-density lipoprotein, *Curr. Opin. Lipidol.* 15 (2004) 329–335.
- [7] C. de Castellamau, J.L. Sánchez-Quesada, S. Benítez, L. Caveda, R. Rosa, L. Vila, J. Ordóñez-Llanos, Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 2281–2287.
- [8] J.L. Sánchez-Quesada, M. Camacho, R. Antón, S. Benítez, L. Vila, J. Ordóñez-Llanos, Electronegative LDL of FH subjects. Chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells, *Atherosclerosis* 166 (2003) 261–270.
- [9] O. Ziouzenkova, L. Asatryan, D. Sahady, G. Orasanu, S. Perrey, B. Cutak, T. Hassell, T.E. Akiyama, J.P. Berger, A. Sevanian, J. Plutzky, Dual roles for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39874–39881.
- [10] K. Demuth, I. Myara, B. Chappey, B. Védie, M.A. Pech-Ansellem, M.E. Haberland, N. Moatti, A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (1996) 773–783.
- [11] Y.H. Chang, D.S.P. Abdalla, A. Sevanian, Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein, *Free Radical Biol. Med.* 23 (1997) 202–214.
- [12] C.H. Chen, T. Jiang, J.H. Yang, W. Jiang, J. Lu, G. Marathe, H.J. Pownall, C.M. Ballantyne, T.M. McIntyre, P.D. Henry, C.Y. Yang, Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription, *Circulation* 107 (2003) 2102–2108.
- [13] S. Benítez, M. Camacho, R. Arcelus, L. Vila, C. Bancells, J. Ordóñez-Llanos, J.L. Sánchez-Quesada, Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL, *Atherosclerosis* 177 (2004) 299–305.
- [14] D. Benítez, V. Villegas, C. Bancells, O. Jorba, F. González-Sastre, J. Ordóñez-Llanos, J.L. Sánchez-Quesada, Impaired binding affinity of electronegative low-density lipoprotein (LDL) to the LDL receptor is related to non-esterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content, *Biochemistry* 43 (2004) 15863–15872.
- [15] Z.F. Stephan, E.C. Yurachek, Rapid fluorimetric assay of LDL receptor activity by DiI labeled LDL, *J. Lipid Res.* 34 (1993) 325–330.
- [16] D. Rossi, A. Zlotnik, The biology of chemokines and their receptors, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 217–242.
- [17] D. Rott, J. Zhu, Y.F. Zhou, M.S. Burnett, A. Zalles-Ganley, S.E. Epstein, IL-6 is produced by splenocytes derived from CMV-infected mice in response to CMV antigens, and induces MCP-1 production by endothelial cells: a new paradigm for infection-induced atherogenesis, *Atherosclerosis* 170 (2003) 223–228.
- [18] C. Viedt, J. Vogel, T. Athanasiou, W. Shen, S.R. Orth, W. Kübler, J. Kreuzer, Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor- $\kappa$ B and activator protein-1, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 914–920.
- [19] A.S. Cowburn, J. Deighton, S.R. Walmsley, E.R. Chilvers, The survival effect of TNF- $\alpha$  in human neutrophils is mediated via NF- $\kappa$ B dependent IL-8 release, *Eur. J. Immunol.* 34 (2004) 1733–1743.
- [20] T. Geiser, B. Dewald, M.U. Ehrenguber, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO $\alpha$ , GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  activate human neutrophil and basophil leukocytes, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 15419–15424.
- [21] R.E. Gersten, E.A. Garcia-Zepeda, Y.C. Lim, M. Yoshida, H.A. Ding, M.A. Gimbrone Jr., A.D. Luster, F.W. Luscinskas, A. Rosenzweig, MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions, *Nature* 398 (1999) 718–723.
- [22] J. Gomez-Cambronero, J. Horn, C.C. Paul, M.A. Baumann, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway, *J. Immunol.* 171 (2003) 6846–6855.
- [23] C.Y. Yang, J.L. Raya, H.H. Chen, C.H. Chen, Y. Abe, H.J. Pownall, A.A. Taylor, C.V. Smith, Isolation, characterization, and functional assessment of oxidatively modified subfractions of circulating low-density lipoproteins, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1083–1090.
- [24] M. Sakai, S. Kobori, A. Miyazaki, S. Horiuchi, Macrophage proliferation in atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.* 11 (2000) 503–509.
- [25] G. Plenz, S. Reichenberg, C. Koenig, J. Rauterberg, M.C. Deng, H.A. Baba, H. Robenek, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates the expression of type VIII collagen mRNA in vascular smooth muscle cells and both are codistributed during atherogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 1658–1668.
- [26] M.I. Savenkova, D.M. Mueller, J.W. Heinecke, Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low-density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20394–20400.
- [27] S. Sugiyama, Y. Okada, G.K. Sukhova, R. Virmani, J.W. Heinecke, P. Libby, Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes, *Am. J. Pathol.* 158 (2001) 879–891.
- [28] P.M. Ridker, Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention, *Circulation* 107 (2003) 363–369.
- [29] P.M. Ridker, N. Rifai, M.J. Stampfer, C.H. Hennekens, Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men, *Circulation* 101 (2000) 1767–1772.
- [30] J.T. Parissis, K.F. Venetsanou, M.V. Kalantzi, D.D. Mentzifok, S.M. Karas, Serum profiles of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and C-C chemokines in hypertensive patients with or without significant hyperlipidemia, *Am. J. Cardiol.* 85 (2000) 777–779.
- [31] A. Rezaie-Majd, T. Maca, R.A. Bucek, P. Valent, M.R. Müller, P. Husslein, A. Khashanipour, E. Minar, M. Baghestanian, Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 1194–1199.
- [32] D. Zozulinska, A. Majchrzak, M. Sobieska, K. Wiktorowicz, B. Wierusz-Wysocka, Serum interleukin-8 level is increased in diabetic patients, *Diabetologia* 42 (1999) 117–118.

- [33] M. Straczkowski, S. Dzienis-Straczkowska, A. Stepień, I. Kowalska, M. Szelachowska, I. Kinałska, Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor- $\alpha$  system, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 4602–4606.
- [34] J.L. Sánchez-Quesada, A. Pérez, A. Caixàs, J. Ordóñez-Llanos, G. Carreras, F. González-Sastre, A. de Leiva, Electronegative low-density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control, *Diabetologia* 39 (1996) 1469–1476.
- [35] J.L. Sánchez-Quesada, S. Benítez, M. Franco, C. Otal, F. Blanco-Vaca, J. Ordóñez-Llanos, Density distribution of electronegative LDL (LDL(-)) in normolipemic and hyperlipemic subjects, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 699–705.
- [36] S. Benítez, J. Ordóñez-Llanos, M. Franco, C. Marín, E. Paz, J. López-Miranda, C. Otal, F. Pérez-Jiménez, J.L. Sánchez-Quesada, Effect of simvastatin in familial hypercholesterolemia on the affinity of charge-differing low-density lipoprotein subfractions to the low-density lipoprotein receptor, *Am. J. Cardiol.* 93 (2004) 414–420.
- [37] S. Benítez, J.L. Sánchez-Quesada, V. Ribas, O. Jorba, F. Blanco-Vaca, F. González-Sastre, J. Ordóñez-Llanos, Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction, *Circulation* 108 (2003) 92–96.

Short communication

# Atherogenic and inflammatory profile of human arterial endothelial cells (HUAEC) in response to LDL subfractions

Conxita de Castellarnau<sup>c,d,1</sup>, Cristina Bancells<sup>a,1</sup>, Sònia Benítez<sup>a</sup>, Manuel Reina<sup>c</sup>,  
Jordi Ordóñez-Llanos<sup>a,b</sup>, José Luis Sánchez-Quesada<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Cell Biology, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Advancell S.L. Barcelona Science Park, Barcelona, Spain

Received 7 July 2006; received in revised form 25 July 2006; accepted 25 July 2006

Available online 29 July 2006

## Abstract

**Background:** Electronegative LDL (LDL(−)) is a minor modified LDL fraction present in plasma that has been demonstrated to be inflammatory in endothelial cells isolated from human umbilical vein (HUVEC).

**Methods:** A protein array able to measure 42 cytokines, chemokines and related compounds involved in atherogenesis was used to determine their release into the culture medium of human arterial endothelial cells (HUAEC) activated or not by two low-density lipoprotein (LDL) fractions isolated from human plasma by anion-exchange chromatography.

**Results:** The results of the protein array (confirmed using specific ELISAs for each induced factor) revealed that HUAEC in the absence of stimuli released small amounts of interleukin 8 (IL-8), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and growth-related oncogene (GRO). The major native LDL fraction (named LDL(+)) increased the release of these molecules and also those of interleukin 6 (IL-6) and GRO $\alpha$ . Compared to LDL(+), the minor modified fraction, named electronegative LDL (LDL(−)), increased all these factors to a greater degree and also induced the release of granulocyte–monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) and platelet-derived growth factor B (PDGF-B). These results were confirmed by ELISA.

**Conclusions:** All these results indicate that, compared to LDL(+), LDL(−) fraction promotes not only the release of proinflammatory factors but also those of atherogenic factors in endothelial cells of arterial origin, thereby suggesting a new role for LDL(−) in atherogenesis.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Electronegative LDL; Arterial endothelial cells; Inflammation; Atherosclerosis

## 1. Introduction

Increased levels of low-density lipoproteins (LDL) are a major risk factor for cardiovascular disease, and LDL is directly involved in atherogenesis through the induction of an inflammatory phenotype in the arterial wall. This inflammation is mainly exerted by LDL after its chemical modification in the arterial wall or in the bloodstream. Electronegative LDL (LDL

(−)) is a minor modified LDL fraction present in plasma that has been demonstrated to be inflammatory [1] in endothelial cells isolated from human umbilical vein (HUVEC). In the same cell model, LDL(−) induces the production of chemotactic factors, such as interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) [2,3], and enhances the expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM) induced by tumor necrosis factor  $\alpha$  [4]. Furthermore, increased mononuclear cell adhesion to HUVEC induced by LDL(−) under flow conditions was functionally assessed by Yang et al. [5]. However, these studies were developed in endothelial cells of venous origin, but no data exist on the inflammatory effect of LDL(−) on arterial endothelial cells. This is a matter of particular interest since atherosclerosis occurs in arteries, and expression profiling of several genes

\* Corresponding author. Servei Bioquímica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932919451; fax: +34 932919196.

E-mail address: [jsanchezq@santpau.es](mailto:jsanchezq@santpau.es) (J.L. Sánchez-Quesada).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this paper.

differs in endothelial cells from different blood vessels [6]. Specifically, atherogenic stimuli, such as oxidized LDL, induced an expression profile more atherogenic in endothelial cells of arterial origin than in venous cells [7]. Our purpose was to screen the effects that LDL fractions (LDL(-) and the non-modified or native form LDL(+)) exert on arterial endothelial cells using a protein array system permitting us to identify the basal and induced profile of a wide range of cytokines, chemokines and related compounds involved in atherogenesis. The release of each induced factor was quantified using specific ELISAs.

## 2. Methods

### 2.1. Lipoprotein isolation

Plasma EDTA was obtained from normolipemic, normoglycemic and non-smoker subjects and pooled to isolate LDL fractions [3]. Total LDL (1.019–1.050 g/ml) was isolated by sequential ultracentrifugation and LDL was then subfractionated into LDL(+) (non-modified LDL) and LDL(-) by anion exchange chromatography [3]. LDL fractions were chemically characterized and differences in electronegativity were confirmed by agarose gel electrophoresis, as described [2,3].

### 2.2. Cell culture

Human umbilical artery endothelial cells (HUAEC) were isolated from pooled umbilical arteries by enzymatic digestion with collagenase using an olive-

pointed needle. HUAEC were grown in gelatin-coated flasks with endothelial cell EGM-2 medium (Clonetics) containing 2% FCS supplemented with vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2, epidermal growth factor, insulin-like growth factor, hydrocortisone, ascorbic acid and antibiotics. The typical morphology, specific positive staining for von Willebrand factor and VE-cadherin and negative staining for smooth muscle cell-specific  $\alpha$ -actin confirmed the purity of these endothelial arterial cells (data not shown). Cells at passage 2–4 were seeded in six-well plates at 10,000 cells/cm<sup>2</sup>. At confluence, growth medium was replaced with fresh medium containing 5% FCS without other growth factors for 24 h. Thereafter, LDL fractions were added for a subsequent 24 h at 150 mg apoB/L in 199 medium containing 1% FCS without growth factors. LDL subfractions were previously dialyzed against 199 medium and filtered through 0.22  $\mu$ m. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (10  $\mu$ g/L) was used as a positive inflammatory control in all experiments. Culture supernatant aliquots were stored at -80 °C until protein array and ELISA analysis.

### 2.3. Protein array

The RayBio™ Human Cytokine Array III (Ray Biotech) was used. This system permits the measurement of 42 cytokines, chemokines and atherogenic molecules, as shown in Fig. 1A. Arrays were incubated with undiluted culture media and developed following the manufacturer's instructions.

### 2.4. ELISA

Positive results obtained with the protein array for IL-6, IL-8, MCP-1, GRO $\alpha$ , GM-CSF and PDGF-B were confirmed and quantified by commercial ELISA (Module Set antibody pairs, Bender MedSystems, except PDGF-B from RayBio and GRO $\alpha$  from R&D) according to the manufacturers' instructions. GRO $\gamma$  and GRO $\beta$  were measured by ELISA with unlabeled and biotinylated

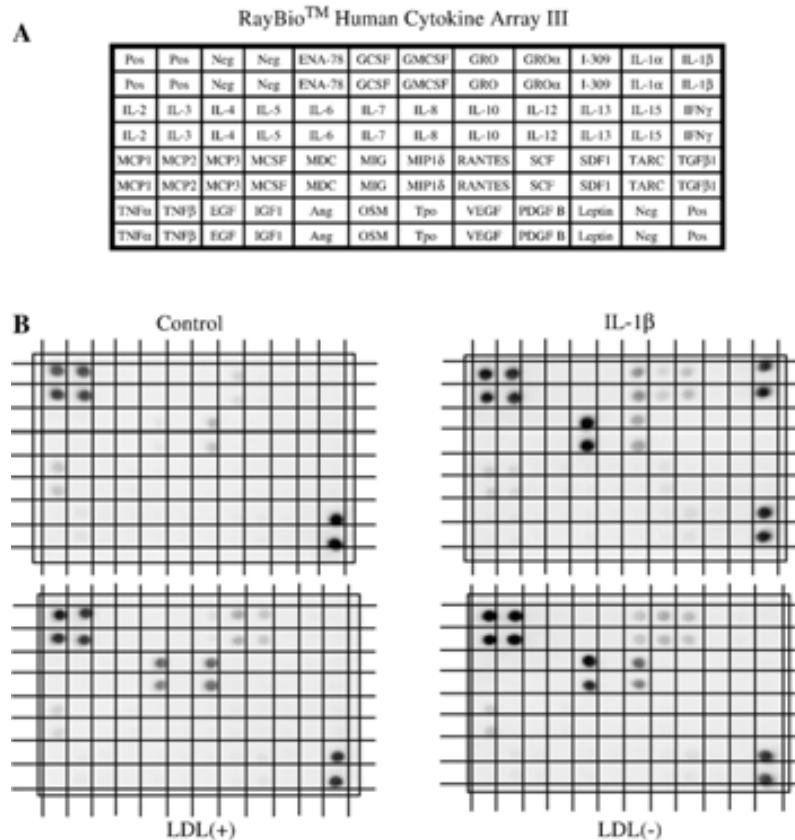


Fig. 1. Simultaneous detection of multiple factors using the RayBio™ Human Cytokine Array III. (A) Distribution of spots in the protein array membrane. (B) Representative experiment of membranes incubated with culture supernatants of untreated cells (control cells) or stimulated with LDL(+) (150 mg/L), LDL(-) (150 mg/L) and IL-1 $\beta$  (10  $\mu$ g/L) under the conditions described in Methods. Membranes were incubated with undiluted media and revealed as described by the manufacturer.

polyclonal antibodies (PeproTech) using the procedure recommended by the manufacturer, as described [8]. Culture supernatants of arterial cells incubated with LDL(+) and LDL(-) fractions were diluted 1/30 for IL-6, 1/5 for GM-CSF and GRO $\alpha$ , 1/20 for PDGF-B and 1/100 for IL-8, MCP-1, GRO $\gamma$  and GRO $\beta$ . Supernatants of cells incubated with IL-1 $\beta$  were diluted 10-fold more than supernatants of cells incubated with LDL fractions. Supernatants from six independent experiments were measured by ELISA.

### 2.5. Statistical analysis

Results are expressed as mean $\pm$ S.D. SPSS 11.5.2 statistical package was used. Inter-group differences were tested with Wilcoxon's *T*-test (for paired data) and Mann–Whitney *U*-test (for unpaired data). A *P*-value <0.05 was considered significant.

## 3. Results

Physicochemical characteristics of LDL(+) and LDL(-) were similar to those previously described [2,3]. Briefly, LDL (-) presented increased non-esterified fatty acids (NEFA), apoE, apoC-III, free cholesterol and triglyceride and decreased apoB content compared with LDL(+) (data not shown).

All inflammatory and atherogenic molecules tested with the protein array used are shown in Fig. 1A, and representative results obtained after incubation of HUAEC with LDL(+), LDL (-) and IL-1 $\beta$  in Fig. 1B. Untreated cells (control) showed a basal production of IL-8, GRO and MCP-1 which clearly increased in LDL(+)-treated cells. This unmodified LDL(+) fraction also increased the release of IL-6 and GRO $\alpha$  compared to control cells, whereas LDL(-) promoted to a greater extent the release of IL-6, IL-8, MCP-1, PDGF-B and GM-CSF compared to LDL(+). Finally, IL-1 $\beta$  increased the production of these molecules (except PDGF-B) and also small amounts of MCP-2 compared to control cells. It should be noted that the GRO family is composed of three members: GRO $\alpha$ , GRO $\beta$  and GRO $\gamma$ ; thus, GRO dots in the membrane array refer to the three members, whereas GRO $\alpha$  dots refer to this molecule alone.

Since the protein array is a semi-quantitative method, the concentration of the molecules whose release appeared induced in LDL-treated cells in the array system was quantified by ELISA (Fig. 2). Compared to control cells, LDL(+) significantly induced the release of MCP-1, IL-8, IL-6, GM-CSF, GRO $\beta$  and GRO $\gamma$ , but not those of the atherogenic factor PDGF-B (Fig. 2). In turn, after subtraction of the basal release (control cells), LDL(-) significantly increased the release of IL-8 (1.7-fold), MCP-1 (2.5-fold), IL-6 (2.3-fold), GM-CSF (1.9-fold) and PDGF-B (4.3-fold) compared to LDL(+) fraction. The three members of the GRO family, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  increased only marginally (1.2- to 1.5-fold) after incubation with LDL(-). The inflammatory mediator IL-1  $\beta$  (used as positive control) was, in general, more active than LDL(-) in inducing the synthesis of all factors produced by treated cells, except MCP-1. However, this cytokine did not increase the release of PDGF-B in HUAEC as did LDL(-)-treated cells.

## 4. Discussion

A major finding of the current work was that some inflammatory effects induced by LDL(-) on the current venous model

of HUVEC [2–5,8] were also reproduced using human arterial cells. This is significant since atherosclerosis occurs in arterial but not in venous vessels, and it has been demonstrated that endothelial cells from different blood vessels and tissues show distinct expression profiles and responses to atherogenic stimuli [6,7]. The preferential arterial presence of atherosclerosis is usually attributed to the hemodynamic characteristics of arteries; however, a local inflammatory response that would depend on the nature of endothelial cells could also be involved. Our results showed significant differences between arterial cells

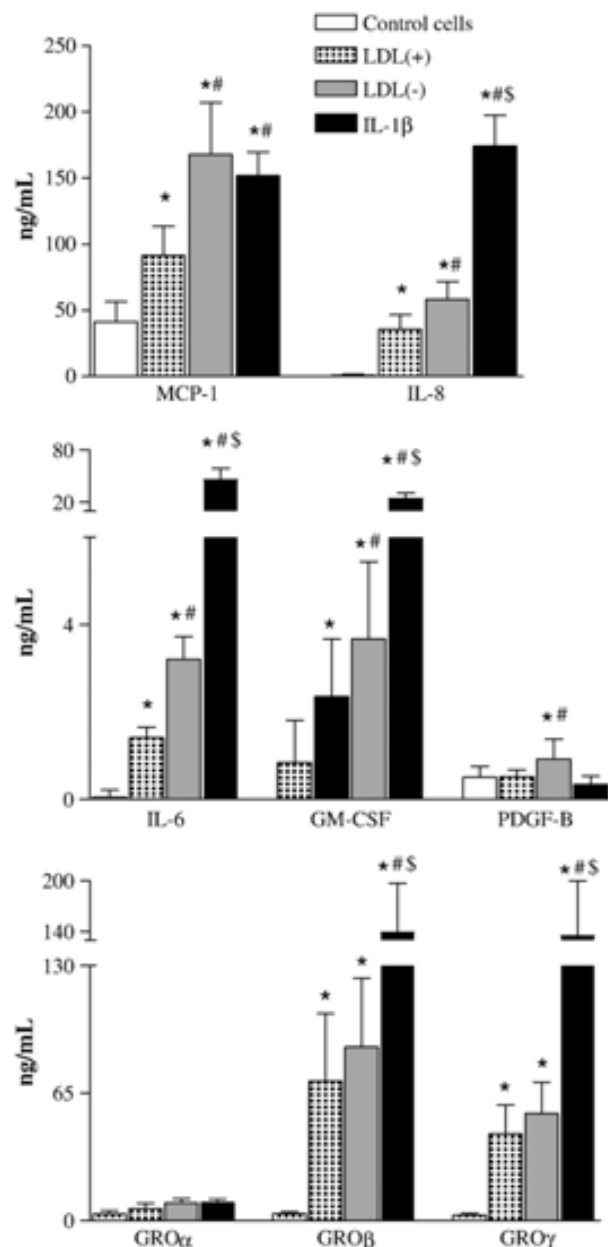


Fig. 2. Release of IL-8, MCP-1, IL-6, GM-CSF, PDGF-B, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  by arterial cells (HUAEC). Confluent cells were incubated with LDL(+) (150 mg/L), LDL(-) (150 mg/L) or IL-1 $\beta$  (10  $\mu$ g/L) and the release of these factors into the culture medium was measured by ELISA, as described in Methods. Data are the mean $\pm$ S.D. of 6 independent experiments. \**P*<0.05 vs control cells; #*P*<0.05 vs LDL(+); *S**P*<0.05 vs LDL(-).



in the current study and venous cells in a previous study [8] in response to LDL(–). Qualitatively, these differences were mainly two. First, in arterial cells, the members of the GRO family were poorly stimulated by LDL(–) compared to LDL(+), suggesting that members of the GRO family could play a minor role in atherogenesis. Reports focused on GRO members as inflammatory mediators in atherosclerosis are scarce and, to our knowledge, there are no reports describing increased GRO expression in atherosclerotic arterial wall. In fact, the chemotactic activity exerted by GRO on lymphocytes and granulocytes is efficiently induced by IL-8, a key factor in atherogenesis. However, this possibility should be considered with caution since our observation may be attributed to the high GRO release induced by LDL(+), specifically of  $\beta$  and  $\gamma$  members, rather than a poor stimulation due to LDL(–). In this respect, the induction of GRO members by LDL(+) in cultured HUVEC was only slightly increased compared to control cells [8]; this observation suggests that arterial cells (HUAEC) would be more sensitive to an inflammatory response induced by LDL(+) than the current cell model of HUVEC.

The second qualitative difference between arterial and venous cells was that HUAEC released PDGF-B, an important mediator that was not produced by HUVEC [8] but which has been involved in atherogenesis [9]. Interestingly, its release was significantly increased (4.3-fold) compared to controls and LDL (+)-treated HUAEC in response to LDL(–), but not in response to the typical inflammatory mediator IL-1 $\beta$ ; this could indicate a new atherogenic property for electronegative LDL that is different in arterial and venous cells. This concurs with the study of Deng et al. [7], reporting that other forms of atherogenic LDLs, such as oxidized LDL, stimulate to a greater degree the expression of cell proliferation-related genes in arterial than in venous cells. On the other hand, differences between LDL(+) and LDL(–) on IL-6, IL-8, MCP-1 and GM-CSF release were similar in HUAEC than those previously reported in HUVEC [3,8]. However, on a quantitative basis, the effect of both LDL subfractions on IL-6, IL-8, MCP-1 and GM-CSF was stronger in HUAEC than in HUVEC (approximately 3-fold, 3-fold, 1.5-fold and 10-fold, respectively) [2,8], suggesting that arterial cells are more sensitive and, consequently, a better “in vitro” model to study the inflammatory properties of lipoproteins. Taken together, these results confirm a wide proinflammatory action of LDL(–) on arterial endothelial cells. IL-6 is a central mediator of the acute-phase response and the main determinant of C-reactive protein (CRP) synthesis [10]. IL-8, MCP-1 and GRO members are chemokines involved in lymphocyte and monocyte recruitment, respectively, during early phases of atherogenesis [11] and GM-CSF can also participate in neutrophil recruitment [12]. In addition, GM-CSF induces monocyte/macrophage differentiation [13] and PDGF-B plays a central role in the modulation of smooth muscle cell growth and migration and in the angiogenic properties of endothelial cells [14]. Thus, these observations provide evidence that a high proportion of LDL(–) in blood could impair arterial endothelium function, leading to the enhancement of several inflammatory mechanisms involved in different stages of atherosclerosis. Interestingly, non-modified LDL (LDL(+)) could also alter *in vitro* the inflammatory

characteristics of arterial endothelial cells, though to a lesser extent. Finally, we report for the first time that only LDL(–) fraction was able to induce significantly the release of PDGF-B in human arterial cells compared to LDL(+) and IL-1 $\beta$ . Further studies will be required to assess a more general role of circulating LDL(–) not only in inflammation but also in atherogenesis.

### Acknowledgements

This work was supported by grants MCYT SAF2001-0480 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT) and C03/01, C03/08, PI030885 and CP040110 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) FIS. CdC is the recipient of a research contract (PTQ 2001-0090) and CB is the recipient of a predoctoral fellowship (FPU 2004-1468) from MCYT. The authors are grateful to Mercedes Zuasti for excellent technical assistance and to Christine O’Hara for excellent editorial assistance.

### References

- [1] Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Ordóñez-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:329–35.
- [2] de Castellarnau C, Sánchez-Quesada JL, Benítez S, et al. Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2281–7.
- [3] Sánchez-Quesada JL, Camacho M, Antón R, Benítez S, Vila L, Ordóñez-Llanos J. Electronegative LDL of FH subjects. Chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2003;166:261–70.
- [4] Ziouzenkova O, Asatryan L, Sahady D, et al. Dual roles for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2003;278:39874–81.
- [5] Yang CY, Raya JL, Chen HH, et al. Isolation, characterization, and functional assessment of oxidatively modified subfractions of circulating low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1083–90.
- [6] Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, et al. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:10623–8.
- [7] Deng DX, Tsalenko A, Vailaya A, et al. Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli. *Circ Res* 2006;98:200–8.
- [8] Benítez S, Camacho M, Bancells C, Vila L, Sánchez-Quesada JL, Ordóñez-Llanos J. Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array. *Biochim Biophys Acta*. in press.
- [9] Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986;46:155–69.
- [10] Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767–72.
- [11] Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217–42.
- [12] Gomez-Cambronero J, Horn J, Paul CC, Baumann MA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway. *J Immunol* 2003;171:6846–55.
- [13] Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, Horiuchi S. Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:503–9.
- [14] Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999;79:1283–316.

# Pro-inflammatory action of LDL(–) on mononuclear cells is counteracted by increased IL10 production

Sònia Benítez<sup>a,\*</sup>, Cristina Bancells<sup>a</sup>, Jordi Ordóñez-Llanos<sup>b,c</sup>, Jose Luis Sánchez-Quesada<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Servei Bioquímica, Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Servei de Bioquímica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Spain

<sup>c</sup> Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Received 22 November 2006; received in revised form 1 March 2007; accepted 2 March 2007

Available online 16 March 2007

## Abstract

**Objective:** LDL(–) is a minor LDL subfraction that induces inflammatory factor release by endothelial cells. Since LDL(–) is present in plasma, its interaction with leucocytes, a cell type involved in atherosclerosis phenomena, is feasible; therefore, the aim of the current study was to evaluate LDL(–) effect on lymphocytes and monocytes isolated from human plasma. **Methods and Results:** Mononuclear cells were incubated with LDL(+) and LDL(–) and expression and release of several inflammatory mediators were analyzed by protein membrane assay, ELISA and real-time RT-PCR. LDL(–) induced a significantly increased production versus LDL(+) in MCP1, GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , IL6, IL8 and IL10 in monocytes as well as in lymphocytes. These induced molecules are inflammatory, except for IL10 which is considered an anti-inflammatory cytokine. Therefore, the role of IL10 was evaluated in experiments where exogenous IL10 or antibodies anti-IL10 or anti-IL10 receptor were added. IL10 addition diminished the release of the other factors induced by LDL(–) near to basal production both at protein and RNA level. In contrast, the antibody anti-IL10 increased inflammatory cytokine release around two-fold, whereas the antibody anti-IL10 receptor produced a lower effect. **Conclusions:** LDL(–) promoted inflammatory cytokine production in leucocytes; however, it also induced IL10 that minimized this effect. Therefore, IL10 developed a significant role in counteracting the LDL(–) inflammatory action.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** LDL(–); Cytokine; Monocyte; Lymphocyte; IL10

## 1. Introduction

Modified LDL is a key factor in the initiation and development of atherosclerosis and it is widely accepted that LDL modification takes place when the lipoprotein is trapped in the arterial intima where it can exert its inflammatory action [1]. The existence of a modified LDL in the circulation is controversial; however, several reports have described the presence of an electronegative LDL (LDL(–)), a minor LDL subfraction with increased electronegative charge, which presents atherosclerotic and pro-inflammatory properties [2]. LDL(–) proportion is increased in diseases associated with atherosclerosis, such as diabetes mellitus or familial hyper-

cholesterolemia [3–5]. Furthermore, in endothelial cells LDL(–) promotes inflammatory molecule release [6–9], cytotoxicity [10,11] and apoptosis [12].

Apart from endothelial cells, leucocytes are also closely involved in atherosclerosis, since recruitment of monocytes and lymphocytes from peripheral blood to the intima of the vessel wall is a primordial event in atherogenesis [13]. In fact, recruitment of mononuclear leucocytes is essential for the development and progression of atherosclerotic lesions and is an event that appears to depend on the local presence of LDL. On the other hand, lymphocytes, and especially monocytes, synthesize several inflammatory factors, such as different interleukins, growth factors, chemokines or cytokines, some of which are also shared with endothelial cells. Furthermore, these cell types can interact with LDL; since LDL(–) is present in plasma, it is feasible that this modified LDL could act on leucocytes, thereby promoting an inflammatory response.

\* Corresponding author. Tel.: +34 932919261; fax: +34 932919196.

E-mail address: [sbenitez@hsp.santpau.es](mailto:sbenitez@hsp.santpau.es) (S. Benítez).

The aim of the current work was to evaluate LDL(–) effect on monocytes and lymphocytes isolated from human blood. In both cell types, LDL(–) induced two-fold versus native non-electronegative LDL (LDL(+)), the release and transcription of different inflammatory molecules, including monocyte chemoattractant protein (MCP1), growth-related oncogene  $\beta$  and  $\gamma$  (GRO $\beta$  and GRO $\gamma$ ), interleukin 6 (IL6) and interleukin 8 (IL8). All these molecules are also released by endothelial cells in response to LDL(–) and are related to inflammatory processes. However, in monocytes and lymphocytes, LDL(–) also induced synthesis and release of interleukin 10 (IL10), a cytokine considered as anti-inflammatory. Several studies show a protective action of IL10 *in vivo*, such as those with mice overexpressing or lacking IL10, the consequence of which is a diminution in atherosclerotic lesion size [14] or lesion development [15], respectively. Regarding the effect of IL10 in culture cells, it exerts different immunoregulatory actions depending on cell type [16], with the decrease in inflammatory cytokine production in monocytes [17], lymphocytes [18], macrophages [19] and neutrophils [20] being one of the most important.

Owing to these properties ascribed to IL10, its effect on the inflammatory response induced by LDL(–) on leucocytes was evaluated. Taken together, data indicated that IL10 promoted a decrease in the release of inflammatory cytokines induced by LDL(–); hence, IL10 appears to develop a pivotal modulatory role in LDL(–) action.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Lipoprotein isolation

Plasma samples from healthy normolipemic subjects (total cholesterol < 5.2 mmol/L, triglyceride < 1 mmol/L) were obtained in EDTA-containing Vacutainer tubes. Total LDL (1.019–1.050 kg/L) was isolated by sequential flotation ultracentrifugation at 4 °C in presence of 1 mmol/L EDTA, and LDL was dialyzed against buffer A (Tris 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 7.4). LDL(+) and LDL(–) were separated by preparative anion-exchange chromatography in an ÄKTA–FPLC system (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) and characterized as described [8]. In all experiments, LDL(–) proportion of the subjects ranged from 4 to 6% of total LDL and main characteristics of both LDL subfractions did not differ from previously reported.

### 2.2. Cell isolation and incubation with LDLs

Peripheral blood of human volunteers was collected and mononuclear cells were isolated from it the same day. The study was approved by the institutional Ethics Committee and subjects gave their written informed consent. Cells were isolated according to density [21] using density gradient centrifugation at 1.077 kg/L with Linfosep (Biomedics, Madrid, Spain). Differentiation between monocytes and lymphocytes from total mononuclear cells was made depending on their adhesive properties after 20 h of culture to allow adhesion. Differential cell count was assessed by flow-cytometry with 2 laser FACScalibur (Becton Dickinson, Madrid, Spain) with a four-marker combination, and by May Grünwald/Giemsa staining (monocyte purity 80–85%, lymphocyte purity 90–95%). Cell viability was verified by LDH assay (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and ethidium bromide/acridine orange staining (Sigma, Madrid, Spain).

Cells were cultured in 6-well or 12-well plates with RPMI 1640 medium (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA) supplemented with 10% fetal calf serum at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Before incubation, plates with the appropriate number of cells for each experiment (10<sup>6</sup> cells for protein membrane assay and ELISA and 3 × 10<sup>6</sup> cells for real-time RT-PCR studies) were incubated in deficient medium

(1% fetal calf serum); this medium was used to avoid the presence of other lipoproteins apart from LDL subfractions. LDL(+) and LDL(–) subfractions were dialyzed against RPMI 1640 medium in Sepharose G25M columns (Amersham, Pharmacia, Uppsala, Sweden) and filtered in sterile conditions prior to incubation. After testing different concentrations in preliminary experiments, it was determined that 150 mg apoB/L LDLs was the appropriate concentration to add to the wells. Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma, Madrid, Spain) at 0.1 mg/L was used as a positive control, and cells without added stimulus were considered as basal production.

In some experiments, actinomycin D (Sigma, Madrid, Spain) was used at 1 mg/L to inhibit transcription. In other experiments, exogenous IL10, antibodies anti-IL10 or anti-IL10R were also added under the conditions explained below. Control experiments in the presence of polymyxin B (50 mg/L) (Sigma, Madrid, Spain) in the medium were performed to rule out the possibility that trace amounts of LPS present in LDL samples were responsible for the LDL effect.

### 2.3. Protein membrane assay and ELISA assay

In all studies in which protein release was evaluated, 10<sup>6</sup> cells were incubated in 12-well plates (1 mL) under each condition. After incubation of cells with samples, culture medium supernatants were collected and frozen at –80 °C.

For protein membrane assay, supernatants were used without dilution in RayBio Human Cytokine Array III (RayBiotech, Norcross, GA, USA). This system is a membrane array based on detection with antibodies and chemoluminescent measurement, and permits the determination of 42 cytokines, chemokines and related molecules simultaneously. Protein membrane assays were incubated with samples for 20 h and developed according to the manufacturer's instructions as described [7]. A differential induction by LDL(–) was considered when the ratio in spot intensity between LDL(–)/LDL(+) was higher than 1.5, spots appeared in the 2 independent experiments performed and spot intensity was greater than 5 pixels. Proteins released to a greater degree by LDL(–) compared to LDL(+), according to the former criteria, were later evaluated and quantified by ELISA.

ELISA used was Module Set antibody pairs (Bender MedSystems, Burlingame, CA, USA) and antibodies for GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) following the protocols described [7]. In ELISA assays, several incubation times, in time-course experiments, and LDL concentrations were tested to establish the more suitable conditions, and following ELISA studies were performed under those conditions.

### 2.4. Real-time RT-PCR

RNA was extracted from 3 × 10<sup>6</sup> cells cultured in 6-well plates (2 mL). After incubation with LDLs for 4 and 20 h, cells were scraped and collected in RNase-free conditions and pellets frozen after centrifugation. RNA extraction was performed with the Qiagen extraction kit RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany) from cell pellets. Reverse transcription was performed with 1  $\mu$ g of each RNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase H- (Promega, Madrid, Spain). Quantitative RNA analysis was developed by real-time RT-PCR (AbiPrism 7000; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The mRNA expression of the selected genes was studied using predesigned validated assays (assays-on-demand; Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) and human  $\beta$ -actin (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used as internal control.

### 2.5. Effect of IL10

IL10 effect on mononuclear cells was evaluated by comparing cytokine release induced by LDLs alone or co-incubated with different concentrations of the following compounds: IL10 (2, 5 and 10  $\mu$ g/L) (Sigma, Madrid, Spain), antibody anti-IL10R subunit  $\alpha$  (IL10R) (5 and 15 mg/L) (Sigma, Madrid, Spain) or antibody anti-IL10 (5 and 15 mg/L) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). After incubation under the different conditions, supernatants were collected and frozen to assess cytokine release by ELISA. Real-time RT-PCR was performed following the method described above to evaluate IL10 effect on transcription of the cytokines induced by LDL(–).

Pos	Pos	Neg	Neg	ENA78	CSF	GMCSF	GRO	GRO $\alpha$	I309	IL1 $\alpha$	IL1 $\beta$
Pos	Pos	Neg	Neg	ENA78	CSF	GMCSF	GRO	GRO $\alpha$	I309	IL1 $\alpha$	IL1 $\beta$
IL2	IL3	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL10	IL12	IL13	IL15	IFN $\gamma$
IL2	IL3	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL10	IL12	IL13	IL15	IFN $\gamma$
MCP1	MCP2	MCP3	MCSF	MDC	MIG	MIP1 $\delta$	RANTES	SCF	SDF1	TARC	TGF $\beta$
MCP1	MCP2	MCP3	MCSF	MDC	MIG	MIP1 $\delta$	RANTES	SCF	SDF1	TARC	TGF $\beta$
TNF $\alpha$	TNF $\beta$	EGF	IGF	Ang	OSM	Tpo	VEGF	PDGFB	Leptin	Neg	Pos
TNF $\alpha$	TNF $\beta$	EGF	IGF	Ang	OSM	Tpo	VEGF	PDGFB	Leptin	Neg	Pos

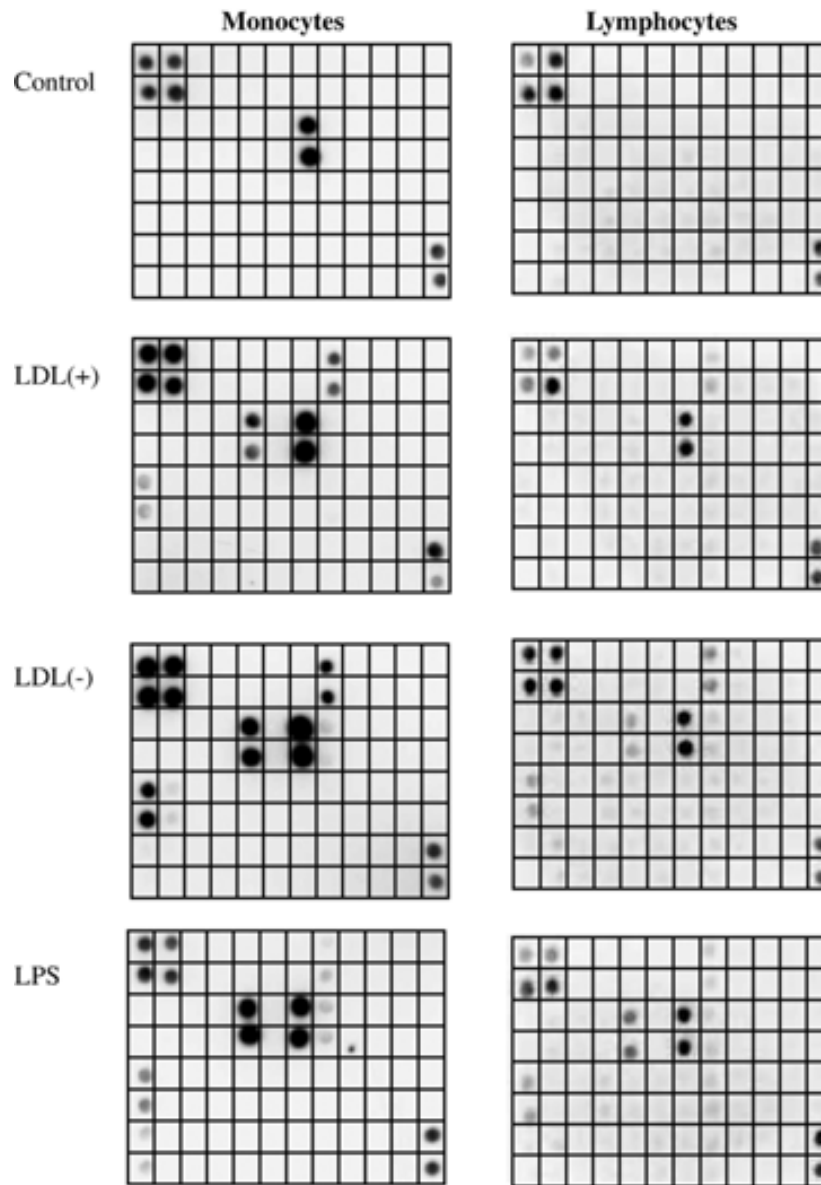


Fig. 1. Representative protein membrane assay showing results from supernatants of monocytes (left side) and lymphocytes (right side). Cells ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated with LDL(+), LDL(-) or LPS for 20 h, as described in Materials and methods. Each protein membrane assay was incubated with 1 mL of each supernatant without dilution and was revealed following the manufacturer’s instructions. Upper figure shows a template with the antibody distribution in the protein membrane assay (Pos: positive control, Neg: negative control). Note that the sensitivity of the array varies for the different molecules assayed; therefore, the intensity of the spot cannot be used as representative of the amount of cytokine induced.

## 2.6. Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SD. A Sigma Stat 2.0 statistical package was used. Differences between groups were tested with Wilcoxon's *t*-test (for paired data). A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Protein membrane assay

Up to 42 inflammatory molecules, indicated in the template (Fig. 1), can be detected by RayBiotech III protein array in which factors reported to be produced by mononuclear cells are included. Monocyte and lymphocyte supernatants were assessed in the array after 20 h of incubation with LDLs or LPS; this time was chosen according to our previous experience with endothelial cells [7]. A representative example of the results ( $n=2$ ) is shown in Fig. 1.

LDL(-) induced MCP1, GRO, IL6, IL8 and IL10 to a greater degree than LDL(+) in both cell types. The cytokine release by LDL(-) action was even greater than by LPS effect for MCP1, IL8 and GRO. Position in the template for GRO included GRO $\alpha$ , GRO $\beta$  and GRO $\gamma$ ; however, GRO $\alpha$ , which is present alone in the next position, was not induced by LDL(-).

MCP1, IL8 and GRO are chemokines and IL6 a pleiotropic cytokine associated with inflammation; hence, these factors released by LDL(-) are considered pro-inflammatory. However, IL10, which is also induced by LDL(-), develops functions that are considered mainly immunoregulatory. LDL(-) induced the same molecules in both monocytes and lymphocytes; however,

spots were more intense in monocytes than in lymphocytes, and this greater release by monocytes was also observed in control cells or when cells were incubated with LDL(+) or LPS.

Array from control cells, not incubated with LDLs or LPS, showed only the presence of IL-8 in monocytes. In contrast, cells stimulated with LPS released several inflammatory factors in monocytes as well as in lymphocytes.

### 3.2. ELISA assay

As the protein membrane assay method lacks standard curves and only permits semi-quantitative assessment, ELISA assays were performed. MCP1, GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , IL6, IL8 and IL10 were evaluated, since their release was increased by LDL(-), following the criteria of differential induction versus LDL(+) as described in Materials and methods. First of all, optimal incubation conditions of maximal difference between LDL(+) and LDL(-) were found, at 20 h of incubation and 150 mg apoB/L LDL, after testing several LDL concentrations and time-course of cytokine release. Regarding concentration, LDL(-) effect increases with concentration, whereas LDL(+) increases at a much lower rate. It is noteworthy that when LDL(+) concentration was increased to 900 mg/L apoB, the cytokine release promoted on monocytes was only half that induced by LDL(-) at 150 mg/L apoB (data not shown). These concentrations would be more similar to those found in the circulation. In relation to time-course, a representative IL6 and IL10 time-course experiment is shown in Fig. 2. The other cytokine release time-courses showed the same pattern as IL6, since protein release rose with increasing time, at least up to 48 h. However, IL10 was the only

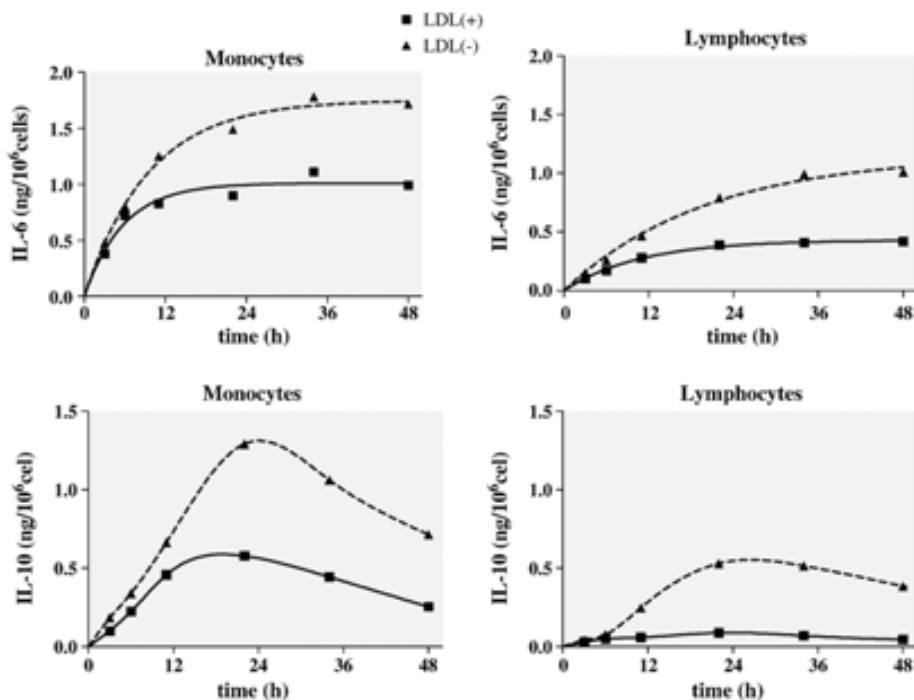


Fig. 2. Time-course release of IL6 and IL10 evaluated by ELISA. Monocytes and lymphocytes ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated with LDL(+) or LDL(-) (150 mg/L apoB), and cytokines induced by LDL(-) were quantified at different times of incubation. IL6 time-course is an example of the other cytokines induced by LDL(-), MCP1, IL8, GRO $\beta$  and GRO $\gamma$  and, in contrast, IL10 presented a different behavior time-course from the other cytokines. Data are the results of a representative experiment.

Table 1  
Cytokine release evaluated by ELISA in the supernatant of monocytes and lymphocytes incubated with LDL(+), LDL(-) and LPS

Protein release	20 h	MCPI	IL6	IL8	IL10	GRO $\beta$	GRO $\gamma$
Monocytes	Control	0.40 $\pm$ 0.39	0.02 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.49	0.05 $\pm$ 0.07	1.25 $\pm$ 1.81	8.58 $\pm$ 4.08
	LDL(+)	1.98 $\pm$ 1.37	0.40 $\pm$ 0.30	13.3 $\pm$ 4.8	0.62 $\pm$ 0.40	6.71 $\pm$ 3.48	19.8 $\pm$ 13.8
	LDL(-)	4.94 $\pm$ 4.15*	0.73 $\pm$ 0.41*	18.2 $\pm$ 5.8*	1.25 $\pm$ 0.50*	12.5 $\pm$ 7.2*	25.6 $\pm$ 16.5*
	LPS	4.61 $\pm$ 3.63*	1.63 $\pm$ 0.85*	17.6 $\pm$ 5.0*	1.43 $\pm$ 0.50*	14.2 $\pm$ 9.4*	27.9 $\pm$ 18.3*
	(-)/(+)†	3.0 $\pm$ 1.4	2.2 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 1.0	2.3 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.9
Lymphocytes	Control	0.52 $\pm$ 0.36	0.01 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.10	0.04 $\pm$ 0.04	1.80 $\pm$ 3.71	7.38 $\pm$ 7.13
	LDL(+)	1.01 $\pm$ 0.65	0.22 $\pm$ 0.19	5.72 $\pm$ 3.60	0.14 $\pm$ 0.09	6.05 $\pm$ 3.30	10.7 $\pm$ 4.7
	LDL(-)	2.05 $\pm$ 1.44*	0.42 $\pm$ 0.25*	9.68 $\pm$ 3.65*	0.40 $\pm$ 0.33*	11.1 $\pm$ 5.4*	16.2 $\pm$ 5.3*
	LPS	3.57 $\pm$ 2.82*	0.93 $\pm$ 0.43*	9.80 $\pm$ 3.12*	0.52 $\pm$ 0.51*	11.6 $\pm$ 4.6*	15.5 $\pm$ 3.7*
	(-)/(+)†	3.3 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.7	3.7 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.8	2.7 $\pm$ 0.8

Results are expressed as ng/10<sup>6</sup> cells (cell density 10<sup>6</sup> cells/mL). Data are the mean $\pm$ SD of 15 independent experiments. \* $p$  < 0.05 versus LDL(+). †LDL(-)/LDL(+) ratio showing the difference in induction between both fractions subtracting control from each assay value.

cytokine that presented different behavior, since its protein level peaked at 20 h and decreased thereafter.

At 20 h, the maximum difference between LDL(-) and LDL(+) was practically reached, with cell viability over 95% being preserved whereas, at longer times, cell viability decreased (86–91% viability at 48 h). Therefore, cytokine release in the supernatant was measured by ELISA ( $n$  = 15) at 20 h (Table 1). LDL(-)/LDL(+) ratio expressed after subtracting basal production is also shown in Table 1. In general, LDL(-) promoted a two-fold cytokine release compared to LDL(+), and similar to or even greater than that induced by LPS. LDL(-)/LDL(+) ratio was similar in both cell types, although production was greater in monocytes, thereby corroborating the protein membrane assay data.

### 3.3. Transcription induction

Transcription of cytokine genes was analyzed to establish whether the inflammatory factor release by LDL(-) was induced by transcriptional mechanisms. An initial approach was to incubate cells with actinomycin D (1 mg/L) simultaneously with 150 mg apoB/L LDL(+) or LDL(-). In both cases, actinomycin D promoted inhibition in cytokine release between 60 and 100% depending on the cytokine evaluated ( $n$  = 3 experiments) whereas, in control cells, cytokine levels remained constant.

Real-time RT-PCR studies were also conducted to evaluate the factors induced by LDL(-) as target genes. Monocytes and lymphocytes were incubated for 4 or 20 h with stimulus prior to RNA extraction and real-time RT-PCR assays ( $n$  = 4). More RNA copies, between 3-fold and 10-fold depending on the cytokine evaluated, were observed at 4 h compared to 20 h; however, differences in induction mediated by LDL(-) versus LDL(+) did not change and concurred with protein results. Hence, at transcriptional level there was a decrease in the number of copies with time whereas, by protein time-course, the effect was opposite (except for IL10 at long incubation times). Data at 4 h of incubation are presented in Table 2 as the number of relative RNA copies versus  $\beta$ -actin, which presents constitutive expression. In summary, these results indicate that LDL(-) induces cytokine release in leucocytes at transcriptional level.

### 3.4. Modulatory IL10 effect

The most striking result of this study was the increased IL10 production by LDL(-), since only inflammatory properties had been attributed to LDL(-), whereas IL10 is considered an anti-inflammatory molecule. Therefore, additional experiments evaluating IL10 effect on monocytes and lymphocytes were developed. Cells were incubated with LDLs, alone or with the addition of exogenous IL10, and the antibodies anti-IL10 or

Table 2  
Number of RNA copies evaluated by real-time RT-PCR of the genes encoding for the cytokines differentially induced by LDL(+) and LDL(-) in monocytes and lymphocytes

RNA copies	4 h	MCPI	IL6	IL8	IL10	GRO $\beta$	GRO $\gamma$
Monocytes	Control	2.36 $\pm$ 0.67	0.08 $\pm$ 0.05	59.6 $\pm$ 29.9	0.19 $\pm$ 0.06	3.28 $\pm$ 1.68	3.73 $\pm$ 1.88
	LDL(+)	12.2 $\pm$ 10.1	2.05 $\pm$ 1.21	190.8 $\pm$ 115.9	0.64 $\pm$ 0.28	9.92 $\pm$ 8.29	23.3 $\pm$ 20.4
	LDL(-)	18.8 $\pm$ 16.6*	5.34 $\pm$ 4.11*	263.4 $\pm$ 158.7*	1.12 $\pm$ 0.59*	17.5 $\pm$ 22.1*	53.6 $\pm$ 59.3*
	(-)/(+)†	1.8 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.9	1.6 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 1.4	1.9 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.8
	Control	2.11 $\pm$ 1.07	0.19 $\pm$ 0.19	22.6 $\pm$ 14.1	0.14 $\pm$ 0.03	1.27 $\pm$ 0.61	1.57 $\pm$ 0.83
Lymphocytes	LDL(+)	4.50 $\pm$ 1.56	0.94 $\pm$ 0.48	57.5 $\pm$ 14.8	0.31 $\pm$ 0.08	3.26 $\pm$ 1.89	7.6 $\pm$ 4.4
	LDL(-)	7.49 $\pm$ 5.25*	3.13 $\pm$ 2.86*	142.8 $\pm$ 88.5*	0.45 $\pm$ 0.08*	13.5 $\pm$ 19.3*	27.3 $\pm$ 35.3*
	(-)/(+)†	2.6 $\pm$ 1.9	3.5 $\pm$ 2.0	4.0 $\pm$ 3.7	2.7 $\pm$ 2.2	4.3 $\pm$ 3.7	3.2 $\pm$ 2.5

Results are expressed as number of relative RNA copies after incubation of cells ( $3 \times 10^6$  cells) with LDL(+) or LDL(-) for 4 h. Data are the mean $\pm$ SD of 4 independent experiments. \* $p$  < 0.05 versus LDL(+). †LDL(-)/LDL(+) ratio showing the difference in induction between both fractions subtracting control from each assay.

anti-IL10R; supernatant cytokine release was then quantified by ELISA ( $n=6$ ). The number of RNA copies was evaluated by real-time RT-PCR assays when exogenous IL10 was added ( $n=3$ ).

A diminished cytokine release when exogenous IL10 was added to LDL(-) compared to LDL(-) alone at 20 h of incubation is shown in Fig. 3. Concentrations of exogenous IL10 were only slightly higher than those released by cells incubated with LDL(-) alone; hence, the results obtained can be considered quite representative. The inhibition after IL10 addition was concentration-dependent, reaching almost 100% inhibition at 10  $\mu\text{g/L}$ ; however, at 2  $\mu\text{g/L}$ , inhibition was already over 50%, except for GRO $\gamma$  in monocytes (31% inhibition).

On the other hand, the inhibitory effect of exogenous IL10 was observed not only in protein release but also at tran-

scriptional level, as shown by real-time RT-PCR. The inhibition in RNA copies in cells co-incubated with LDL(-) and IL10 (5  $\mu\text{g/L}$ ) versus incubation with LDL(-) alone ( $n=3$ ) at 4 h of incubation is shown in Fig. 4. The inhibitory effect ranged from 50 to 80% versus LDL(-) alone and, in addition to decreasing the number of RNA copies of the inflammatory factors induced by LDL(-), IL10 also diminished the number of copies of IL10 itself, pointing to a self-regulatory role. The transcriptional inhibition of IL10 remained similar when compared between 4 and 20 h of incubation, being between 50 and 75% depending on the cytokine evaluated at 20 h.

The effect of the antibodies anti-IL10 and anti-IL10R added to LDL(-) is shown in Fig. 5. All cytokines induced by LDL(-) increased, in a dose-dependent manner, when IL10 was inhibited by the addition of anti-IL10. Nevertheless, using

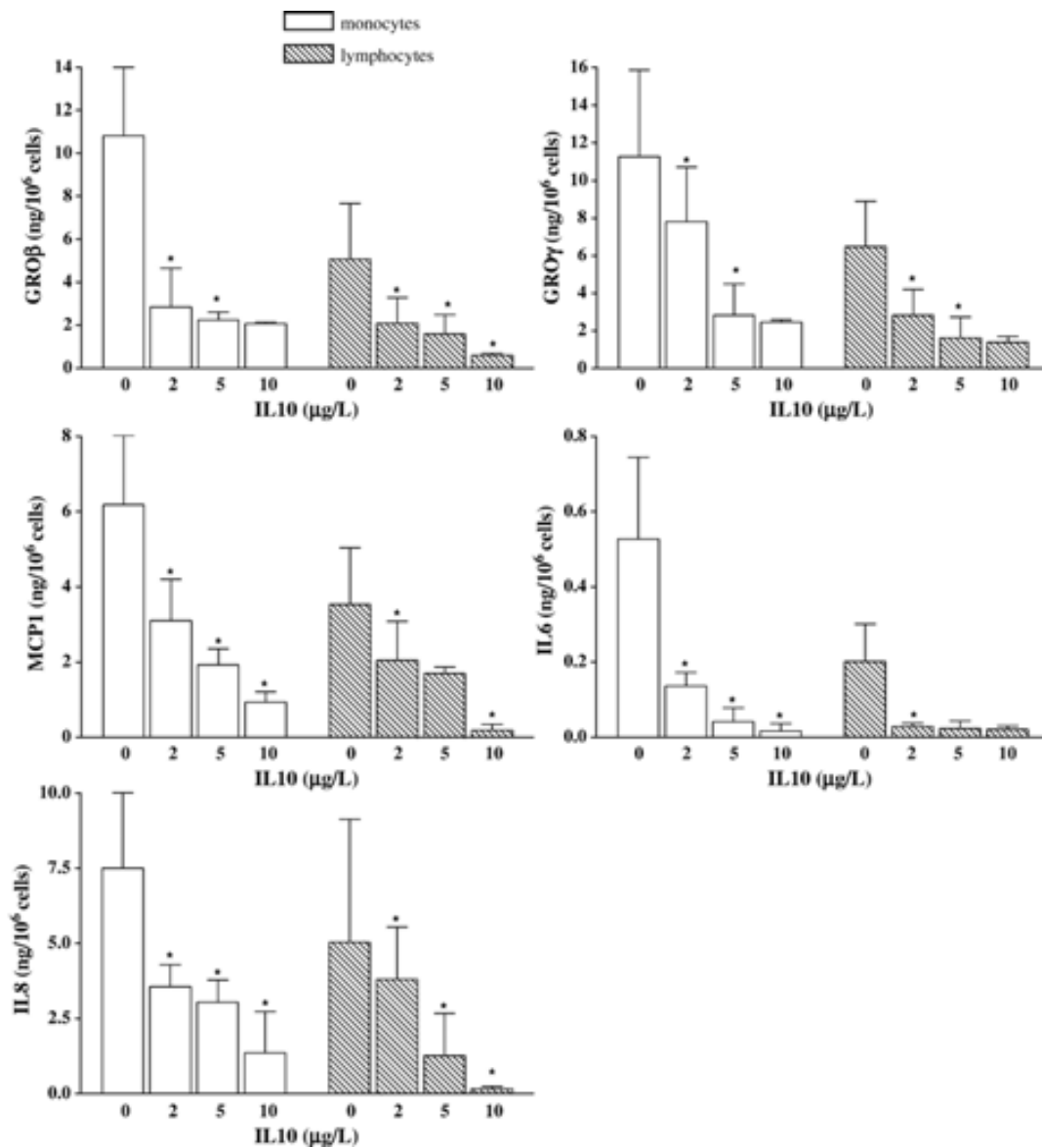


Fig. 3. Effect of exogenous IL10 on cytokine release by monocytes and lymphocytes. Cells ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated with LDL(-) (150 mg/L) alone or co-incubated with different concentrations of IL10 (2, 5 and 10  $\mu\text{g/L}$ ). After incubation for 20 h in the different conditions, supernatants were collected and frozen until quantification of MCP1, GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , IL6 and IL8 by ELISA. Data are the mean  $\pm$  SD of 6 independent experiments. \* Indicates statistical differences versus lower IL10 concentration,  $p < 0.05$ .

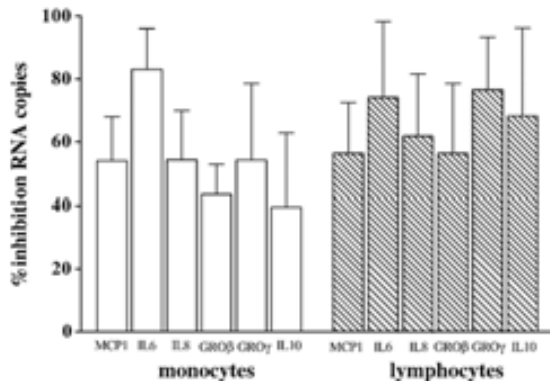


Fig. 4. Inhibition in RNA copies of cytokines by exogenous IL10 in monocytes and lymphocytes. Cells ( $3 \times 10^6$  cells) were incubated for 4 h with exogenous IL10 ( $5 \mu\text{g/L}$ ) plus LDL(-) ( $150 \text{ mg/L}$ ). Number of RNA copies was evaluated by real-time RT-PCR, as described in Materials and methods, and results are expressed as % of inhibition versus LDL(-) alone. Data are the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments.

anti-IL10R, the effect, in general, was lower, increasing cytokine release only slightly, and in some cases no significant inhibition at the concentrations of antibody used was observed. On the other hand, it was proved that the antibody anti-IL10 worked correctly since it inhibited IL10 quantity in the supernatant (70–85%), whereas the antibody anti-IL10R promoted an increase in IL10. LDL(+) produced similar results compared to LDL(-) when both antibodies were used or exogenous IL10 was added (data not shown).

#### 4. Discussion

LDL(-) is a plasma LDL subfraction whose interaction with mononuclear cells is feasible. These cells play a significant role in atherosclerosis, a disease characterized by infiltration of monocytes and lymphocytes from peripheral blood to the intima. Furthermore, lymphocytes, and particularly monocytes, synthesize several inflammatory factors, some of which are also shared with endothelial cells [13]. For all these reasons, the LDL(-) effect on leucocytes is an interesting topic that has not been previously described.

The results of the current study show that LDL(-) induced in mononuclear cells the production of several factors related to inflammatory processes. LDL(-) promoted around two-fold versus LDL(+) protein release of chemokines MCP1, IL8, GROβ and GROγ and interleukins IL6 and IL10. The role of LDL(-) was also confirmed at transcriptional level and the number of RNA copies was greater at 4 h versus 20 h, a logical response since RNA-encoding cytokines are usually unstable to ensure that cytokine synthesis is transient.

All the cytokines induced by LDL(-) action followed the same pattern in monocytes and lymphocytes; however, cytokine release by monocytes was always greater than by lymphocytes, regardless of the stimulus: LDL(+), LDL(-) or LPS. Monocytes are cells whose involvement in atherosclerosis is evident, since they develop a significant role in the early phases of atherogenesis and synthesize several inflammatory factors

[13]. In contrast, the role of lymphocytes is not so widely understood, although they also appear to be implicated in atherosclerotic lesion progression [22].

It is noteworthy that LDL(-), besides inducing cytokine release by endothelial cells, also exerts an inflammatory effect on mononuclear cells which could interact with LDL(-) in plasma circulation or when they are retained in the endothelium. The fact that molecules induced by LDL(-) in leucocytes, except IL10, are also stimulated in HUVEC [7] is biologically significant since the same stimulus can act on different cell types. In turn, cytokines released by the effect of LDL(-) in one cell type can activate these cells or others, triggering an amplified response mediated by LDL(-). Therefore, the effects promoted by LDL(-) should not be considered isolated actions but rather as physiologically interrelated in the context of an inflammatory process.

On the other hand, LDL(-) isolated from diabetic and hypercholesterolemic patients, at the same concentration as in normolipemic subjects, did not present a greater inflammatory effect in endothelial cells compared to normolipemic subjects [8,23]. For this reason, the current study was focused on normolipemic subjects. Nevertheless, it is noteworthy that the inflammatory effect promoted by LDL(-) would be greater in diabetic and hypercholesterolemic patients than in normolipemic subjects, since these patients present increased LDL(-) proportion [3–5].

Besides promoting cytokines with an inflammatory action, LDL(-) also induced in monocytes and lymphocytes the synthesis and release of IL10, a cytokine considered as anti-inflammatory. The relationship between IL10 and atherosclerosis is widely accepted, since clinical studies in humans reported increased levels of IL10 in acute coronary syndromes [24,25], atherosclerotic plaques [26], hypercholesterolemia [25,27] and diabetes [28]. The biological function of IL10 in these situations would be to counteract an excessive inflammatory response. This protective role was corroborated by experiments with mice in which animals overexpressing IL10 presented a smaller atherosclerotic lesion [14,29], whereas mice lacking IL10 presented increased atherosclerosis [30,31] and autoimmune diseases [32]. This evidence supports a physiological function of IL10 as a controller of inflammatory response and, in fact, IL10 has even been used with therapeutic aims in autoimmune diseases such as psoriasis [33].

Concerning the anti-inflammatory properties described for IL10 on cells, IL10 activates Th2 anti-inflammatory phenotype [34], promotes cholesterol efflux [35], and inhibits monocyte–endothelium interaction [14], apoptosis [36,37], and phagocytosis [38]. Furthermore, IL10 plays an important role in decreasing the production of inflammatory cytokines in several stimulated cell types [17], and even inhibits the autocrine effect of MCP1 on monocytes [39] and of IL8 on lymphocytes [40]. In this respect, the aim was to evaluate the possible role of IL10 released by LDL(-) on the other cytokines induced in mononuclear cells. Our results showed that IL10 decreased inflammatory cytokine release by LDL(-) and this effect was exerted at transcriptional level, even promoting inhibition of IL10 itself. In this regard, it has been



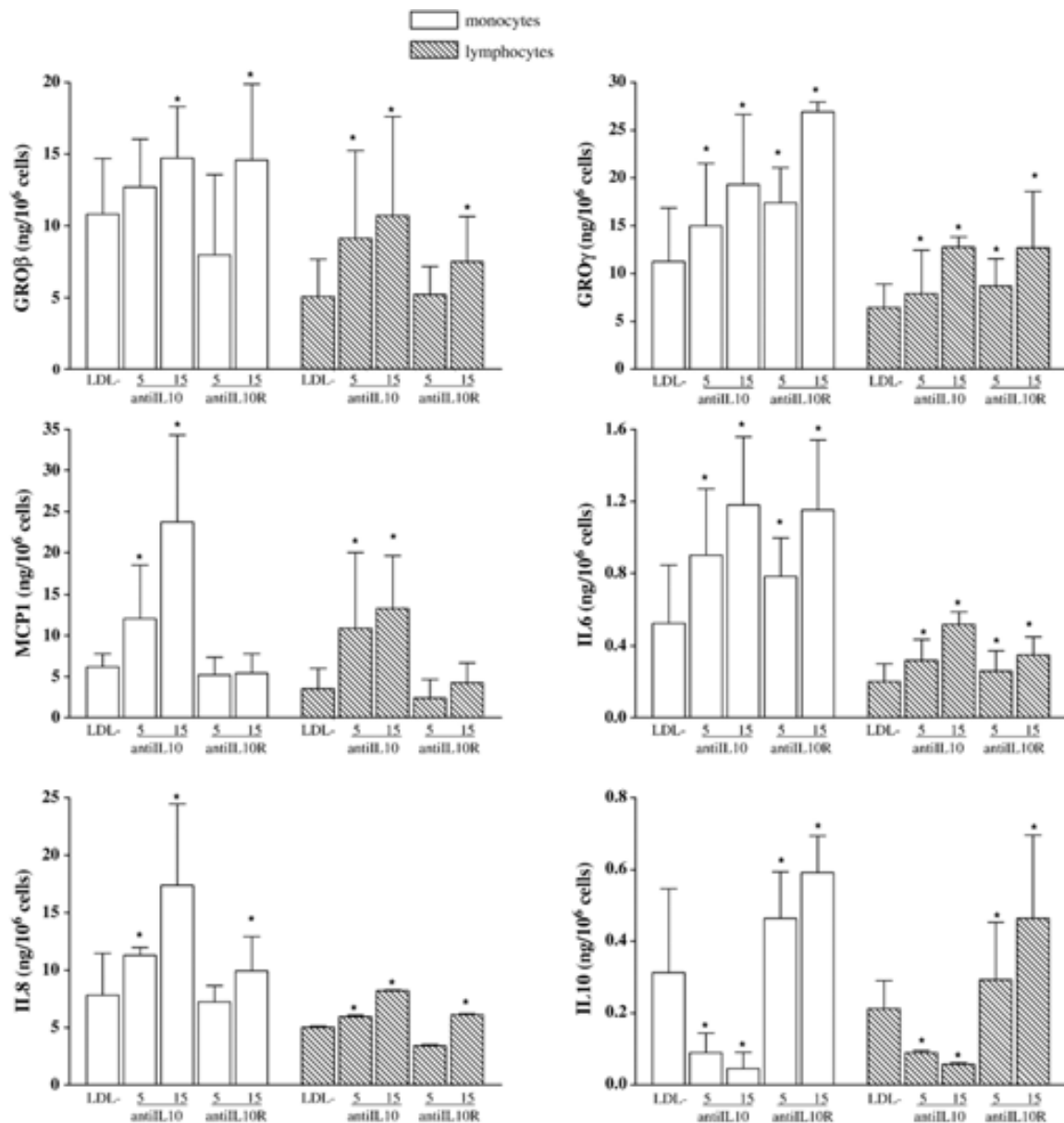


Fig. 5. Effect of antibodies anti-IL10 and anti-subunit  $\alpha$  of IL10R on cytokine release induced by LDL(-) on monocytes and lymphocytes. Anti-IL10 and anti-IL10R (5, 15 mg/L) were added to cells ( $1 \times 10^6$  cells) simultaneously with LDL(-) (150 mg/L). After incubation for 20 h, cytokine release was evaluated in the supernatant by ELISA. Data are the mean  $\pm$  SD of 6 independent experiments. \* Indicates statistical differences versus LDL(-) alone,  $p < 0.05$ .

previously reported that IL10 can induce degradation of RNA coding for specific genes [41] and that IL10 expression is self-regulated [17,42].

IL10 inhibition of inflammatory cytokines points to a modulatory role, which concurs with the theory that, against an external aggression, the immune system activates both inflammatory and anti-inflammatory pathways to counteract collateral damage [43]. In our case, LDL(-) would be the external stimulus that activates not only inflammatory but also anti-inflammatory responses. In this way, anti-inflammatory IL10 would counteract inflammatory cytokine expression induced by LDL(-). On the other hand, the specific pathway activated by IL10 to promote cytokine inhibition is not clear, since knowledge of IL10 intracellular signal transduction

pathways is limited and several possible mechanisms, such as ERK, p38MAPK, STAT or NF $\kappa$ B, have been suggested [44–48].

In experiments using the antibody anti-IL10R, a lower effect than anti-IL10 on raising inflammatory cytokines was observed. This suggests that IL10R could play some role in the modulatory action of IL10; however, the effect varied depending on the cytokine evaluated. In this context, different pathways could be responsible for differential cytokine expression, and there could be alternative entries, apart from IL10R, such as binding to another integral membrane protein, as suggested previously [38]. On the other hand, the addition of anti-IL10R could inhibit endogen IL10 entry into the cell, since IL10 levels increased in the supernatant. In this respect, it was suggested that IL10 had an autocrine regulation by a negative

feed-back effect which was inhibited by anti-IL10R [49]. These results, together with IL10 time-course experiments and real-time RT-PCR data adding exogenous IL10 to LDL(-), appear to suggest a self-regulatory role of IL10. This effect could have a biological explanation, with IL10 self-regulation being important to achieve an efficient immune response, since longer IL10 inhibition could cause inflammatory problems [43].

In summary, the fact that LDL(-) promotes the release of inflammatory cytokines in leucocytes, besides inducing a response in endothelium, is significant since it supports its inflammatory role. However, LDL(-) also induces IL10 expression which decreases the release of inflammatory cytokines, thereby developing an important control system. If LDL(-) did not induce IL10, the inflammatory response would be still greater and maybe excessive; hence, in this respect, IL10 could develop a pivotal immunoregulatory function.

### Acknowledgments

This work was supported by research grants FIS CP04/0110 and FIS PI03/0885 from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) and 2004 Basic Research from the Spanish Society of Atherosclerosis (SEA). Sonia Benítez is the recipient of a post-doctoral FIS CP04/110 contract and Cristina Bancells is a recipient of a pre-doctoral fellowship FPU from the Ministry of Education and Science (MEC). The authors are grateful to the Hematology Department of Hospital de Sant Pau for flow-cytometry analysis and to Christine O'Hara for editorial assistance.

### References

- [1] M.O. Pentikainen, K. Oorni, M. Ala-Korpela, P.T. Kovanen, Modified LDL — Trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima, *J. Intern. Med.* 247 (2000) 359–370.
- [2] J.L. Sanchez-Quesada, S. Benítez, J. Ordonez-Llanos, Electronegative low-density lipoprotein, *Curr. Opin. Lipidol.* 15 (2004) 329–335.
- [3] J.L. Sanchez-Quesada, A. Perez, A. Caixas, J. Ordonez-Llanos, G. Carreras, A. Payes, F. Gonzalez-Sastre, A. de Leiva, Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control, *Diabetologia* 39 (1996) 1469–1476.
- [4] J.L. Sanchez-Quesada, C. Ota-Entraigas, M. Franco, O. Jorba, F. Gonzalez-Sastre, F. Blanco-Vaca, J. Ordonez-Llanos, Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia, *Am. J. Cardiol.* 84 (1999) 655–659.
- [5] J.L. Sanchez-Quesada, A. Perez, A. Caixas, M. Rigla, A. Payes, S. Benítez, J. Ordonez-Llanos, Effect of glycaemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 3243–3249.
- [6] C. De Castellarnau, J.L. Sanchez-Quesada, S. Benítez, R. Rosa, L. Caveda, L. Vila, J. Ordonez-Llanos, Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 2281–2287.
- [7] S. Benítez, M. Camacho, C. Bancells, L. Vila, J.L. Sanchez-Quesada, J. Ordonez-Llanos, Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein membrane assay, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 1014–1021.
- [8] J.L. Sanchez-Quesada, M. Camacho, R. Anton, S. Benítez, L. Vila, J. Ordonez-Llanos, Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells, *Atherosclerosis* 166 (2003) 261–270.
- [9] C. Castellarnau, C. Bancells, S. Benítez, J. Ordonez-Llanos, J.L. Sanchez-Quesada, Atherogenic and inflammatory profile of human arterial endothelial cells (HUAEC) in response to LDL fractions, *Clim. Chem. Acta* 376 (2007) 233–236.
- [10] K. Demuth, I. Myara, B. Chappey, B. Védie, M.A. Pech-Amsellem, M.E. Haberland, N. Moatti, A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (1996) 773–783.
- [11] H.N. Hodis, D.M. Krams, P. Avogaro, G. Bittolo-Bon, G. Cazzolato, J. Hwang, H. Peterson, A. Sevanian, Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-), *J. Lipid. Res.* 35 (1994) 669–677.
- [12] C.H. Chen, T. Jiang, J.H. Yang, W. Jiang, J. Lu, G.K. Marathe, H.J. Pownall, C.M. Ballantyne, T.M. McIntyre, P.D. Henry, C.Y. Yang, Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription, *Circulation* 107 (2003) 2102–2108.
- [13] B. Osterud, E. Bjorklid, Role of monocytes in atherogenesis, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 1069–1112.
- [14] L.J. Pinderski Oslund, C.C. Hedrick, T. Olvera, A. Hagenbaugh, M. Territo, J.A. Berliner, A.I. Fyfe, Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 2847–2853.
- [15] Z. Mallat, S. Besnard, M. Duriez, V. Deleuze, F. Emmanuel, M.F. Bureau, F. Soubrier, B. Esposito, H. Duez, C. Fievet, B. Staels, N. Duverger, D. Scherman, A. Tedgui, Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis, *Circ. Res.* 85 (1999) e17–e24.
- [16] K.W. Moore, R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, A. O'Garra, Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 683–765.
- [17] R. de Waal Malefyt, J. Abrams, B. Bennett, C.G. Figdor, J.E. de Vries, Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes, *J. Exp. Med.* 174 (1991) 1209–1220.
- [18] R. de Waal Malefyt, H. Yssel, J.E. de Vries, Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation, *J. Immunol.* 150 (1993) 4754–4765.
- [19] D.F. Fiorentino, A. Zlotnik, T.R. Mosmann, M. Howard, A. O'Garra, IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages, *J. Immunol.* 147 (1991) 3815–3822.
- [20] P. Wang, P. Wu, J.C. Anthes, M.I. Siegel, R.W. Egan, M.M. Billah, Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils, *Blood* 83 (1994) 2678–2683.
- [21] A. Boyum, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g, *Scand. J. Clin. Lab. Invest., Suppl.* 97 (1968) 77–89.
- [22] P.A. Vanderlaan, C.A. Reardon, Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis, *J. Lipid. Res.* 46 (2005) 829–838.
- [23] S. Benítez, A. Perez, J.L. Sanchez-Quesada, A.M. Wagner, M. Rigla, R. Arcelus, O. Jorba, J. Ordonez-Llanos, Electronegative low-density lipoprotein subfraction from type 2 diabetic subjects is proatherogenic and unrelated to glycaemic control, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 23 (2007) 26–34.
- [24] C. Heeschen, S. Dimmeler, C.W. Hamm, S. Fichtlscherer, E. Boersma, M.L. Simoons-Sch, A.M. Zeiger, Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes, *Circulation* 107 (2003) 2109–2114.
- [25] K. Mizia-Steć, Z. Gasior, B. Zahorska-Markiewicz, J. Janowska, A. Szulc, E. Jastrzebska-Maj, I. Kobielski-Gembala, Serum tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-2 and interleukin-10 activation in stable angina and acute coronary syndromes, *Coron. Artery Dis.* 14 (2003) 431–438.

- [26] Z. Mallat, C. Heymes, J. Ohan, E. Faggin, G. Leseche, A. Tedgui, Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 611–616.
- [27] K. Mizia-Steć, B. Zahorska-Markiewicz, T. Mandecki, J. Janowska, A. Szulc, E. Jastrzebska-Maj, Z. Gasior, Hyperlipidaemias and serum cytokines in patients with coronary artery disease, *Acta Cardiol.* 58 (2003) 9–15.
- [28] J. Mysliwska, K. Zorena, E. Semetkowska-Jurkiewicz, D. Rachon, H. Suchanek, A. Mysliwski, High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients, *Eur. Cytokine Netw.* 16 (2005) 117–122.
- [29] Y. Liu, D. Li, J. Chen, J. Xie, S. Bandyopadhyay, D. Zhang, A.R. Nemarkommula, H. Liu, J.L. Mehta, P.L. Hermonat, Inhibition of atherosclerosis in LDLR knockout mice by systemic delivery of adeno-associated virus type 2-hIL-10, *Atherosclerosis* (2005).
- [30] M.N. Ajuebor, A.M. Das, L. Virag, C. Szabo, M. Perretti, Regulation of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression and function by endogenous interleukin-10 in a model of acute inflammation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 (1999) 279–282.
- [31] S. Potteaux, B. Esposito, O. van Oostrom, V. Brun, P. Ardouin, H. Groux, A. Tedgui, Z. Mallat, Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 1474–1478.
- [32] R. Kuhn, J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, W. Muller, Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis, *Cell* 75 (1993) 263–274.
- [33] K. Asadullah, W. Sterry, H.D. Volk, Interleukin-10 therapy—review of a new approach, *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 241–269.
- [34] K. Uyemura, L.L. Demer, S.C. Castle, D. Jullien, J.A. Berliner, M.K. Gately, R.R. Warriar, N. Pham, A.M. Fogelman, R.L. Modlin, Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 2130–2138.
- [35] T. Rubic, R.L. Lorenz, Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10, *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 527–535.
- [36] T. Arai, K. Hiromatsu, H. Nishimura, Y. Kimura, N. Kobayashi, H. Ishida, Y. Nimura, Y. Yoshikai, Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during *Salmonella* infection, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213 (1995) 600–607.
- [37] S.B. Cohen, J.B. Crawley, M.C. Kahan, M. Feldmann, B.M. Foxwell, Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2, *Immunology* 92 (1997) 1–5.
- [38] F. Capsoni, F. Minonzio, C. Mariani, A.M. Ongari, P. Bonara, G. Fiorelli, Development of phagocytic function of cultured human monocytes is regulated by cell surface IL-10, *Cell. Immunol.* 189 (1998) 51–59.
- [39] C. Vestergaard, B. Gesser, N. Lohse, S.L. Jensen, S. Sindet-Pedersen, K. Thestrup-Pedersen, K. Matsushima, C.G. Larsen, Monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1) has an autoinductive effect in monocytes, a process regulated by IL-10, *J. Dermatol. Sci.* 15 (1997) 14–22.
- [40] B. Gesser, B. Deleuran, M. Lund, C. Vestergaard, N. Lohse, M. Deleuran, S.L. Jensen, S.S. Pedersen, K. Thestrup-Pedersen, C.G. Larsen, Interleukin-8 induces its own production in CD4+ T lymphocytes: a process regulated by interleukin 10, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 (1995) 660–669.
- [41] P. Wang, P. Wu, M.I. Siegel, R.W. Egan, M.M. Billah, IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells, *J. Immunol.* 153 (1994) 811–816.
- [42] P.A. Knolle, A. Uhrig, U. Protzer, M. Trippler, R. Duchmann, K.H. Meyer zum Buschenfelde, G. Gerken, Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells, *Hepatology* 27 (1998) 93–99.
- [43] A. O'Garra, P.L. Vieira, P. Vieira, A.E. Goldfeld, IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 1372–1378.
- [44] J. Suttles, D.M. Milhorn, R.W. Miller, J.C. Poe, L.M. Wahl, R.D. Stout, CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 5835–5842.
- [45] K. Sato, H. Nagayama, K. Tadokoro, T. Juji, T.A. Takahashi, Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells, *J. Immunol.* 162 (1999) 3865–3872.
- [46] G.A. Ricchetti, L.M. Williams, B.M. Foxwell, Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide, *J. Leukoc. Biol.* 76 (2004) 719–726.
- [47] F. Driessler, K. Venstrom, R. Sabat, K. Asadullah, A.J. Schottelius, Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50, *Clin. Exp. Immunol.* 135 (2004) 64–73.
- [48] A.A. Rahimi, K. Gee, S. Mishra, W. Lim, A. Kumar, STAT-1 mediates the stimulatory effect of IL-10 on CD14 expression in human monocytic cells, *J. Immunol.* 174 (2005) 7823–7832.
- [49] G.H. Giambartolomei, V.A. Dennis, B.L. Lasater, P.K. Murthy, M.T. Philipp, Autocrine and exocrine regulation of interleukin-10 production in THP-1 cells stimulated with *Borrelia burgdorferi* lipoproteins, *Infect. Immun.* 70 (2002) 1881–1888.

## Novel Phospholipolytic Activities Associated with Electronegative Low-Density Lipoprotein Are Involved in Increased Self-Aggregation<sup>†</sup>

Cristina Bancells,<sup>\*,§</sup> Sònia Benítez,<sup>‡</sup> Sandra Villegas,<sup>§</sup> Oscar Jorba,<sup>‡</sup> Jordi Ordóñez-Llanos,<sup>‡,§</sup> and José Luis Sánchez-Quesada<sup>\*,‡</sup>

*Servei de Bioquímica, Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, 08025 Barcelona, Spain*

*Received March 28, 2008; Revised Manuscript Received May 20, 2008*

**ABSTRACT:** Electronegative low-density lipoprotein (LDL(−)) is a minor LDL subfraction present in plasma with increased platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity. This activity could be involved in the proinflammatory effects of LDL(−). Our aim was to study the presence of additional phospholipolytic activities in LDL(−). Total LDL was fractionated into electropositive (LDL(+)) and LDL(−) by anion-exchange chromatography, and phospholipolytic activities were measured by fluorometric methods. Phospholipolytic activity was absent in LDL(+) whereas LDL(−) presented activity against lysophosphatidylcholine (LPC, 82.4 ± 34.9 milliunits/mg of apoB), sphingomyelin (SM, 53.3 ± 22.5 milliunits/mg of apoB), and phosphatidylcholine (PC, 25.7 ± 4.3 milliunits/mg of apoB). LDL(−), but not LDL(+), presented spontaneous self-aggregation at 37 °C in parallel to phospholipid degradation. This was observed in the absence of lipid peroxidation and suggests the involvement of phospholipolytic activity in self-aggregation of LDL(−). Phospholipolytic activity was not due to PAF-AH, apoE, or apoC-III and was not increased in LDL(+) modified by Cu<sup>2+</sup> oxidation, acetylation, or secretory phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). However, LDL(−) efficiently degraded phospholipids of lipoproteins enriched in LPC, such as oxidized LDL or PLA<sub>2</sub>-LDL, but not native or acetylated LDL. This finding supports that LPC is the best substrate for LDL(−)-associated phospholipolytic activity. These results reveal novel properties of LDL(−) that could play a significant role in its atherogenic properties.

Growing evidence indicates that qualitative modification of lipoproteins is a key step in atherogenesis. Oxidation, glycosylation, desialylation, or enzymatic modification of LDL<sup>1</sup> renders modified lipoparticles with atherogenic, inflammatory, and immunogenic properties (1). Most of these studies with modified lipoproteins were conducted using “in vitro” modification procedures. However, several groups have studied the properties of modified lipoproteins isolated

from plasma. One of these lipoproteins is electronegative LDL (LDL(−)), a minor subfraction of LDL that presents inflammatory, apoptotic, and cytotoxic properties “in vitro” (2–4) and whose proportion is increased in subjects with high cardiovascular risk (5, 6). The inflammatory action of LDL(−) includes the release by endothelial cells of interleukins (IL-6), chemokines (IL-8, MCP-1, GROs, ENA78, GPC2), growth factors (GM-CSF, PDGF), and vascular adhesion molecules (VCAM) (7–10). A specific difference between LDL(−) and native LDL is the increased content in the former of proteins other than apolipoprotein (apo) B-100, such as apoC-III, apoE, and platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) (11, 12). The role of these proteins is unclear; however, it has been suggested that PAF-AH could play a role in the inflammatory properties of LDL(−). LDL(−) has increased content of the degradation products of PAF-AH activity, lysophosphatidylcholine (LPC), and nonesterified fatty acids (NEFA), with both molecules being known to promote the expression of inflammatory molecules in cells from the artery wall (13). On the other hand, LDL(−) presents a high susceptibility to aggregation (7), a property that could favor its subendothelial retention. On the basis of these findings, our group studied the presence in LDL(−) of additional enzymatic activities related to lipid metabolism, inflammation, and lipoprotein aggregation, specifically focused on sphingomyelinase (SMase) and other phospholipolytic activities. SMases are a group of phospholipases that catalyze the hydrolysis of sphingomyelin into

<sup>†</sup> This work was supported by grants from the Health Ministry, FIS PI030885, PI060500, PI070148, and RD060015. S.B. and J.L.S.-Q. are recipients of personal grants CP040110 and CP060220 from FIS. C.B. is recipient of a personal grant from the Education and Science Ministry, AP2004-1468.

\* Corresponding author. Phone: 34-932919261. Fax: 34-932919196. E-mail: jsanchezq@santpau.es.

<sup>‡</sup> Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

<sup>§</sup> Universitat Autònoma de Barcelona.

<sup>1</sup> Abbreviations: apo, apoprotein; BHT, butylated hydroxytoluene; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ENA, epithelial neutrophil activator; GRO, growth-related oncogene; GGE, nondenaturing gradient gel electrophoresis; GM-CSF, granulocyte/monocyte-colony stimulating factor; GPC, granulocyte chemotactic protein; HPODE, hydroperoxide; IL, interleukin; LDL(+), electropositive low-density lipoprotein; LDL(−), electronegative low-density lipoprotein; LPC, lysophosphatidylcholine; lysoPLC, lysophospholipase C; MCP, monocyte chemotactic protein; NEFA, nonesterified fatty acid; PAF-AH, platelet-activating factor-acetylhydrolase; PBS, phosphate-buffered saline; PC, phosphatidylcholine; PDGF, platelet-derived growth factor; sPLA<sub>2</sub>, secretory phospholipase A<sub>2</sub>; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SM, sphingomyelin; SMase, sphingomyelinase; VCAM, vascular cell adhesion molecule.

ceramide and phosphorylcholine. The role of ceramide as a lipid second messenger in apoptosis, cell differentiation, and cell proliferation emphasizes the role of SMases in atherogenesis (14). Holopainen et al. previously reported that LDL present SMase activity and suggested that this activity could be a link between atherosclerosis and apoptosis (15). On the other hand, a key role in lipoprotein retention in the artery wall has been suggested for secretory SMase through aggregation and fusion of LDL (16, 17). SMase activity could be involved in several distinctive properties of LDL(-), including apoptosis and susceptibility to aggregation. Our results suggest that LDL(-) presents one or several enzymatic activities generating phosphorylcholine (phospholipase C activity) that degrade with high-affinity LPC and sphingomyelin (SM) and only poorly phosphatidylcholine (PC). The involvement of these findings in the atherogenic characteristics of LDL(-), such as increased susceptibility to aggregation and inflammatory properties, is discussed.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** All reagents were purchased from Sigma (Madrid, Spain) unless otherwise stated.

**LDL Subfraction Isolation.** Plasma samples were obtained from healthy normolipemic subjects from the hospital staff, as described (7). The Ethics Committee of the hospital approved the study, and volunteers gave their informed consent. Total LDL ( $1.019 < d < 1.050$  g/mL) was isolated by flotation sequential ultracentrifugation at 4 °C and in the presence of 1 mM EDTA. LDL was then subfractionated into nonmodified LDL (LDL(+)) and LDL(-) by anion-exchange chromatography, as described (7). Composition of LDL subfractions was assessed as previously described (7, 11, 13). Lipoperoxide content in LDL subfractions was determined by the leucomethylene blue method (18), and 8-isoprostane was quantified by commercial enzyme immunoassay (Cayman Chemicals).

**LDL Modification.** LDL was oxidized by incubation of PBS-dialyzed LDL(+) (at 0.5 g/L of apoB) with  $\text{CuSO}_4$  (2.5  $\mu\text{mol/L}$ ) at 37 °C for increasing time periods. On the other hand, LDL(+) was lipolyzed with secretory phospholipase  $A_2$  (sPLA<sub>2</sub>) (20 ng/mL), as described (13). Acetylated LDL was obtained by modifying Lys residues of apoB by sequential addition of acetic anhydride (9). LDL(+) was enriched with apoE or apoC-III by incubating LDL(+) (at 0.5 g/L) with apoE (15 and 60 mg/L) or apoC-III (5 and 20 mg/L) for 2 h at 37 °C, and LDL(+) was then reisolated by ultracentrifugation at 40000 rpm for 6 h at 4 °C. Finally, LDL(+) (0.5 g/L) was aged by incubation at 4 °C with PBS containing 2  $\mu\text{M}$  BHT up to 40 days.

**Characterization of Modified LDLs.** Major lipids (free and esterified cholesterol, triglyceride, total phospholipids, and NEFA) and apoproteins (apoB, apoE, apoC-III) were measured by commercial methods in a Hitachi 911 autoanalyzer (7). Phospholipid subclasses, including PC, SM, and LPC, were measured by normal-phase HPLC (Gold System, Pump module 126, detector 168, Beckman Coulter, Fullerton, CA) using a Luna 5  $\mu\text{m}$  silica 250  $\times$  4.6 mm column (Phenomenex, Torrance, CA) with photodiode array detection, as described (13, 20). Main peaks of phospholipids were detected at 205 nm, and conjugated dienes in the peak corresponding to PC (indicating oxidation of PC) were

detected at 234 nm. The aggregation level of LDL was determined by measuring absorbance at 450 nm and by quantifying the proportion of precipitable apoB at low-speed centrifugation (15000g, 10 min) (16, 21). The content of apoE or apoC-III in apo-enriched LDL(+) was measured by commercial immunoturbidimetric methods (Kamiya, Thousand Oaks, CA). Electrophoretic characterization included agarose electrophoresis (Midigel, Biomidi, Toulouse, France), denaturing acrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of SDS (SDS-PAGE) (4–20% gradient gels; Bio-Rad, Madrid, Spain) (22), and nondenaturing acrylamide gradient gel electrophoresis (GEE) (23).

**Phospholipolytic Activity Assays.** Phospholipolytic activities in LDLs were measured by a commercial fluorometric method (Amplex Red; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). The method is an enzyme-coupled assay based on the following sequence: (1) phospholipid (substrate) + PLC or SMase (assay sample)  $\rightarrow$  diacylglycerol or ceramide + phosphorylcholine; (2) phosphorylcholine + alkaline phosphatase  $\rightarrow$   $\text{P}_i$  + choline; (3) choline + choline oxidase  $\rightarrow$  betaine +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; (4)  $\text{H}_2\text{O}_2$  + peroxidase + Amplex Red  $\rightarrow$  resorufin (highly fluorescent). This method detects phospholipase C (PLC) or sphingomyelinase (SMase) activities and, when alkaline phosphatase is not included, also detects phospholipase D (PLD) activity. The substrate was alternatively PC, LPC, or SM. LDLs (100  $\mu\text{L}$  at 0.3 mg/mL), apoE (100  $\mu\text{L}$  at 15 and 60 mg/L), or apoC-III (100  $\mu\text{L}$  at 5 and 20 mg/L) were mixed with 10  $\mu\text{L}$  of substrate (final concentration 0.25 mmol/L) and with the appropriate amount of Amplex Red and enzymes (final volume 200  $\mu\text{L}$ ), according to the manufacturer. *Staphylococcus* sp. SMase was used as a standard curve. Fluorescence production ( $\lambda$  excitation 530 nm,  $\lambda$  emission 590 nm) was monitored for 3 h, and results (milliunits of SMase equivalents/mg of apoB) were calculated from the maximum curve slope.

Several phospholipase inhibitors were tested to investigate whether phospholipolytic activity was due to the presence of a previously characterized enzyme attached to LDL(-); specifically, manumycin A (neutral SMase inhibitor), chlorpromazine (acidic SMase inhibitor, Calbiochem/Merck, Darmstadt, Germany), methyl- $\gamma$ -linoleyl fluorophosphonate and tricyclodecanoyl dithiocarbonate (D-609) (PC-dependent PLC inhibitors), and Pefabloc (inhibitor of sPLA<sub>2</sub> and PAF-AH; Roche, Basel, Switzerland) were incubated with LDL subfractions or *Staphylococcus* sp. SMase (50 milliunits/mL) for 30 min at 37 °C in the presence of 2  $\mu\text{mol/L}$  butylated hydroxytoluene (BHT) before SMase quantification.

The Amplex Red method is not suitable for evaluating the effect of pH and  $\text{Mg}^{2+}$ , since the mixture of enzymes requires neutral pH and  $\text{Mg}^{2+}$ . Hence, the effect of pH and  $\text{Mg}^{2+}$  was determined using a fluorescently labeled substrate, according to Holopainen et al. (15). SMase activity in LDL subfractions (0.3 mg/mL) was evaluated by incubation with Bodipy-FL-C12-SM at 0.025 mmol/L, (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) as substrate for 3 h at 37 °C in acid (50 mmol/L sodium acetate, pH 5.0) and neutral (10 mmol/L Tris, pH 7.4) buffer and in the presence or absence of 10 mM  $\text{MgCl}_2$  and separation by thin-layer chromatography, as described (15).

sPLA<sub>2</sub> activity was measured by a commercial colorimetric method using 1,2-dithiodiheptanoylphosphatidylcholine as substrate (Cayman Europe, Tallinn, Estonia), according to

Table 1: Composition of LDL Subfractions ( $n = 10$ ) and Oxidized LDL ( $n = 4$ )

	LDL(+)	LDL(-)	oxidized LDL
total cholesterol (%)	37.8 ± 0.5	36.5 ± 1.9	ND <sup>a</sup>
free cholesterol (%)	10.1 ± 0.2	10.7 ± 0.3	ND
triglyceride (%)	5.7 ± 0.1	9.5 ± 2.4 <sup>b</sup>	ND
phospholipid (%)	32.8 ± 0.3	32.2 ± 0.6	ND
NEFA (mol/mol of apoB)	16.3 ± 3.2	35.3 ± 2.5 <sup>b</sup>	ND
apoB (%)	23.7 ± 0.3	21.8 ± 1.8	ND
lipoperoxides (nmol/mg of apoB)	5.10 ± 3.86	6.10 ± 4.47	318 ± 283 <sup>b</sup>
8-isoprostane (pg/mg of apoB)	289 ± 264	388 ± 314	9185 ± 5476 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> ND, not determined. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs LDL(+).

the manufacturer's instructions. PAF-AH activity was measured by a commercial colorimetric method using 2-thio-PAF as substrate (Cayman Europe, Tallinn, Estonia), as described (12).

**Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH) Isolation.** PAF-AH was purified from total LDL according to a shortened protocol based on that of Tew et al. (24), using sequentially Blue Sepharose and MonoQ HR5/5 columns (AmershamPharmacia, Uppsala, Sweden). PAF-AH active fractions were pooled, concentrated, and stored at 4 °C. SDS-PAGE with silver staining (Silver Stain Plus; Bio-Rad, Spain) and Western blot (12) confirmed the purity of isolated PAF-AH.

**ApoB Secondary Structure Determination.** Far-UV circular dichroism spectra were performed with LDL samples in PBS at 0.05 g/L in a JASCO J-715 spectropolarimeter, as previously described (25). Twenty spectra were averaged for each measurement, and the buffer blank was subtracted. Spectra were deconvolved by the analysis program K2D from the DICROWEB server (26, 27).

**Statistical Analysis.** Results are expressed as mean ± SD. The SPSS 11.5.2 statistical package was used. Intergroup differences were tested with Wilcoxon's  $t$  test. A  $p$  value <0.05 was considered significant.

## RESULTS

**Phospholipolytic Activities in LDL(-).** Composition of LDL(+) and LDL(-) is shown in Table 1. Results are similar to those previously reported (7, 11), with increased triglyceride and NEFA content in LDL(-). No evidence of increased oxidative modification was observed in LDL(-) compared to LDL(+). A high phospholipolytic activity on choline-containing phospholipids was shown by LDL(-). The best substrate was LPC (lysoPLC activity) followed by SM (SMase activity) and PC (PLC activity) (Table 2, Figure 1A). LDL(+) lacked the ability to degrade LPC, SM, or PC. SMase activity in LDL(-) was confirmed by an alternative method using Bodipy-SM as substrate and separation by thin-layer chromatography (Figure 1B). These differences between LDL(+) and LDL(-) were observed both in acid and in neutral conditions (Figure 1B). SMase activity was Mg<sup>2+</sup>-independent (Figure 1B). LDL(-)-associated lipolytic activities were of phospholipase C and/or SMase type since phosphorylcholine, but not choline, was generated by LDL(-). This was demonstrated because when alkaline phosphatase (which hydrolyzes phosphorylcholine) was not

included in the reaction mixture, no fluorescence was detected (Table 2). This observation indicated that phospholipase D activity was not present in LDL(-). sPLA<sub>2</sub> activity was also absent in LDL(-) in contrast to high PAF-AH activity (Table 2), in agreement with previous observations (12).

**Phospholipolytic Activities in Several Modified LDLs.** LDL(+) modified by oxidation, acetylation, or sPLA<sub>2</sub>-induced lipolysis showed no increased phospholipolytic activity (Table 2). The chemical characteristics of these modified LDLs are shown in Table 3. Each modification induced a typical increase in electrophoretic mobility LDL and different changes in composition. This included increased LPC and decreased PC in PLA<sub>2</sub>-modified LDL, decreased SM and PC, and increased dienes and LPC in oxidized LDL and no changes in acetylated LDL.

**Effect of Phospholipase Inhibitors.** The effect of different phospholipase inhibitors on LDL(-)-associated phospholipolytic activities, using SM or LPC as substrates, is shown in Table 4. None of the inhibitors were able to completely inhibit phospholipolytic activities at the concentrations used, although chlorpromazine and methyl- $\gamma$ -linoleyl fluorophosphonate had mild effects. Chlorpromazine was the most effective inhibitor of phospholipolytic activities of LDL(-) (up to 39% at 400  $\mu$ M) whereas methyl- $\gamma$ -linoleyl fluorophosphonate showed a lower inhibitory capacity (16% at 400  $\mu$ M). In contrast, manumycin A, D-609, and Pefabloc had no significant effect on LDL(-)-associated phospholipolytic activity. The behavior of all inhibitors was similar when LPC or SM was used as substrate, which suggests that lysoPLC and SMase activities of LDL(-) are caused by the same enzymatic activity. *Staphylococcus* sp. SMase was partially inhibited at the concentrations used by chlorpromazine, manumycin, and Pefabloc. PAF-AH activity was efficiently blocked (almost 100%) by Pefabloc and methyl- $\gamma$ -linoleyl fluorophosphonate (Table 4).

**Self-Degradation of LDL(-) Phospholipids and Self-Aggregation.** Interestingly, LDL(-) not only degraded exogenous phospholipids added to the reaction mixture but also degraded its own phospholipids. When phospholipolytic activity of LDL subfractions was measured without exogenous substrate, a higher increment in fluorescence was observed in LDL(-) compared to LDL(+) ( $19.0 \pm 3.6$  versus  $0.7 \pm 0.3$  milliunits of SMase equivalents/mg of apoB, respectively,  $n = 4$ ). This value was only slightly lower than that observed when PC was used as substrate ( $22.8 \pm 5.6$  milliunits of SMase equivalents/mg of apoB; see Table 2), suggesting that PC was a poor substrate for phospholipolytic activity of LDL(-). To confirm the effect of LDL(-) on its own phospholipids, LDL(+) and LDL(-) were incubated for 24 h at 37 °C in the presence of 1 mmol/L EDTA and 2  $\mu$ mol/L BHT to avoid oxidation. In contrast to LDL(+), whose phospholipid content was unchanged, LDL(-) decreased its PC and SM content to approximately 85% of the original content (Figure 2A). This decrease resulted in increased aggregation of LDL(-) after 24 h of incubation as indicated by the increase in absorbance at 450 nm, decrease in apoB content after high-speed centrifugation, and presence of higher sized bands in GGE (Figure 2B,C). In the same experiment, PBS-dialyzed LDL(+) was oxidized with 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>. The degradation of phospholipids in LDL(-) was not due to oxidation since absorbance at 234

Table 2: Phospholipolytic Activities of LDL Subfractions and Modified LDLs<sup>a</sup>

	lysoPLC (n = 6)	SMase (n = 6)	PLC (n = 6)	PLD (n = 2)	sPLA <sub>2</sub> (n = 2)	PAF-AH (n = 6)
LDL(+)	1.2 ± 0.5	0.9 ± 0.7	1.4 ± 0.6	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.4
LDL(-)	85.4 ± 33.7 <sup>b</sup>	50.3 ± 19.1 <sup>b</sup>	22.8 ± 5.6 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.2	0.2 ± 0.3	11.9 ± 4.9 <sup>b</sup>
oxidized LDL (n = 4)	2.2 ± 0.8	2.1 ± 0.7	2.2 ± 0.9	ND <sup>c</sup>	ND	ND
acetylated LDL (n = 2)	1.4 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.1	ND	ND	ND
sPLA <sub>2</sub> -LDL (n = 4)	1.2 ± 1.0	1.0 ± 1.1	1.1 ± 0.5	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Results (mean ± SD) are expressed as milliunits of SMase equivalents/mg of apoB for lysoPLC, PLC, SMase, and PLD. sPLA<sub>2</sub> and PAF-AH are expressed as  $\mu\text{mol min}^{-1}$  (mg of apoB)<sup>-1</sup>. <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs LDL(+). <sup>c</sup> ND, not determined.

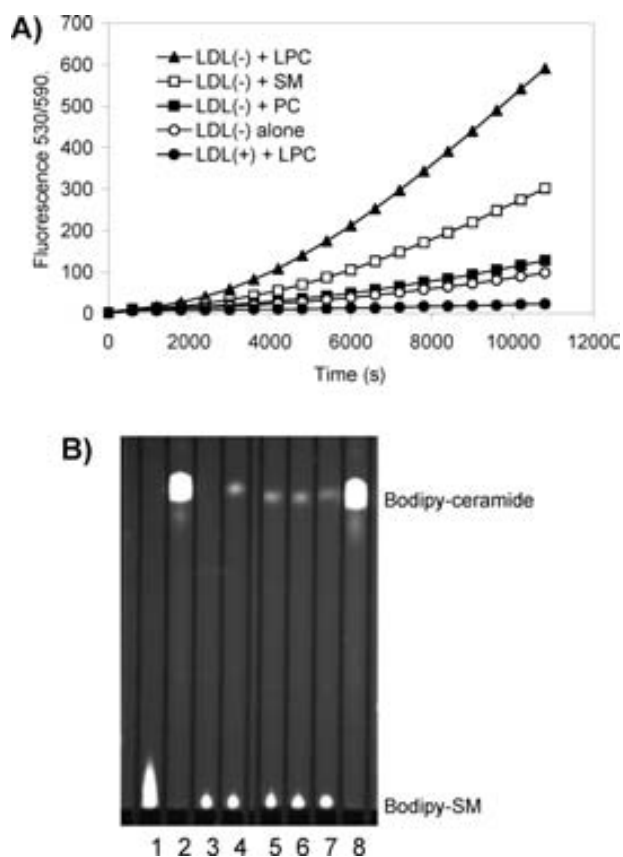


FIGURE 1: (A) Phospholipolytic activity of LDL subfractions alone or in the presence of different substrates. LDL(+) or LDL(-) (100  $\mu\text{L}$  at 0.3 g/L) were incubated alone or with PC, SM, or LPC (0.25 mmol/L, final concentration), and Amplex Red assay was performed as described in Materials and Methods. Increment in fluorescence was monitored for 3 h at 37 °C. The figure shows a representative experiment. (B) Effect of pH and Mg<sup>2+</sup> on phospholipolytic activity of LDL(-) using Bodipy-labeled SM as substrate. LDLs (0.3 g/L) were incubated with Bodipy-SM (0.025 mmol/L, final concentration) for 3 h at 37 °C. After lipid extraction, Bodipy-SM was separated from its degradation product (Bodipy-ceramide) by thin-layer chromatography and visualized in a Chemi-Doc densitometer (Bio-Rad), as described in Materials and Methods. Lane 1: Bodipy-FL-C12-SM alone. Lane 2: Bodipy-FL-C5-ceramide alone. Lane 3: LDL(+) with Bodipy-SM at pH 7.4 and MgCl<sub>2</sub>. Lane 4: LDL(-) with Bodipy-SM at pH 7.4 and MgCl<sub>2</sub>. Lane 5: LDL(-) with Bodipy-SM at pH 7.4 without MgCl<sub>2</sub>. Lane 6: LDL(-) with Bodipy-SM at pH 5.0 and MgCl<sub>2</sub>. Lane 7: LDL(-) with Bodipy-SM at pH 5.0 without MgCl<sub>2</sub>. Lane 8: Bodipy-FL-C5-ceramide alone. The figure shows a representative from five independent experiments.

nm of the peak corresponding to PC did not increase after 24 h of incubation (increment  $3.5 \pm 2.4\%$  of the PC peak area at 234 nm), in contrast to oxidized LDL(+) (increment  $685 \pm 52\%$  of the PC peak area at 234 nm). Moreover, phosphorylcholine, the molecule measured by the Amplex

Red method, is not a product that should be yielded by lipid peroxidation. A further difference between LDL(-) self-aggregation and CuSO<sub>4</sub>-induced LDL oxidation was that the latter resulted in preferential degradation of PC (51% of PC molecules were degraded) versus SM (only 18% of SM molecules were degraded) after 24 h (Figure 2A). This observation concurs with the preferential degradation of SM versus PC after LDL(-) self-aggregation.

*Effect of Phospholipolytic Activity of LDL(-) on Other Modified LDLs.* Extensive modification of LDL(+) by oxidation, acetylation, or sPLA<sub>2</sub>-mediated lipolysis induced no increase in phospholipolytic activities (Table 2). However, when oxLDL or sPLA<sub>2</sub>-modified LDL was added to LDL(-) in the absence of other substrates, phospholipolytic activity increased dramatically (Figure 3). In contrast, the increment in lipolytic activity was much lower when LDL(+) or acetylated LDL were added to LDL(-), which suggests that it depended on LPC content in LDLs. This finding supports the notion that the main substrate for LDL(-) is LPC, with the amount of LPC molecules being the major determinant of the phospholipolytic activity of LDL(-). Other characteristics of LDLs, such as oxidation level or electric charge, appeared to be irrelevant (Table 3).

*Role of ApoE, ApoC-III, and PAF-AH on Phospholipolytic Activity of LDL(-).* The possibility that lysoPLC, PLC, and/or SMase activities displayed by LDL(-) could be due to proteins in which this subfraction is enriched, including apoE, apoC-III, and PAF-AH, was studied. LDL(+) incubated with apoE or apoC-III was enriched in these apolipoproteins. At the low concentration of apolipoprotein (5 and 15 mg/L for apoC-III and apoE, respectively), the content was similar to that observed in LDL(-) ( $0.23 \pm 0.05$  mol of apoE/mol of apoB and  $0.15 \pm 0.03$  mol of apoC-III/mol of apoB, respectively,  $n = 2$ ), and at the high concentration of apolipoprotein (20 and 60 mg/L for apoC-III and apoE, respectively), the content in LDL(+) was approximately 4-fold higher ( $0.95 \pm 0.14$  mol of apoE/mol of apoB and  $0.65 \pm 0.16$  mol of apoC-III/mol of apoB at  $n = 2$ ) than described in LDL(-) (7, 11). However, even at the highest content of apolipoproteins, no increase in phospholipolytic activity was observed in LDL(+) (Figure 4). Neither apoE nor apoC-III alone presented increased phospholipolytic activity. On the other hand, PAF-AH, highly purified by chromatography (tested by SDS-PAGE/silver staining and Western blot), lacked phospholipolytic activity (Figure 4). This observation concurs with results of inhibitors and confirms that PAF-AH was not involved in the phospholipolytic activities displayed by LDL(-).

*Effect of LDL(+) Aging on Phospholipolytic Activity.* LDL(+) incubated up to 40 days at 4 °C progressively increased its phospholipolytic activity. The progressive increase in activity measured by the Amplex Red method is

Table 3: Chemical Characteristics of LDL(+), Oxidized LDL, Acetylated LDL, and sPLA<sub>2</sub>-LDL<sup>a</sup>

	LDL(+)	oxidized LDL	acetylated LDL	sPLA <sub>2</sub> -LDL
relative electrophoretic mobility	1	1.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>b</sup>
PC	100	40.1 ± 17.9 <sup>b</sup>	98.7 ± 2.3	29.6 ± 15.4 <sup>b</sup>
conjugated dienes in PC peak	100	825 ± 142 <sup>b</sup>	101 ± 1	103 ± 5
SM	100	85.2 ± 3.4 <sup>b</sup>	101.2 ± 0.8	103.7 ± 2.9
LPC	100	384.5 ± 40.0 <sup>b</sup>	99.7 ± 2.1	281.1 ± 35.9 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Results are the mean ± SD of four independent experiments. PC, SM, and LPC are expressed as the relative content (%) versus LDL(+) after normalization using dipalmitoyldimethylethanolamine as internal standard. Peaks were integrated at 205 nm. Conjugated dienes in the PC peak were measured at 234 nm and expressed as the relative content (%) versus LDL(+). <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs LDL(+).

Table 4: Inhibition of LDL(-)-Associated SMase, LysoLPC, and PAF-AH Activities and SMase from *Staphylococcus* sp.<sup>a</sup>

	inhibition LDL(-)-SMase activity	inhibition LDL(-)-lysoPLC activity	inhibition LDL(-)-PAF-AH activity	inhibition SMase from <i>Staph.</i> sp.
CPM, 50 μM	24.8 ± 12.9	14.5 ± 2.1	4.0 ± 3.9	17.5 ± 24.7
CPM, 400 μM	38.6 ± 15.9	35.0 ± 4.2	11.3 ± 12.1	31.0 ± 43.8
MMA, 50 μM	4.0 ± 3.1	6.5 ± 2.1	4.5 ± 3.5	5.0 ± 7.1
MMA, 400 μM	7.2 ± 12.3	7.5 ± 2.1	4.5 ± 6.4	24.0 ± 33.9
Pefabloc, 50 μM	3.5 ± 3.3	3.0 ± 0.1	96.5 ± 4.9	31.3 ± 32.0
Pefabloc, 400 μM	4.3 ± 5.1	9.5 ± 3.5	95.0 ± 7.1	44.3 ± 38.9
D-609, 50 μM	1.8 ± 2.2	1.1 ± 1.1	4.0 ± 3.7	ND <sup>b</sup>
D-609, 400 μM	1.7 ± 2.9	2.3 ± 4.0	3.5 ± 3.9	ND
MLFP, 50 μM	4.2 ± 2.7	4.9 ± 3.3	96.5 ± 5.1	ND
MLFP, 400 μM	16.3 ± 11.2	15.3 ± 12.0	97.5 ± 5.7	ND

<sup>a</sup> Results are expressed as % of inhibition versus LDL(-) or SMase from *B. cereus* in the absence of inhibitor. Abbreviations: CPM, chlorpromazine; MMA, manumycin A; D-609, tricyclodecanoyl dithiocarbonate; MLFP, methyl-γ-linoleyl fluorophosphonate. <sup>b</sup> ND, not determined.

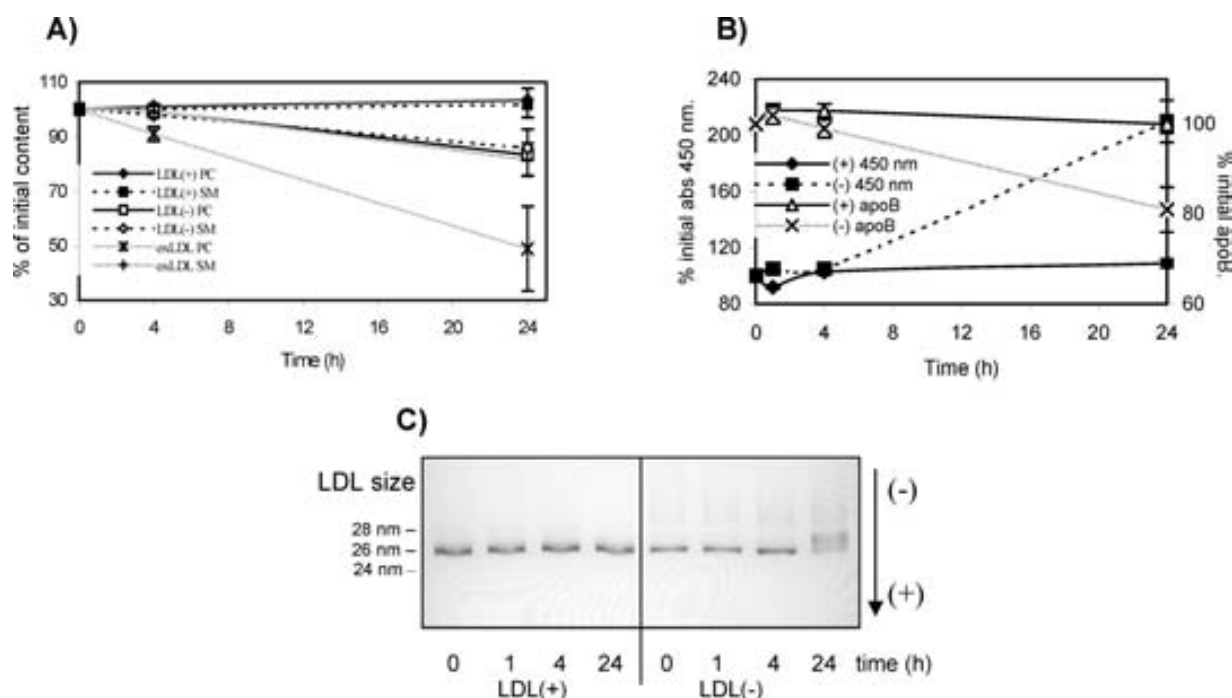


FIGURE 2: Self-degradation of PC and SM and self-aggregation of LDL subfractions. LDLs (0.3 g/L apoB) were incubated for 24 h at 37 °C in the presence of 1 mmol/L EDTA and 2 μmol/L BHT. (A) Phospholipid self-degradation. PC and SM content in LDLs was measured by normal-phase HPLC. Results are expressed as the proportion of PC or SM remaining after 24 h of incubation. (B) Self-aggregation of LDL subfractions. Self-aggregation was determined by measuring absorbance at 450 nm (left axis) or by quantifying the proportion of soluble apoB (nonprecipitable) after high-speed centrifugation (15000g, 15 min) (right axis). (C) Nondenaturing gradient gel electrophoresis of LDL subfractions after 24 h of incubation at 37 °C. Results are the mean of six independent experiments, except (C) which shows a representative gel.

shown in Figure 5A. This was confirmed using Bodipy-SM as substrate (Figure 5B). The increase in phospholipolytic activity was accompanied by changes in circular dichroism spectra (Figure 5C), showing a progressive loss of ellipticity signal. This loss was concomitant with an increased aggregation, as measured by absorbance at 450 nm (Figure 5D). LDL(-) presented a spectrum similar to that by LDL(+),

with a mild decrease of around 10% in the ellipticity signal at the 215–225 nm region (Figure 5C), which would indicate a partial loss of regular secondary structure. Finally, the proportion of LDL(-) measured by analytical anion-exchange chromatography increased very slowly in aged LDL(+) (Figure 5D), indicating that electric charge is not a major cause of phospholipolytic activity.



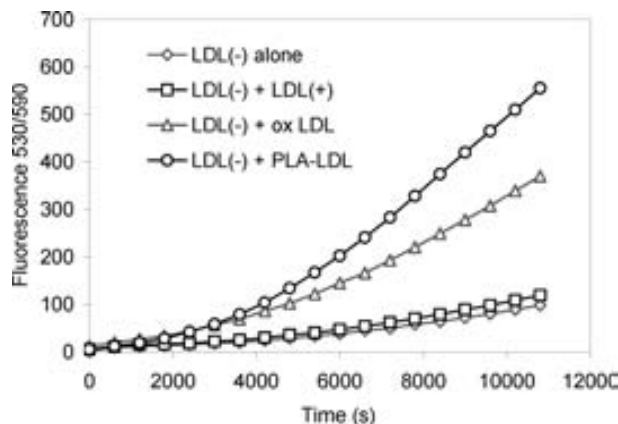


FIGURE 3: Phospholipolytic activity of LDL(-) using native or modified LDLs as substrate. LDL(-) (100  $\mu$ L at 0.3 g/L) was incubated alone or with LDL(+), oxidized LDL of sPLA<sub>2</sub>-LDL (100  $\mu$ L at 0.3 g/L), and Amplex Red assay was performed as described in Materials and Methods. Increment in fluorescence was monitored for 3 h. The figure shows a representative experiment of three independent experiments.

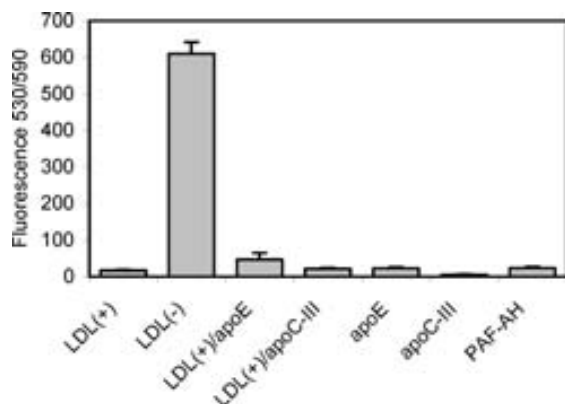


FIGURE 4: Effect of apoE, apoC-III, and PAF-AH on phospholipolytic activity in LDL subfractions. LDL(+) was enriched in apoE or apoC-III as described in Materials and Methods. Phospholipolytic activity was measured in LDLs or in purified apoE, apoC-III, and PAF-AH by Amplex Red assay, using SM as substrate. Results are the mean of three independent experiments.

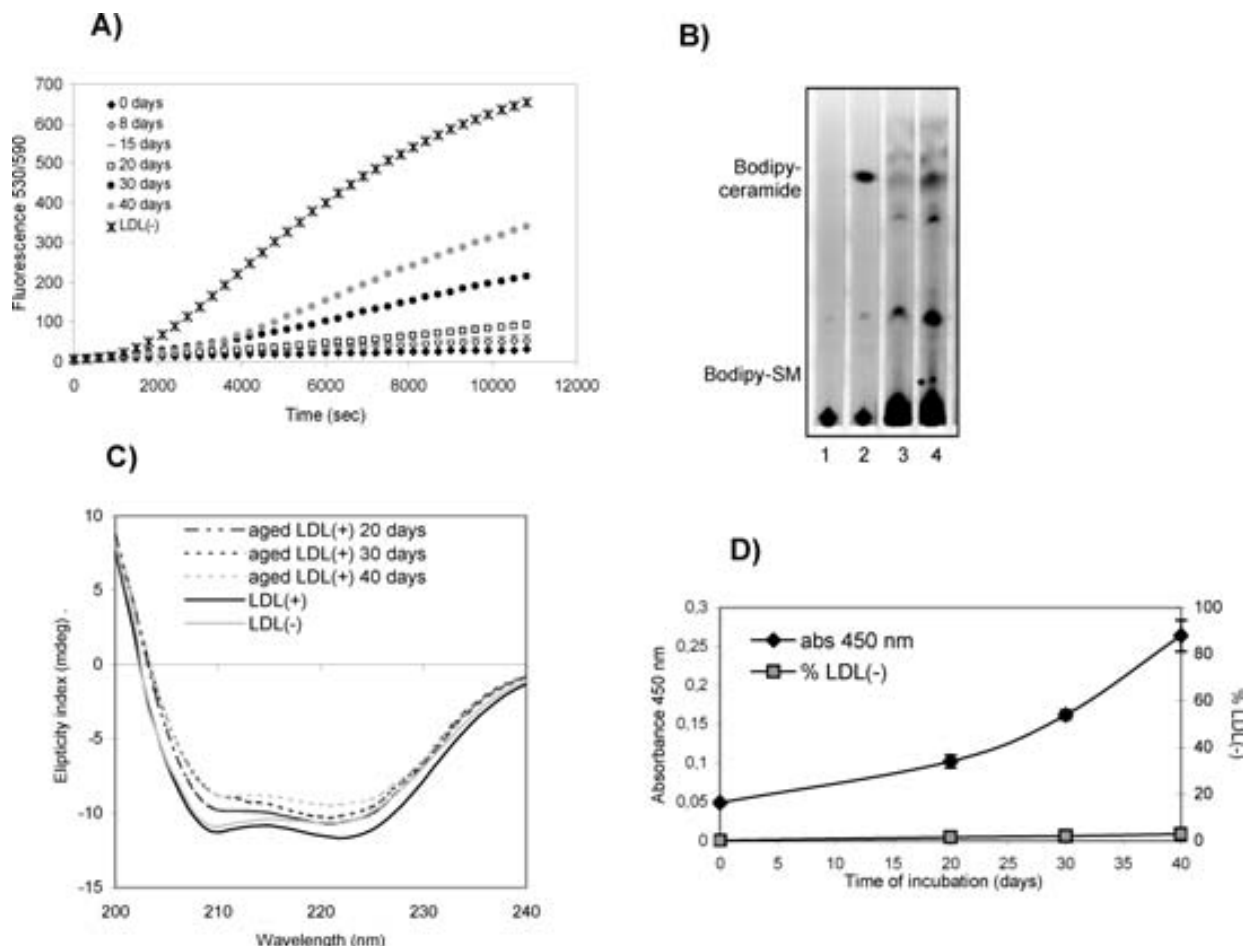
## DISCUSSION

Current results demonstrate that LDL(-) presents novel phospholipolytic activities that could play a relevant role in the atherogenic characteristics of this subfraction of plasma LDL. Holopainen and colleagues previously described the presence of SMase activity in human plasma LDL (15). Herein, we show that SMase activity is almost completely associated with LDL(-), but not with LDL(+). Moreover, this is the first description of phospholipase C activity associated with lipoproteins that degrades more efficiently LPC than PC. The implications of these LDL(-)-associated phospholipolytic activities could involve several atherogenic properties observed in LDL(-). SMase activity appears to be directly involved in the increased susceptibility to aggregation of LDL(-) (7) but could also be related to LDL(-)-mediated apoptotic processes (4, 28). Holopainen et al. suggested that SMase activity could be a link between atherosclerosis and apoptosis (29) since ceramide is a major mediator of apoptosis (14). This concurs with reports describing apoptosis induction mediated by LDL(-) through caspase activation (4, 28, 30), which supports a link with the ceramide-dependent apoptosis pathway.

LDL(-) presents high susceptibility to aggregation (7), a property that is induced in total LDL by SMase treatment (16). Current results suggest that self-aggregation of LDL(-) could be mediated by its intrinsic phospholipolytic activity, since the formation of LDL aggregates was accompanied by SM degradation. Thus, trapping of LDL(-) in the subendothelial space would be more atherogenic than that of LDL(+) since LDL(-)-associated SMase activity could promote aggregation and fusion, thereby increasing lipoprotein retention. Moreover, increased phospholipolytic activity exerted by LDL(-) on lipoproteins enriched in LPC, such as oxidized LDL or sPLA<sub>2</sub>-modified LDL, could also favor their aggregation and retention in the artery wall.

On the other hand, lysoPLC activity could modulate the inflammatory capacity of LDL(-) that is related to the presence of PAF-AH. Our group previously reported that PAF-AH could be responsible for the inflammatory activity of LDL(-) (12, 31). The mechanism involved in such an inflammatory role of LDL-bound PAF-AH should be the formation of products such as LPC and oxidized fatty acids known to promote inflammation (32). Findings reported in the current work suggest a picture in which lysoPLC activity present in LDL(-) could counteract the effect of LPC generated by PAF-AH, thereby promoting its degradation. This could be protective action since the resulting products, phosphorylcholine and monoacylglycerol, are not known to be involved in inflammatory processes. Thus, a complementary action of PAF-AH and lysoPLC activities, with both being present in LDL(-), could attenuate the possibility of high inflammatory activity of mildly oxidized LDL. The question arising from these assumptions is whether LDL(-) could be generated as a mechanism to limit the deleterious effects exerted by minimal LDL oxidation on vascular cells; hence, LDL(-) could be a consequence rather than a cause of inflammation. On that score, the effect of LDL(-) on oxidized LDL or on PLA<sub>2</sub>-modified LDL degrading its LPC content supports a protective role for LDL(-). Further studies are required to define the role of the putative coordination between PAF-AH and lysoPLC activities present in LDL(-).

Our results did not reveal the origin of phospholipolytic activity of LDL(-). Inhibitors of well-characterized SMase and PLC activities present in plasma had a poor inhibitory effect, suggesting that these enzymes are not responsible for the phospholipolytic activity. On the other hand, neither PAF-AH nor apoC-III or apoE is involved, since purified PAF-AH, apoE-enriched, or apoC-III-enriched LDL(+) presented no increase in choline generation. Lipid extracts from LDL(+) and LDL(-) were also tested for SMase activity, but no lipolytic activity was observed (data not shown). With apoE, apoC-III, PAF-AH, and lipid moiety ruled out, two explanations are possible. One is that a currently unknown protein could be responsible for phospholipolytic activity. The other possibility is that apoB could be the protein responsible for this enzymatic activity. Regarding the first possibility, Karlsson et al. reported the presence of 10 minor proteins in total LDL: apoE, apoC-III, apoC-II, apoA-I, apoA-IV, apoJ, apoM, serum amyloid A-IV, calgranulin A, and lysozyme C (33). To our knowledge, none of these proteins have been reported to present phospholipase activity. Moreover, the content of apoE, apoC-III, apoC-II in VLDL and of apoA-I, apoA-IV, apoJ, apoM, and serum amyloid A-4 in HDL is much higher than that detected in LDL(-).



**FIGURE 5:** Phospholipolytic activity of “in vitro”-aged LDL. LDL(+) (0.5 g/L) was aged by incubation at 4 °C in PBS supplemented with 2  $\mu$ M BHT for up to 40 days. (A) Amplex Red assay. LDLs (100  $\mu$ L at 0.3 g/L) were incubated with LPC (0.25 mmol/L, final concentration), and Amplex Red assay was performed as described in Materials and Methods. The increment in fluorescence was monitored for 3 h at 37 °C. (B) Bodipy-SM/TLC. LDLs (0.3 g/L) were incubated with Bodipy-SM (0.025 mmol/L for LDL(+) and LDL(-), 0.05 mmol/L for aged-LDL, final concentration) for 8 h at 37 °C. After lipid extraction, Bodipy-SM was separated from its degradation product (Bodipy-ceramide) by thin-layer chromatography (TLC) and visualized in a Chemi-Doc densitometer (Bio-Rad), as described in Materials and Methods (inverted image). Lanes: 1, LDL(+); 2, LDL(-); 3, LDL(+) aged 30 days; 4, LDL(+) aged 40 days. (C) Far-UV CD spectra of aged LDL(+). Spectra of LDL(-) and LDL(+) aged for 0, 20, 30, and 40 days of incubation in PBS with 2  $\mu$ M BHT at 4 °C. Samples were measured at 0.05 g/L of apoB using a 0.2 mm quartz cuvette at 25 °C. Represented spectra are those deconvolved after analysis by the K2D software (DICHROWEB server). (D) Self-aggregation and self-generation of LDL(-) in aged LDLs. Self-aggregation was determined by measuring absorbance at 450 nm of LDLs (0.5 g/L of apoB) after increasing incubation time, as described in Materials and Methods. LDL(-) proportion was determined by analytical anion-exchange chromatography in a MonoQ column.

Since phospholipolytic activity in VLDL and HDL was almost zero (15), the involvement of these apoproteins in the phospholipolytic activity of LDL(-) is unlikely.

Regarding apoB, Holopainen and colleagues hypothesized that the SMase activity of LDL is due to apoB, since protein sequence homology studies revealed a high homology between apoB and three regions of *Staphylococcus* sp. SMase. Those authors suggested that a catalytically active His-Ser-Asp triad common to a wide range of lipolytic enzymes is also present in apoB-100 (15, 29). In agreement with this hypothesis, the observation that “in vitro” aging of LDL(+) progressively increases its phospholipolytic activity suggests that structural changes in apoB could underlie the appearance of such activity. This is supported by the observation that progressive loss of ellipticity signal concurs with an increased aggregation, as measured by absorbance at 450 nm. The loss of regular secondary elements in favor of random coil conformation generates a more flexible apoB, which would account for enzymatic activity by the His-Ser-Asp triad. These data concur with results reported by de

Spirito et al. (34), who observed that LDL aged in plasma increased aggregation in parallel to the loss of secondary structure as measured by circular dichroism.

Since the apoB amino acid sequence is the same in LDL(+) and LDL(-) from the same subject, the hypothesis of Holopainen and Kinnunen (15, 29) would imply that structural differences in apoB within LDL(+) and LDL(-) could be responsible for phospholipolytic activity. The CD spectrum of LDL(-) was slightly different from that of LDL(+) with a 10% loss of signal at the 215–225 nm region; this would indicate a loss of regular secondary structures, according to previous reports (35, 36). However, the LDL(-) spectrum was also different from that of aged LDLs. This observation indicates that whatever changes occur in LDL(+) during “in vitro” aging, the process should differ from that occurring “in vivo” with LDL(-). Thus, although aged LDLs point to a role for apoB, data from LDL(-) overall secondary structure do not unequivocally confirm this hypothesis. The role of apoB should be confirmed in further studies focused on ascertaining the

putative regions that could be involved in the generation of phospholipolytic activity in LDL(-).

## ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Christine O'Hara for excellent editorial assistance.

## REFERENCES

- Navab, M., Berliner, J. A., Watson, A. D., Hama, S. Y., Territo, M. C., Lusis, A. J., Shih, D. M., Van Lenten, B. J., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., and Fogelman, A. M. (1996) The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 831–842.
- Sanchez-Quesada, J. L., Benitez, S., and Ordonez-Llanos, J. (2004) Electronegative low-density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 329–335.
- Demuth, K., Myara, I., Chappey, B., Védie, B., Pech-Amsellem, M. A., Haberland, M. E., and Moatti, N. (1996) A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 773–783.
- Chen, C. H., Jiang, T., Yang, J. H., Jiang, W., Lu, J., Marathe, G. K., Pownall, H. J., Ballantyne, C. M., McIntyre, T. M., Henry, P. D., and Yang, C. Y. (2003) Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription. *Circulation* 107, 2102–2108.
- Sanchez-Quesada, J. L., Ota-Entraigas, C., Franco, M., Jorba, O., Gonzalez-Sastre, F., Blanco-Vaca, F., and Ordonez-Llanos, J. (1999) Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* 84, 655–659.
- Sanchez-Quesada, J. L., Perez, A., Caixas, A., Rigla, M., Payes, A., Benitez, S., and Ordonez-Llanos, J. (2001) Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 3243–3249.
- Sanchez-Quesada, J. L., Camacho, M., Anton, R., Benitez, S., Vila, L., and Ordonez-Llanos, J. (2003) Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis* 166, 261–270.
- Benitez, S., Camacho, M., Bancells, C., Vila, L., Sanchez-Quesada, J. L., and Ordonez-Llanos, J. (2006) Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array. *Biochim Biophys. Acta.*
- Ziouzenkova, O., Asatryan, L., Sahady, D., Orasanu, G., Perrey, S., Cutak, B., Hassell, T., Akiyama, T. E., Berger, J. P., Sevastian, A., and Plutzky, J. (2003) Dual roles for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 278, 39874–39881.
- AbezfnY, F. M., Yang, C. Y., BuiThanh, N. A., Wise, V., Chen, H. H., Rangaraj, G., and Ballantyne, C. M. (2007) L5, the most electronegative subfraction of plasma LDL, induces endothelial vascular cell adhesion molecule 1 and CXC chemokines, which mediate mononuclear leukocyte adhesion. *Atherosclerosis* 192, 56–66.
- De Castellarnau, C., Sanchez-Quesada, J. L., Benitez, S., Rosa, R., Caveda, L., Vila, L., and Ordonez-Llanos, J. (2000) Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2281–2287.
- Benitez, S., Sanchez-Quesada, J. L., Ribas, V., Jorba, O., Blanco-Vaca, F., Gonzalez-Sastre, F., and Ordonez-Llanos, J. (2003) Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation* 108, 92–96.
- Benitez, S., Camacho, M., Arcelus, R., Vila, L., Bancells, C., Ordonez-Llanos, J., and Sanchez-Quesada, J. L. (2004) Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL. *Atherosclerosis* 177, 299–305.
- Schissel, S. L., Tweedie-Hardman, J., Rapp, J. H., Graham, G., Williams, K. J., and Tabas, I. (1996) Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins. *J. Clin. Invest.* 98, 1455–1464.
- Holopainen, J. M., Medina, O. P., Metsu, A. J., and Kinnunen, P. K. (2000) Sphingomyelinase activity associated with human plasma low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 275, 16484–16489.
- Pentikainen, M. O., Lehtonen, E. M., and Kovanen, P. T. (1996) Aggregation and fusion of modified low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 37, 2638–2649.
- Williams, K. J., and Tabas, I. (1998) The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr. Opin. Lipidol.* 9, 471–474.
- Auerbach, B. J., Kiely, J. S., and Comicelli, J. A. (1992) A spectrophotometric microtiter-based assay for the detection of hydroperoxy derivatives of linoleic acid. *Anal. Biochem.* 201, 375–380.
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., and Brown, M. S. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 333–337.
- Patton, G. M., and Robins, S. J. (1998) *Separation and quantitation of phospholipid classes by HPLC*, Humana Press, Totowa, NJ.
- Öörni, K., Posio, P., Ala-Korpela, M., Jauhiainen, M., and Kovanen, P. T. (2005) Sphingomyelinase induces aggregation and fusion of small very low-density lipoprotein and intermediate-density lipoprotein particles and increases their retention to human arterial proteoglycans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1678–1683.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Sanchez-Quesada, J. L., Benitez, S., Ota, C., Franco, M., Blanco-Vaca, F., and Ordonez-Llanos, J. (2002) Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J. Lipid Res.* 43, 699–705.
- Tew, D. G., Southan, C., Rice, S. Q., Lawrence, M. P., Li, H., Boyd, H. F., Moores, K., Gloger, I. S., and Macphee, C. H. (1996) Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 591–599.
- Benitez, S., Villegas, V., Bancells, C., Jorba, O., Gonzalez-Sastre, F., Ordonez-Llanos, J., and Sanchez-Quesada, J. L. (2004) Impaired binding affinity of electronegative low-density lipoprotein (LDL) to the LDL receptor is related to nonesterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content. *Biochemistry* 43, 15863–15872.
- Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2002) DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* 18, 211–212.
- Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 32, W668–W673.
- Chen, H. H., Hosken, B. D., Huang, M., Gaubatz, J. W., Myers, C. L., Macfarlane, R. D., Pownall, H. J., and Yang, C. Y. (2007) Electronegative LDLs from familial hypercholesterolemic patients are physicochemically heterogeneous but uniformly proapoptotic. *J. Lipid Res.* 48, 177–184.
- Kinnunen, P. K., and Holopainen, J. M. (2002) Sphingomyelinase activity of LDL: a link between atherosclerosis, ceramide, and apoptosis? *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 37–42.
- Yang, C. Y., Chen, H. H., Huang, M. T., Raya, J. L., Yang, J. H., Chen, C. H., Gaubatz, J. W., Pownall, H. J., Taylor, A. A., Ballantyne, C. M., Jenniskens, F. A., and Smith, C. V. (2007) Proapoptotic low-density lipoprotein subfractions in type II diabetes. *Atherosclerosis* 193, 283–291.
- Sanchez-Quesada, J. L., Benitez, S., Perez, A., Wagner, A. M., Rigla, M., Carreras, G., Vila, L., Camacho, M., Arcelus, R., and Ordonez-Llanos, J. (2005) The inflammatory properties of electronegative low-density lipoprotein from type I diabetic patients are related to increased platelet-activating factor acetylhydrolase activity. *Diabetologia* 48, 2162–2169.
- Shi, Y., Zhang, P., Zhang, L., Osman, H., Mohler, E. R., III, Macphee, C., Zalewski, A., Postle, A., and Wilensky, R. L. (2007) Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses. *Atherosclerosis* 191, 54–62.
- Karlsson, H., Leanderson, P., Tagesson, C., and Lindahl, M. (2005) Lipoproteomics I: mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5, 551–565.

34. De Spirito, M., Brunelli, R., Mei, G., Bertani, F. R., Ciasca, G., Greco, G., Papi, M., Arcovito, G., Ursini, F., and Parasassi, T. (2006) Low density lipoprotein aged in plasma forms clusters resembling subendothelial droplets: aggregation via surface sites. *Biophys. J.* *90*, 4239–4247.
35. Parasassi, T., Bittolo-Bon, G., Brunelli, R., Cazzolato, G., Krasnowska, E. K., Mei, G., Sevanian, A., and Ursini, F. (2001) Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-). *Free Radical Biol. Med.* *31*, 82–89.
36. Asatryan, L., Hamilton, R. T., Isas, J. M., Hwang, J., Kaye, R., and Sevanian, A. (2005) LDL phospholipid hydrolysis produces modified electronegative particles with an unfolded apoB-100 protein. *J. Lipid Res.* *46*, 115–122.

BI800537H

# High binding affinity of electronegative LDL to human aortic proteoglycans depends on its aggregation level<sup>1</sup>

Cristina Bancells,<sup>\*,†</sup> Sònia Benítez,<sup>\*</sup> Matti Jauhiainen,<sup>§</sup> Jordi Ordóñez-Llanos,<sup>\*,†</sup>  
Petri T. Kovanen,<sup>\*\*</sup> Sandra Villegas,<sup>†</sup> José Luis Sánchez-Quesada,<sup>1,\*</sup> and Katariina Öörni<sup>\*\*</sup>

Servei de Bioquímica,<sup>\*</sup> Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain; Departament de Bioquímica i Biologia Molecular,<sup>†</sup> Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; National Public Health Institute and FIMM,<sup>§</sup> Institute for Molecular Medicine Finland, Biomedicum, Haartmaninkatu 8, 00290 Helsinki, Finland; and Wihuri Research Institute,<sup>\*\*</sup> Kallioliinantie 4, 00140 Helsinki, Finland

**Abstract** Electronegative LDL [LDL(-)] is an atherogenic subfraction of plasma LDL that has increased apolipoprotein E (apoE) and apoC-III content, high density, and increased susceptibility to aggregation. These characteristics suggest that LDL(-) could bind to proteoglycans (PGs); therefore, our aim was to evaluate its affinity to PGs. Binding of LDL(-) and native LDL [LDL(+)] to human aortic PGs was determined by precipitation of LDL-glycosaminoglycan complexes, LDL incubation in PG-coated microtiter wells, and affinity chromatography on PG column. All methods showed that LDL(-) had higher binding affinity to PGs than did LDL(+). PG capacity to bind LDL(-) was increased approximately 4-fold compared with LDL(+) in precipitation and microtiter assays. Chromatography on PG column showed LDL(-) to consist of two subpopulations, one with higher and one with lower PG binding affinity than LDL(+). Unexpectedly, the lower PG affinity subpopulation had increased apoE and apoC-III content. In contrast, the high PG affinity subpopulation presented phospholipase C (PLC)-like activity and increased aggregation. These results suggest that PLC-like activity could alter LDL lipid composition, thereby promoting particle aggregation and binding to PGs. This propensity of a subpopulation of LDL(-) to bind to PGs could facilitate its retention in the extracellular matrix of arterial intima and contribute to atherosclerosis progression.—Bancells, C., S. Benítez, M. Jauhiainen, J. Ordóñez-Llanos, P. T. Kovanen, S. Villegas, J. L. Sánchez-Quesada, and K. Öörni. **High binding affinity of electronegative LDL to human aortic proteoglycans depends on its aggregation level.** *J. Lipid Res.* 2009. 50: 446–455.

**Supplementary key words** glycosaminoglycans • lipoprotein aggregation • sphingomyelinase • phospholipase C

This work was supported by Grants PI030885, PI060500, PI070148, and RD060015 from the Ministerio de Sanidad/Instituto de Salud Carlos III/FIS. S.B. and J.L.S.-Q. are recipients of personal grants CP040110 and CP060220 from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). C.B. is the recipient of personal grant AP2004-1468 from the Ministerio de Educación y Ciencia.

Manuscript received 17 June 2008 and in revised form 14 October 2008.

Published, JLR Papers in Press, October 24, 2008.  
DOI 10.1194/jlr.M800318-JLR200

Human atherosclerosis is characterized by an initial accumulation of LDL-derived cholesterol in the arterial intima. Native LDL [LDL(+)] is retained by the extracellular matrix of the intima, particularly by proteoglycans (PGs) (1–3), where it can be modified and can exert inflammatory actions (4). PGs, the main component of the extracellular matrix, form a tight and negatively charged network (5). Binding of LDL(+) to PGs is via ionic interactions between positively charged residues of apolipoprotein B-100 (apoB-100) and negatively charged sulfate and carboxyl groups of glycosaminoglycan (GAG) chains of PGs (6–9). Two PG binding sites have been described in apoB-100. Site A (residues 3,148–3,158) is only exposed after degradation of phospholipids, for example by secretory phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>), whereas site B is permanently exposed (residues 3,359–3,369). This sPLA<sub>2</sub> modification enables cooperation between site A and site B, increasing the affinity of apoB-100 to PGs (10). Other modifications in LDL, such as lipolysis with SMase, increase its binding affinity to PGs because they induce changes in the surface monolayer of LDL particles that may alter the conformation of apoB-100 and induce aggregation and fusion of LDL particles (10–12). Finally, other minor components of LDL, such as apoE and apoC-III can also mediate binding of lipoproteins to PGs. These apolipoproteins can mediate the binding by bridging (apoE) (13) or by facilitating PG interaction (apoC-III) (14).

Electronegative LDL [LDL(-)] is a modified LDL with atherogenic characteristics that is present in circulation. This LDL subfraction presents inflammatory, apoptotic,

Abbreviations: apoE, apolipoprotein E; GAG, glycosaminoglycan; GGE, native polyacrylamide gradient gel electrophoresis; LDL(-), electronegative LDL; LDL(+), native LDL; lysoPLC, lysophospholipase C; PAF-AH, platelet-activating factor acetylhydrolase; PG, proteoglycan; PLC, phospholipase C; sPLA<sub>2</sub>, secretory phospholipase A<sub>2</sub>.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.

e-mail: jsanchezq@santpau.cat

The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains supplementary data in the form of one table and one figure.

and cytotoxic properties *in vitro* (15–17), and its proportion is increased in subjects with high cardiovascular risk (18, 19). Some characteristics suggest that despite their electronegative charge, LDL(–) particles could bind to PGs, owing to their increased apoE and apoC-III content compared with LDL(+) (20). Furthermore, compared with LDL(+), LDL(–) particles have higher density, smaller size (21), and increased susceptibility to aggregation (22), properties that are also related to increased affinity to PGs (10, 11).

Our results here indicate that certain LDL(–) subpopulations show increased binding to commercial GAGs and human aortic PGs, in neutral and acidic conditions. The current study also aims to clarify the mechanisms involved in such high-affinity binding.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of LDL(+) and LDL(–)

Human LDL ( $1.019 < d < 1.050$  g/ml) was isolated from plasma of healthy volunteers by sequential ultracentrifugation at +4°C in the presence of 1 mM EDTA. The study was approved by the institutional Ethics Committee, and subjects gave their written informed consent. LDL was subfractionated into nonmodified LDL [LDL(+)] and LDL(–) by anion-exchange chromatography, as described (22). LDL subfractions were characterized for their protein and lipid composition, and differences in electronegativity were confirmed by agarose gel electrophoresis (22).

### Preparation and characterization of aortic PGs

PGs from the intima-media of human aortas were obtained at autopsy within 24 h of accidental death and were prepared essentially by the method of Hurt-Camejo et al. (23), consisting of a urea extraction and a purification by anion exchange chromatography. GAGs were quantified by the method of Bartold and Page (24), and the amounts of PGs are expressed in terms of their GAG content. Our preparation of PGs isolated from human aortas contained 53% chondroitin-6 sulfate, 27% chondroitin-4 sulfate and 20% dermatan sulfate.

### Binding of LDL to PGs

Binding of LDL(+) and LDL(–) to PGs was examined by three different methods.

**Precipitation of LDL-GAG complexes.** The assay is based on the method described by Davidsson et al. (25). Briefly, LDL (200  $\mu$ l at 0.1 g protein/l) in 5 mM HEPES, 20 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0, was incubated at +4°C for 2 h with heparan sulfate (Sigma H7640), dermatan sulfate (Sigma C3788), or chondroitin-6 sulfate (Sigma C4384) at 10 and 100  $\mu$ g GAG/ml. Samples were centrifuged at 12,000 *g* for 10 min at +4°C, and cholesterol of LDL unbound to PGs was determined in the supernatants using an enzymatic method (Roche Diagnostics). Bound LDL is expressed as micrograms of LDL protein/well considering the following cholesterol/LDL protein ratio: 4.6 mmol of cholesterol/g of LDL protein.

**Incubation of LDL in PG-coated microtiter wells.** Polystyrene 96-well plates (Thermo Labsystems) were coated overnight with 100  $\mu$ l of human aortic PGs (25  $\mu$ g/ml) or 5% fat-free BSA in

PBS by incubation at +4°C. Wells were blocked with 3% BSA and 1% fat-free milk powder in PBS for 1 h at +37°C. BSA-coated wells served as controls, and their binding was subtracted from those of wells coated with PGs. Increasing concentrations of LDL (2.5–20  $\mu$ g of LDL protein) in 20 mM HEPES, 32 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, containing 1% BSA were incubated for 1 h at +37°C. Unbound LDL was removed, and wells were washed with 20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4. The amount of bound LDL was determined using an Amplex Red cholesterol kit (Molecular Probes) according to the manufacturer's recommendations (26).

**PG affinity chromatography.** Human arterial PGs (1 mg) were coupled to an *N*-hydroxysuccinimide-activated HiTrap column (1 ml) according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). As described by Öörni et al. (27), columns were equilibrated with buffer A (10 mM HEPES, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4), washed with buffer B (buffer A plus 250 mM NaCl), and re-equilibrated with buffer A before use. LDL was bound to the column using buffer A at a flow rate of 0.5 ml/min and eluted with a linear gradient of NaCl using buffer B. Lipoprotein elution was monitored at 280 nm, and gradient was checked by measuring the change in conductivity. Affinity of LDL to PG was also tested at acid pH using buffer C (10 mM MES, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 5.5) and eluting the samples with buffer D (buffer C plus 500 mM NaCl). To determine the ionic strength of LDL(+) and LDL(–) binding to PG at neutral and acid pH, 50  $\mu$ l of LDL at 0.5 g protein/l was injected on a single PG column in a Smart (Pharmacia Biotech) system (analytical method).

To isolate LDL(–) subfractions differing in PG affinity, three PG-HiTrap columns in tandem configuration enabled us to load more sample and collect sufficient amounts of LDL subfractions for further analyses (preparative method). LDL(–) (1.8 ml at 0.4 g protein/l) was applied on columns in a fast-protein liquid chromatography system (Pharmacia Biotech). Five LDL(–) subfractions eluting between 30 mM and 125 mM NaCl were collected. These fractions were concentrated by centrifugation with Centricon YM-10 (10,000 MWCO Amicon, Millipore) and used for further assays at 0.4 g protein/l (see below).

### Characterization of LDL(–) subfractions

**Lipid and protein composition.** Total cholesterol, triglyceride, apoB-100 (Roche), phospholipids, and NEFAs (Wako) were measured in LDL(+), LDL(–), and LDL(–) subfractions by commercial methods in a Hitachi 911 autoanalyzer (22). ApoE concentration of the isolated LDL (2  $\mu$ g of LDL protein) was quantified by the ELISA method using a polyclonal anti-apoE rabbit capture antibody (R107) to coat the wells and HRP-conjugated anti-apoE polyclonal rabbit antibody (DAKO) for detection as described (28). ApoC-III content was measured by an immunoturbidimetric method (Kamiya) using 35  $\mu$ g of LDL protein. Peroxide content was measured by a commercial assay (Perox Say lipid quantitative assay, G-Biosciences) using 10  $\mu$ g of LDL. Electronegativity was evaluated by agarose gel electrophoresis (Midigel, Biomidi).

**Enzyme activity measurements.** Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity was measured using 4  $\mu$ g of LDL by a commercial colorimetric method using 2-thio-PAF as substrate (Cayman) essentially as described (29). Phospholipolytic activities [lysophospholipase C (lysoPLC) and SMase activities] were measured using 15  $\mu$ g of LDL by a commercial fluorimetric method (Amplex Red, Molecular Probes) using lysophosphatidylcholine or sphingomyelin as substrates (30). SMase activity was also analyzed by incubation of LDL (25  $\mu$ g of LDL protein) with a fluo-

recently labeled substrate (borondipyrromethene (BODIPY)-FL-C12-SM, Molecular Probes) for 3 h at +37°C followed by lipid extraction and separation by TLC (30, 31).

**Aggregation studies.** LDL aggregation level was determined by measuring absorbance at 450 nm and by native polyacrylamide gradient gel electrophoresis (GGE), as described (21). The size and aggregation of LDL particles were determined by transmission electron microscopy. For this purpose, LDL preparations were negatively stained with 2% potassium phosphotungstate, pH 7.0 (32). The stained samples were viewed and photographed in a JEOL JEM-1200EX transmission electron microscope at the Institute for Biotechnology, Electron Microscopy, University of Helsinki, Helsinki, Finland. Original magnifications of electron micrographs were 60,000.

**ApoB-100 secondary structure determination.** Far-ultraviolet circular dichroism spectra were performed with LDL samples in PBS at 0.05 g protein/1 in a JASCO J-715 spectropolarimeter, as previously described (30). Twenty spectra were averaged for each measurement, and the buffer blank was subtracted. Spectra were deconvolved by the analysis program CDSSTR from the DICHROWEB server (Birkbeck University, London) to calculate the relative contribution of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn, and random coil secondary structures (33, 34).

### Anti-apoE immunoaffinity chromatography

Polyclonal rabbit anti-human apoE IgG (R107, IgG purified by Protein G-method) was coupled to CNBr-activated Sepharose CL-4B according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech). The affinity column contained 4 mg IgG/ml of the matrix. LDL(-) (1 ml at 0.8 g protein/1) was applied on the column equilibrated with PBS, pH 7.4, at a flow rate of 0.5 ml/min using a Merck-Hitachi HPLC system. Nonbound fractions (fraction size, 1 ml) were collected, and the bound material was eluted with 0.1 M glycine, pH 2.5, into tubes containing 1 M Tris-HCl, pH 8.5, for neutralization. Both nonbound and bound fractions were dialyzed against buffer A and concentrated by centrifugation with Centricon YM-10 (10,000 MWCO Amicon, Millipore). PG binding affinity of the bound LDL(-) (apoE-enriched) and the nonbound LDL(-) (apoE-poor) was then determined by analytical PG affinity chromatography. All other details and elution conditions were as previously described (28).

### Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SD. The SPSS 15.0 statistical package was used. Differences between LDL(+) and LDL(-) groups were tested with Wilcoxon's *t*-test, except for analysis of LDL binding to PGs in microtiter wells, for which Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used. Differences among LDL(-) subfractions were tested using ANOVA. A *P* value of <0.05 was considered significant, except as indicated.

## RESULTS

### Binding of LDL to PGs

Binding of LDL(+) and LDL(-) to PGs was examined by three different methods. First, LDL binding affinity to commercial GAGs was determined by high-speed precipitation. As shown in **Table 1**, LDL(-) demonstrated higher binding affinity to GAGs than did LDL(+). The capacity of

TABLE 1. Binding of LDL(+) and LDL(-) to GAGs evaluated by measuring the precipitation of LDL-GAG complexes.

	$\mu\text{g GAG/ml}$	LDL(-)	
		LDL(+)	LDL(-)
% Binding			
Heparan sulfate	0	1.7 $\pm$ 2.0	4.9 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>
	10	3.7 $\pm$ 3.6	14.6 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>
	100	4.4 $\pm$ 3.0	16.9 $\pm$ 6.6 <sup>a</sup>
Dermatan sulfate	0	1.1 $\pm$ 2.0	4.6 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>
	10	4.5 $\pm$ 4.7	17.8 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup>
	100	5.1 $\pm$ 5.5	21.3 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>
Chondroitin-6 sulfate	0	0.6 $\pm$ 1.2	5.0 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>
	10	11.7 $\pm$ 6.8	23.8 $\pm$ 8.2 <sup>a</sup>
	100	13.3 $\pm$ 8.6	26.7 $\pm$ 3.3 <sup>a,b</sup>

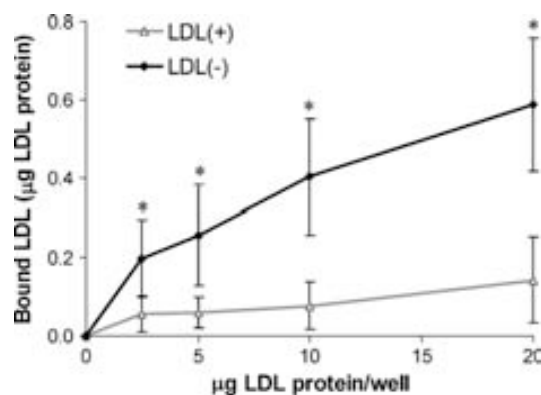
LDL(+), native LDL; LDL(-), electronegative LDL; GAG, glycosaminoglycan. Results are the mean  $\pm$  SD of five independent experiments.

<sup>a</sup> *P* < 0.05 versus LDL(+).

<sup>b</sup> *P* < 0.05 versus heparan sulfate.

GAGs to bind to LDL(-) was 2- to 4-fold higher when compared with LDL(+). On the other hand, LDL(-) affinity was different between the GAGs used in the following order: chondroitin-6 sulfate > dermatan sulfate > heparan sulfate.

To test the binding of LDL(+) and LDL(-) under more-physiological conditions, two assays using PGs isolated from the intima-media of human aortas were performed. Microtiter well assay showed higher binding affinity of LDL(-) to human aortic PGs compared with that of LDL(+) (**Fig. 1**). The amount of LDL(-) bound to PGs was 4-fold higher than the amount of LDL(+), independently of the LDL concentration, which fully concurs with the data obtained from the precipitation assay (see above).

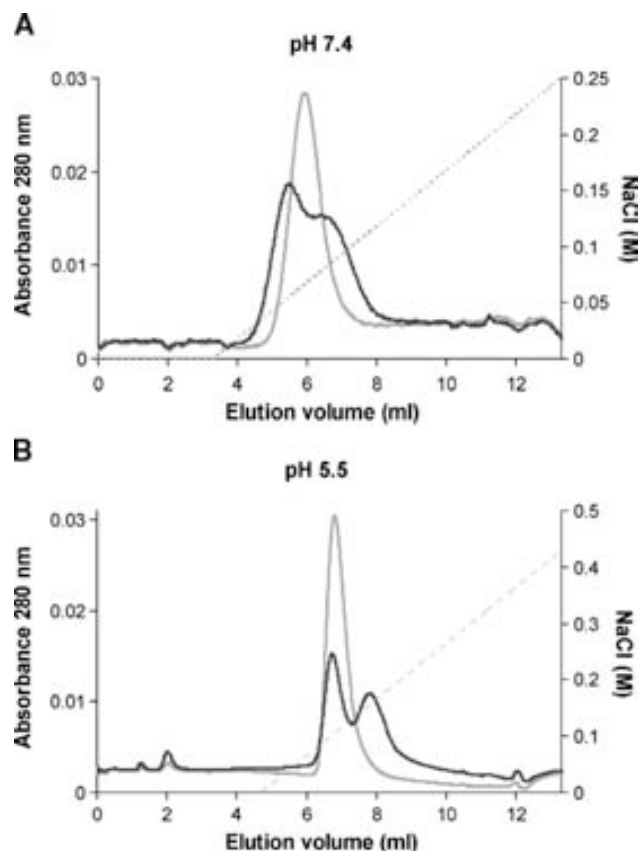


**Fig. 1.** Binding of native LDL [LDL(+)] and electronegative LDL [LDL(-)] to human aortic proteoglycans (PGs) measured in PG-coated microtiter wells. Increasing concentrations of both LDL fractions were incubated for 1 h at +37°C in PG- or BSA-coated wells. Unbound particles were removed, and the concentration of LDL particles bound to PGs or BSA was measured as described in Materials and Methods. Three independent experiments (each concentration assayed in triplicate) are shown. Black symbols represent LDL(-) and white symbols represent LDL(+). Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to analyze statistical differences between LDL(+) and LDL(-). \* *P* = 0.005, *P* = 0.001, *P* < 0.001, and *P* < 0.001 at the concentrations of 2.5, 5, 10 and 20  $\mu\text{g}$  protein/well, respectively. Error bars indicate SD.

PG affinity chromatography was used to determine the binding strength of LDL(-) to human aortic PGs and to study the distribution of LDL particles, depending on their binding affinity. At pH 7.4, LDL(+) eluted as a single peak at 68 mM NaCl, whereas the LDL(-) elution pattern displayed two peaks at 54 and 87 mM NaCl (Fig. 2A). Hence, LDL(-) consisted of two subpopulations: one with higher and the other with slightly lower PG binding affinity than LDL(+). On the other hand, it has been described that a decrease in pH enhances the binding of native and aggregated LDL to PGs (26). We observed this acid pH effect in both LDL fractions (Fig. 2B). At pH 5.5, the ionic strength needed to elute LDL increased and LDL(+) could be eluted as a single peak at 114 mM NaCl and LDL(-) as two peaks at 113 and 139 mM NaCl. Interestingly, the LDL(-) subpopulation that displayed lower PG affinity than LDL(+) at neutral pH had the same affinity as LDL(+) at acid pH.

### Characterization of LDL(-) subfractions

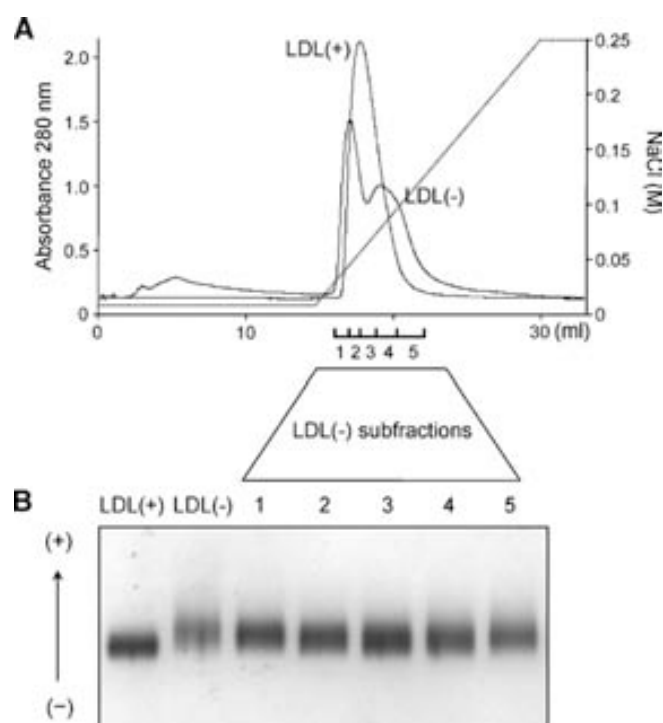
To assess why certain subpopulations of LDL(-) particles bind with increased affinity to PGs compared with LDL(+) and what the dictating factors causing differences



**Fig. 2.** Analytical affinity chromatography of LDL(+) and LDL(-) on human aortic PG column at neutral pH and acidic pH. LDL(+) (gray line) or LDL(-) (black line) (50  $\mu$ l at 0.5 g/l) were analyzed on a PG-HiTrap column and eluted with a linear gradient of NaCl (dashed line). A: pH 7.4; B: pH 5.5. Figure shows two representative experiments.

in affinity between LDL(-) particles are, five LDL(-) subfractions with increasing PG affinity were collected using preparative affinity chromatography (Fig. 3A). Specifically, we collected two subfractions of the peak with low affinity (subfractions 1 and 2), one intermediate subfraction (subfraction 3), and two subfractions from the peak with high affinity (subfractions 4 and 5). These subfractions were analyzed for lipid and apolipoprotein content, enzymatic activities, aggregation level, and apoB-100 secondary structure.

Concerning the composition of LDL(-) particles (Table 2), subfractions with the highest PG affinity had increased triglyceride content and decreased apoB-100 content. Phospholipid content slightly decreased, but statistical significance was not reached. Despite the apoB-100 decrease, total protein did not change. No relationship between high PG affinity and NEFA or peroxide content was observed. Regarding the electronegative charge, the highest and lowest affinity subfractions presented similar electrophoretic mobility (Fig. 3B). Neither apoE nor apoC-III content was increased in the high-affinity subfractions (Fig. 4). In contrast, both apolipoproteins were elevated in the low-affinity subfractions, compared with those of



**Fig. 3.** A: LDL(-) subfractionation on a preparative affinity chromatography. LDL(-) (1.8 ml at 0.4 g/l) was injected on three PG-HiTrap columns in tandem and eluted with a linear gradient of NaCl (0–0.25 M). Five LDL(-) subfractions were collected between 30 mM and 125 mM NaCl with increasing affinity. Note that the volume of collected subfractions is different, because our aim was to collect two fractions of the peak with low affinity (subfractions 1 and 2), one intermediate fraction (subfraction 3), and two subfractions of the peak with high affinity (subfractions 4 and 5). Dashed line indicates NaCl gradient. B: Electronegative charge of LDL(+), total LDL(-), and LDL(-) subfractions. LDL negative charge was determined by agarose gel electrophoresis. The image is a representative experiment.



TABLE 2. Lipid and protein composition of LDL(+), total LDL(-), and LDL(-) subfractions (n = 5)

	LDL(+)	LDL(-)	LDL(-) subfractions				
			1	2	3	4	5
			<i>mmol/g protein</i>				
Cholesterol	4.69 ± 0.22	4.64 ± 0.06	4.59 ± 0.10	4.62 ± 0.15	4.51 ± 0.16	4.55 ± 0.11	4.51 ± 0.11
Phospholipid	1.76 ± 0.21	1.64 ± 0.24	1.63 ± 0.25	1.63 ± 0.20	1.58 ± 0.22	1.56 ± 0.22	1.47 ± 0.22
Triglyceride	0.38 ± 0.02	0.41 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.04	0.42 ± 0.10	0.46 ± 0.08	0.51 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.03 <sup>b</sup>
			<i>μmol/g protein</i>				
NEFA,	31.7 ± 15.7	63.3 ± 20.7 <sup>a</sup>	50.7 ± 17.6	54.2 ± 17.4	49.3 ± 19.8	48.6 ± 16.5	53.4 ± 22.0
ApoB-100	1.99 ± .019	1.78 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.12	1.78 ± 0.12	1.75 ± 0.13	1.74 ± 0.12	1.55 ± 0.09 <sup>c</sup>
Peroxides	4.7 ± 4.4	5.1 ± 4.9	6.4 ± 2.4	6.7 ± 3.5	6.8 ± 1.3	5.6 ± 3.0	5.7 ± 4.5

Results are mean ± SD. ApoB-100, apolipoprotein B-100.

<sup>a</sup> *P* < 0.05 versus LDL(+).

<sup>b</sup> *P* < 0.05 versus LDL(-) 1 subfraction.

<sup>c</sup> *P* < 0.05 versus LDL(-) 2 subfraction.

higher affinity. Moreover, to verify the involvement of apoE in LDL(-) PG affinity assay, LDL(-) was subfractionated to apoE-rich and apoE-poor LDL populations using anti-apoE immunoaffinity chromatography. The PG

affinity of these subpopulations was analyzed, and the data demonstrated that apoE-rich LDL(-) bound with lower affinity to PG than did apoE-poor LDL(-) (Fig. 5). Thus, the results of both experiments support the idea that the enhanced affinity of an LDL(-) subpopulation does not depend on increased apoE content.

We also evaluated the distribution of enzymatic activities that are increased in LDL(-). No difference in PAF-AH activity was observed between LDL(-) subfractions (Fig. 6A). In contrast, dramatic differences were observed in LDL(-) subfractions regarding their phospholipase C (PLC)-like activities. As shown in Fig. 6B, C, the higher the PG affinity, the higher the LysoPLC and SMase activities as measured by the Amplex Red method. To corroborate these results, SMase activity was also determined by evaluating the degradation of BODIPY-SM to BODIPY-ceramide and lipid separation by TLC (Fig. 6D). In accordance with the Amplex Red data, LDL(-) subfractions with higher PG affinity demonstrated increased BODIPY-ceramide formation, indicating elevated SMase activity.

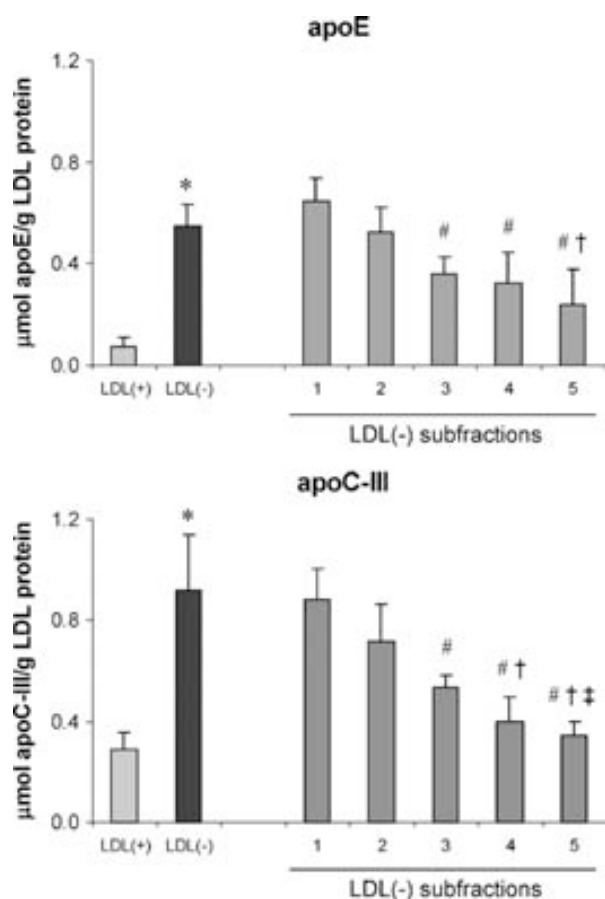


Fig. 4. Apolipoprotein E (apoE) and apoC-III content in LDL(+), total LDL(-), and LDL(-) subfractions. LDL(-) was subfractionated depending on its PG affinity (see Fig. 3A). ApoE and apoC-III were determined as described in Materials and Methods. Results are the mean ± SD of five independent experiments. \* *P* < 0.05 versus LDL(+); # *P* < 0.05 versus LDL(-) 1 subfraction; † *P* < 0.05 versus LDL(-) 2 subfraction; ‡ *P* < 0.05 versus LDL(-) 3 subfraction.

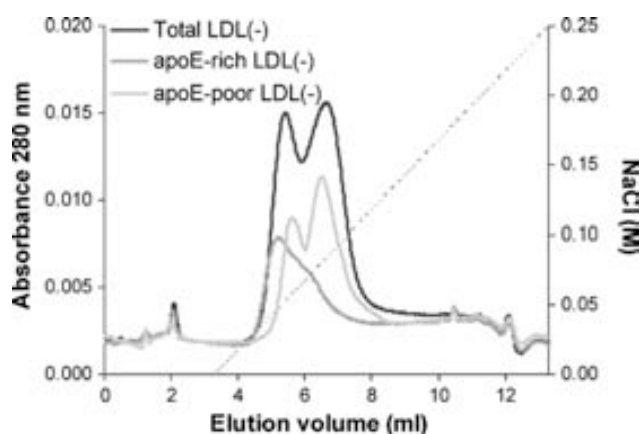
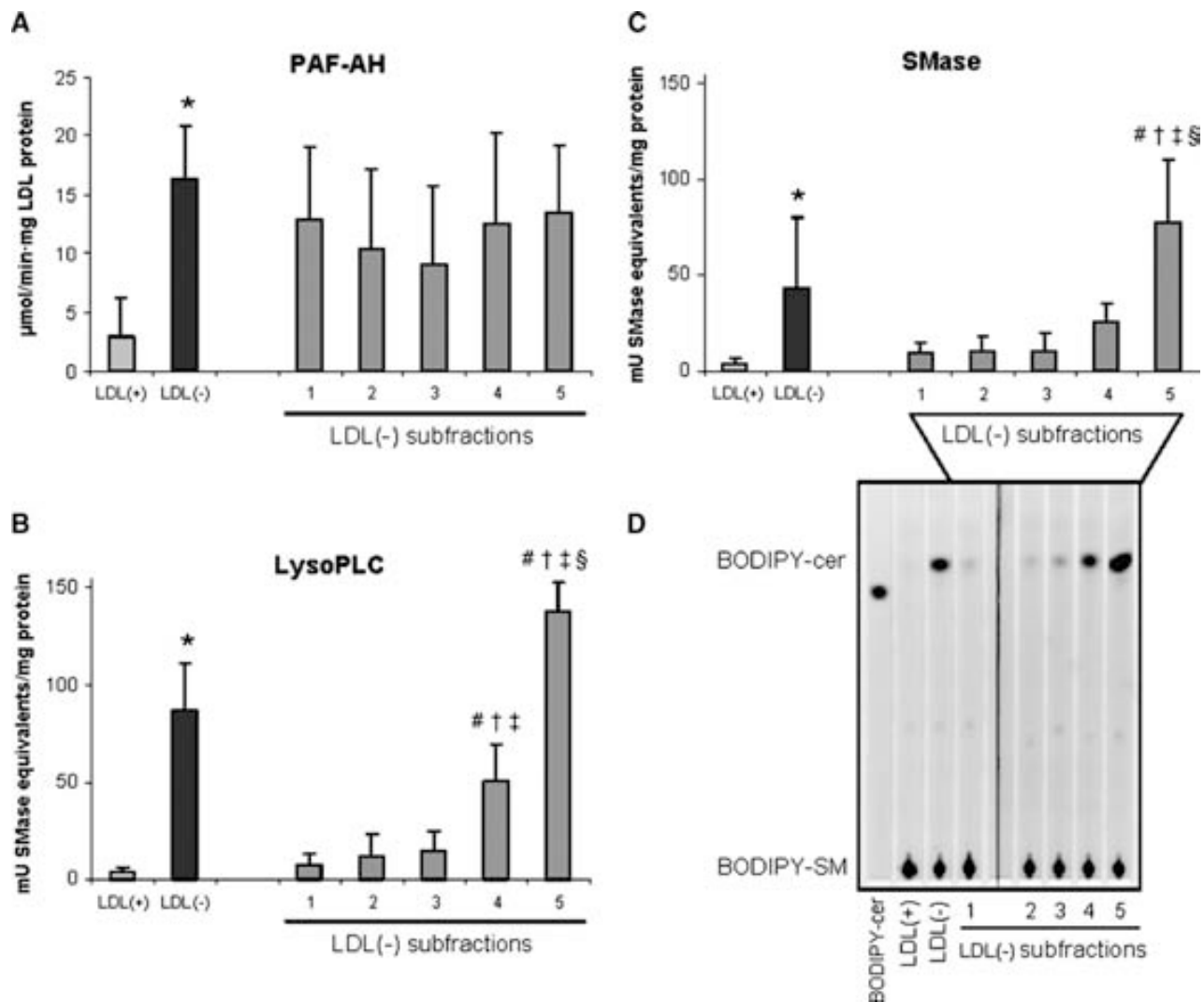


Fig. 5. Analytical PG affinity chromatography of apoE-rich LDL(-) and apoE-poor LDL(-). ApoE-rich and apoE-poor LDL(-) subfractions were obtained by anti-apoE immunoaffinity chromatography, as described in Materials and Methods. Samples were concentrated and injected in the PG analytical affinity chromatography column. Figure shows a representative experiment. Dashed line indicates NaCl gradient.



**Fig. 6.** Enzymatic activities of LDL(+), total LDL(-), and LDL(-) subfractions. LDL(-) was subfractionated depending on its PG affinity (see Fig. 3A). Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) (A), lysophospholipase C (LysoPLC) (B), and SMase (C) activities were measured by commercial colorimetric and fluorimetric methods, as described in Materials and Methods. SMase activity was also determined by degradation of BODIPY-SM to BODIPY-ceramide (BODIPY-cer) and lipid separation by TLC (D). Results are the mean  $\pm$  SD of five independent experiments. The TLC image is representative of three independent experiments. \*  $P < 0.05$  versus LDL(+); #  $P < 0.05$  versus LDL(-) 1 subfraction; †  $P < 0.05$  versus LDL(-) 2 subfraction; ‡  $P < 0.05$  versus LDL(-) 3 subfraction; §  $P < 0.05$  versus LDL(-) 4 subfraction.

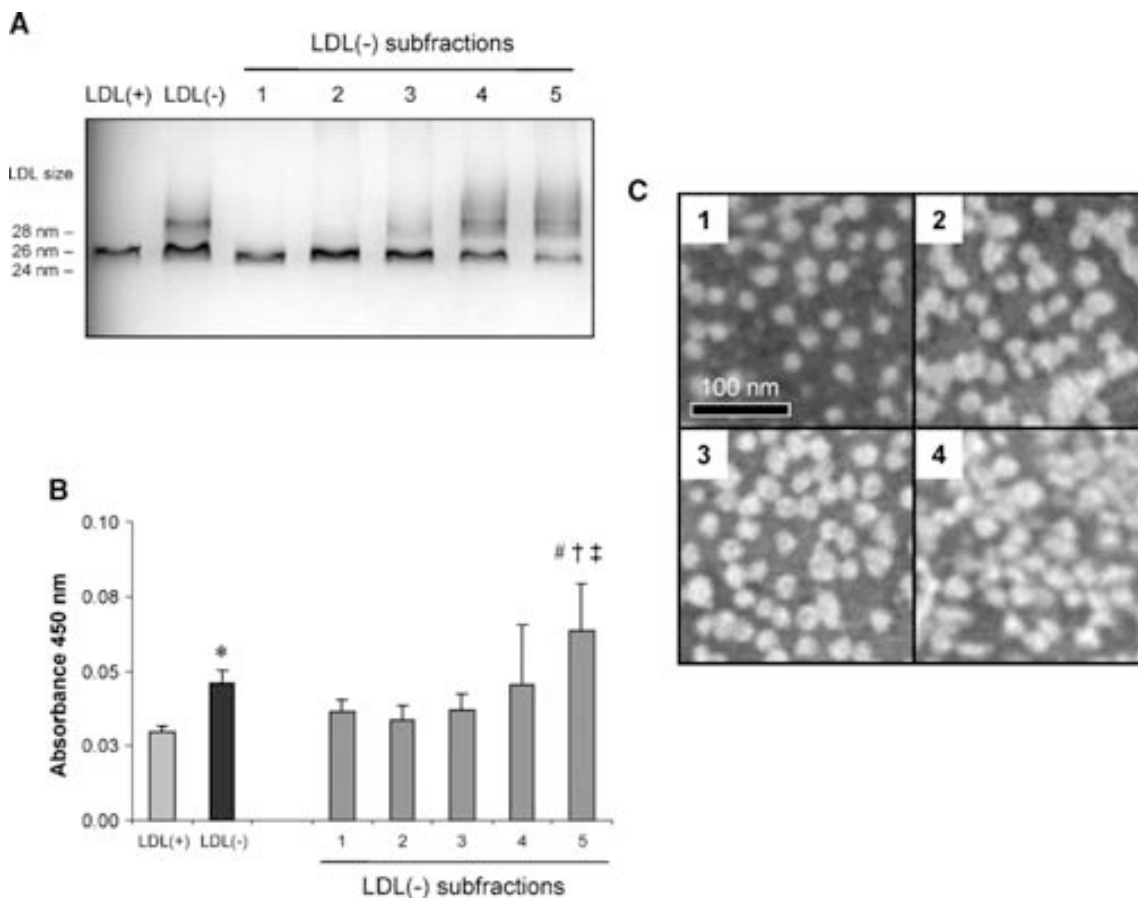
The relationships between SMase and PLC activity and aggregation and fusion of lipoproteins were reported in earlier studies (35–38). This also motivated us to evaluate the aggregation of LDL(-) subfractions. Our results showed that, in LDL(-) subfractions, aggregation level is directly related to its PG affinity. **Figure 7A** shows that subfractions 4 and 5 displayed bands migrating to a position with higher size. This observation fully agrees with the increased absorbance measured at 450 nm (Fig. 7B). Furthermore, differences in aggregation of the particles were also seen on transmission electron microscopy (Fig. 7C). As shown in panel 1, individual LDL(+) particles can be clearly recognized. Compared with LDL(+), LDL(-) particle size was heterogeneous, and aggregated particles were observed (panel 2). LDL(-), with the lowest PG affinity (subfraction 1), contained less aggregated par-

ticles than the LDL(-) subfraction displaying the highest PG affinity (subfraction 5) (panels 3 and 4, respectively), thereby supporting the results obtained from GGE analysis and absorbance measurements at 450 nm.

The possibility that differences in PG binding affinity among LDL(-) subfractions could be due to changes in apoB-100 structure was studied by circular dichroism. Two independent experiments were performed. All subfractions presented similar proportions of secondary structures (see supplementary Fig. I and supplementary Table I).

## DISCUSSION

Growing evidence supports the concept that subendothelial retention of atherogenic lipoproteins is the initi-



**Fig. 7.** Aggregation of LDL(+), total LDL(-), and LDL(-) subfractions. LDL(-) was subfractionated depending on its PG affinity (see Fig. 3A). Aggregation was determined by: nondenaturing acrylamide gradient gel electrophoresis (GGE) (A), measuring absorbance at 450 nm (B), and electron microscopy (C). A: The GGE image shows a representative experiment. B: Results are the mean  $\pm$  SD of five independent experiments. C: Samples were prepared for negative-staining electron microscopy, as described in Materials and Methods. Panel 1, LDL(+); panel 2, LDL(-); panel 3, low-affinity LDL(-) subfraction (subfraction 1); panel 4, high-affinity LDL(-) subfraction (subfraction 5). \*  $P < 0.05$  versus LDL(+); #  $P < 0.05$  versus LDL(-) 1 subfraction; †  $P < 0.05$  versus LDL(-) 2 subfraction; ‡  $P < 0.05$  versus LDL(-) 3 subfraction.

ating event in atherosclerosis. As the response-to-retention hypothesis suggests, the retention of lipoproteins to extracellular matrix is followed by their oxidative or enzymatic modification, leading to inflammation and endothelial dysfunction in the vessel wall (4, 39). LDL(-) is a modified subfraction of LDL with increased atherogenicity present in blood plasma. Current results demonstrate that compared with LDL(+), LDL(-) presents increased binding affinity to arterial PGs, the main component of the subendothelial extracellular matrix. This property would favor LDL(-) retention in the superficial PG-rich layer of the arterial intima. As a consequence, the retained LDL(-) particles could contribute, even more severely than LDL(+), to the progression of atherosclerotic lesions because other atherogenic properties such as the induction in cultured endothelial cells of cytotoxicity, apoptosis, or cytokine release have been reported (15, 16).

Binding affinity of LDL(-) to GAGs and to PGs was determined. The highest LDL(-) affinity was to the GAG chondroitin-6 sulfate, which forms part of the versican-like PGs, the most abundant PGs of the intimal extracellular

space. Our preparation of PGs isolated from human aortas contained more than 50% chondroitin-6 sulfate, around 25% chondroitin-4 sulfate, and 20% dermatan sulfate. Furthermore, the content of chondroitin sulfate-PGs increases with the progression of lesion size (40), which might favor LDL(-) retention. It should be noted that LDL(+) also had higher affinity to chondroitin-6 sulfate compared with dermatan sulfate or heparan sulfate. Similar results were obtained by Olsson et al. (41), who reported that LDL(+) binds preferentially to chondroitin sulfate and poorly to dermatan sulfate and heparan sulfate.

The analysis of LDL(-)-PG interaction by affinity chromatography at neutral pH demonstrated that LDL(-) consisted of two subpopulations, one with higher and one with lower PG binding affinity than LDL(+). It has been previously reported that although all LDL(-) particles have a negative charge, they are a mixture of heterogeneous particles having different sizes, density, and composition (21). This could explain why LDL(-) presents different degrees of PG affinity. At acid pH, both LDL(+) and LDL(-)

fractions bound to PGs more strongly than at neutral pH, as also reported by Sneek, Kovanen, and Oorni (26) with LDL(+). Analogously to the behavior of the particles at neutral pH, under acid conditions, a subpopulation of LDL(-) also presented greater affinity to PGs than LDL(+). These findings could be significant in more-advanced atherosclerotic lesions, which display drastic decreases in extracellular pH (42). This drop in pH is probably the result of the metabolic activity of macrophages in the lesion, because they acidify their surroundings by extruding hydrogen ions (43) or, in more advanced lesions under hypoxia, macrophages secrete lactate that locally decreases the extracellular pH (44). Interestingly, the LDL(-) subpopulation with lower PG affinity than LDL(+) at neutral pH showed the same affinity as LDL(+) at acidic pH. Thus, the extracellular acidification of atherosclerotic lesions could amplify the deleterious effects of LDL(-), which may play a role in advanced atherosclerotic lesions, with compartments having acidic extracellular fluid.

Because the main characteristic of LDL(-) is its increased electronegative charge, it was expected to have a reduced interaction with the negatively charged sulfate and carboxyl groups on PGs. However, as revealed by agarose gel electrophoresis, our results show that LDL(-) particles with the lowest affinity to PGs (subfraction 1) present electrophoretic mobility similar to those with the highest affinity (subfraction 5). Therefore, particle electronegative charge is not a limiting factor of all LDL(-) particle interaction with PGs, apparently because it can be counteracted by other particle properties that favor the PG interaction. Among the components of LDL(-) that could be involved in counteracting the electronegativity in LDL(-)-PG interaction is its increased content in two apolipoproteins, apoE and apoC-III. ApoE has two binding sites for heparin and mediates the binding of remnant lipoproteins to PGs (45, 46). However, our data indicate that the LDL(-) subfractions with the lowest affinity to PG had increased apoE content. Moreover, apoE-enriched LDL(-) also presented lower affinity to PG than apoE-poor LDL(-). These findings suggest that apoE does not play a major direct role in the increased binding of LDL(-) to arterial PGs. This apparent contradiction with the existing literature must be attributed to at least two facts. First, the content of apoE in LDL(-) is much lower (on average, less than 0.3 molecules of apoE per particle) (16, 20) than that of remnant lipoproteins (several molecules per particle) (14); and second, apoE presents high affinity for heparin and heparan sulfate, but its affinity for dermatan sulfate is moderate, and for chondroitin sulfate, very low (47). Indeed, the PGs isolated from human aorta were composed mainly of chondroitin sulfate, and had only low amounts of dermatan sulfate and no heparan sulfate. Regarding apoC-III, this apolipoprotein may modulate the binding between PGs and apoB- or apoE-containing lipoproteins (14) without binding directly to PGs. The content of apoC-III in LDL(-) is very low (on average, less than 0.3 molecules per particle), and our results indicate that its role is negligible in the binding of LDL(-) to PGs. Therefore, increased LDL(-) binding to PGs should

be attributed to factors other than particle-attached apoE or apoC-III.

Current data suggest that lipoprotein aggregation may be the cause of enhanced LDL(-) binding affinity to PGs. Indeed, our results clearly show that LDL(-) subfractions with increased affinity to PGs present an increased tendency to aggregation. It is known that aggregated and fused particles bind to PGs more tightly than LDL(+) (11, 48). This increased binding of aggregated LDL can be explained by spatial arrangements of apoB-100, the existence of multiple apoB-100 molecules per LDL aggregate, or both. Lipolysis by SMase or sPLA<sub>2</sub> promotes aggregation of LDLs and increases their binding affinity to PGs. PLC-mediated lipolysis also promotes LDL aggregation (49) and enhances the binding to PGs (Öörni K., unpublished observation). Our group previously reported that intrinsic PLC and SMase activity in LDL(-) promotes self-aggregation (30). Thus, the present data suggest relationships among PLC-like enzymatic activity, aggregation level, and PG binding affinity of LDL(-) subfractions. Increased PLC-like activity can alter LDL lipid composition, thereby promoting particle aggregation and binding to PGs. PLC-like activity hydrolyzes sphingomyelin, phosphatidylcholine, and lysophosphatidylcholine molecules in LDL(-) particles, yielding phosphorylcholine, which is released, and ceramide, diacylglycerol, and monoacylglycerol that are retained in the particle. The increase in these hydrophobic molecules causes aggregation (50) because the ceramide-, diacylglycerol-, and monoacylglycerol-enriched domains act as nonpolar targets on the particle surface and lead initially to particle aggregation.

LDL(-) subfraction composition supports this assumption. LDL(-) subfractions with the highest affinity displayed slightly decreased phospholipid content, whereas triglycerides were increased. It is possible that a triglyceride increase could be related to the enzymatic method used to determine its amount. Thus, in addition to triglycerides, di- and monoacylglycerol are also measured in the assay. Therefore, increased PLC-like activity would be expected to increase the amounts of glycerides in the samples. On the other hand, the apparent apoB-100 content, based on immunodetection, slightly decreased in the highest affinity LDL(-) subpopulation, whereas total protein did not change. This suggests loss of apoB-100 immunoreactivity due to conformational changes. These results concur with the data of Flood et al. (10), who suggested that alterations in the phospholipid composition of lipolyzed LDL induce conformational changes in apoB-100. Thus, these changes may either expose some shielded PG binding regions in apoB-100 or bring positively charged regions of apoB-100 into proper or closer proximity to establish a new PG binding site, other than site B (residues 3,359–3,369), which is the functional PG binding site in LDL(+) (51). In the case of sPLA<sub>2</sub>-modified LDL with increased affinity to PGs (52, 53), it has been reported that sPLA<sub>2</sub> lipolysis leads to exposure of site A (residues 3,148–3,158) in apoB-100, which in LDL(+) is a nonfunctional PG binding site, thereby enabling it to act cooperatively with site B (10). Thus, bringing site A closer to site B

would enhance the interaction with PGs (54). Whether site A is exposed and functional in LDL(-) subpopulations remains to be established in future studies.

Taken together, the present results suggest that increased PLC-like activity could alter LDL lipid composition, thereby increasing particle aggregation that causes enhanced binding to PGs. This propensity of LDL(-) to interact with PGs could facilitate its retention in the extracellular matrix of the arterial intima and contribute to the progression of atherosclerosis. ■

The authors are grateful to Christine O'Hara for excellent editorial assistance.

## REFERENCES

1. Srinivasan, S. R., P. Vijayagopal, E. R. Dalferes, Jr., B. Abbate, B. Radhakrishnamurthy, and G. S. Berenson. 1986. Low density lipoprotein retention by aortic tissue. Contribution of extracellular matrix. *Atherosclerosis*. **62**: 201–208.
2. Hurt-Camejo, E., U. Olsson, O. Wiklund, G. Bondjers, and G. Camejo. 1997. Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans. Potential contribution to atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 1011–1017.
3. Camejo, G., E. Hurt-Camejo, O. Wiklund, and G. Bondjers. 1998. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*. **139**: 205–222.
4. Williams, K. J., and I. Tabas. 1995. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 551–561.
5. Wight, T. N. 1995. The extracellular matrix and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **6**: 326–334.
6. Iverius, P. H. 1972. The interaction between human plasma lipoproteins and connective tissue glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **247**: 2607–2613.
7. Weisgraber, K. H., and S. C. Rall, Jr. 1987. Human apolipoprotein B-100 heparin-binding sites. *J. Biol. Chem.* **262**: 11097–11103.
8. Camejo, G., S. O. Olofsson, F. Lopez, P. Carlsson, and G. Bondjers. 1988. Identification of apo B-100 segments mediating the interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis*. **8**: 368–377.
9. Cardin, A. D., and H. J. Weintraub. 1989. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis*. **9**: 21–32.
10. Flood, C., M. Gustafsson, R. E. Pitas, L. Arnaboldi, R. L. Walzem, and J. Boren. 2004. Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 564–570.
11. Oorni, K., M. O. Pentikainen, M. Ala-Korpela, and P. T. Kovanen. 2000. Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions. *J. Lipid Res.* **41**: 1703–1714.
12. Asatryan, L., R. T. Hamilton, J. M. Isas, J. Hwang, R. Kaye, and A. Sevanian. 2005. LDL phospholipid hydrolysis produces modified electronegative particles with an unfolded apoB-100 protein. *J. Lipid Res.* **46**: 115–122.
13. Mahley, R. W., K. H. Weisgraber, and T. L. Innerarity. 1979. Interaction of plasma lipoproteins containing apolipoproteins B and E with heparin and cell surface receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* **575**: 81–91.
14. Olin-Lewis, K., R. M. Krauss, M. La Belle, P. J. Blanche, P. H. Barrett, T. N. Wight, and A. Chait. 2002. ApoC-III content of apoB-containing lipoproteins is associated with binding to the vascular proteoglycan biglycan. *J. Lipid Res.* **43**: 1969–1977.
15. Sanchez-Quesada, J. L., S. Benitez, and J. Ordonez-Llanos. 2004. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**: 329–335.
16. Demuth, K., I. Myara, B. Chappey, B. Vedic, M. A. Pech-Amsellem, M. E. Haberland, and N. Moatti. 1996. A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**: 773–783.
17. Chen, C. H., T. Jiang, J. H. Yang, W. Jiang, J. Lu, G. K. Marathe, H. J. Pownall, C. M. Ballantyne, T. M. McIntyre, P. D. Henry, et al. 2003. Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription. *Circulation*. **107**: 2102–2108.
18. Sanchez-Quesada, J. L., C. Ota-Entraigas, M. Franco, O. Jorba, F. Gonzalez-Sastre, F. Blanco-Vaca, and J. Ordonez-Llanos. 1999. Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* **84**: 655–659.
19. Sanchez-Quesada, J. L., A. Perez, A. Caixas, M. Rigla, A. Payes, S. Benitez, and J. Ordonez-Llanos. 2001. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**: 3243–3249.
20. De Castellarnau, C., J. L. Sanchez-Quesada, S. Benitez, R. Rosa, L. Caveda, L. Vila, and J. Ordonez-Llanos. 2000. Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 2281–2287.
21. Sanchez-Quesada, J. L., S. Benitez, C. Ota, M. Franco, F. Blanco-Vaca, and J. Ordonez-Llanos. 2002. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J. Lipid Res.* **43**: 699–705.
22. Sanchez-Quesada, J. L., M. Camacho, R. Anton, S. Benitez, L. Vila, and J. Ordonez-Llanos. 2003. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis*. **166**: 261–270.
23. Hurt-Camejo, E., G. Camejo, B. Rosengren, F. Lopez, O. Wiklund, and G. Bondjers. 1990. Differential uptake of proteoglycan-selected subfractions of low density lipoprotein by human macrophages. *J. Lipid Res.* **31**: 1387–1398.
24. Bartold, P. M., and R. C. Page. 1985. A microdetermination method for assaying glycosaminoglycans and proteoglycans. *Anal. Biochem.* **150**: 320–324.
25. Davidsson, P., J. Hulthe, B. Fagerberg, B. M. Olsson, C. Hallberg, B. Dahllof, and G. Camejo. 2005. A proteomic study of the apolipoproteins in LDL subclasses in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *J. Lipid Res.* **46**: 1999–2006.
26. Sneek, M., P. T. Kovanen, and K. Oorni. 2005. Decrease in pH strongly enhances binding of native, proteolyzed, lipolyzed, and oxidized low density lipoprotein particles to human aortic proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **280**: 37449–37454.
27. Oorni, K., M. O. Pentikainen, A. Annala, and P. T. Kovanen. 1997. Oxidation of low density lipoprotein particles decreases their ability to bind to human aortic proteoglycans. Dependence on oxidative modification of the lysine residues. *J. Biol. Chem.* **272**: 21303–21311.
28. Siggins, S., M. Jauhiainen, V. M. Olkkonen, J. Tenhunen, and C. Ehnholm. 2003. PLTP secreted by HepG2 cells resembles the high-activity PLTP form in human plasma. *J. Lipid Res.* **44**: 1698–1704.
29. Benitez, S., J. L. Sanchez-Quesada, V. Ribas, O. Jorba, F. Blanco-Vaca, F. Gonzalez-Sastre, and J. Ordonez-Llanos. 2003. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation*. **108**: 92–96.
30. Bancells, C., S. Benitez, S. Villegas, O. Jorba, J. Ordonez-Llanos, and J. L. Sanchez-Quesada. 2008. Novel phospholipolytic activities associated with electronegative low-density lipoprotein are involved in increased self-aggregation. *Biochemistry*. **47**: 8186–8194.
31. Holopainen, J. M., O. P. Medina, A. J. Metso, and P. K. Kinnunen. 2000. Sphingomyelinase activity associated with human plasma low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **275**: 16484–16489.
32. Forte, T., and A. V. Nichols. 1972. Application of electron microscopy to the study of plasma lipoprotein structure. *Adv. Lipid Res.* **10**: 1–41.
33. Lobley, A., and B. A. Wallace. 2001. DICHROWEB: a website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Biophys. J.* **80**: 373a.
34. Lobley, A., L. Whitmore, and B. A. Wallace. 2002. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics*. **18**: 211–212.
35. Xu, X. X., and I. Tabas. 1991. Sphingomyelinase enhances low density lipoprotein uptake and ability to induce cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J. Biol. Chem.* **266**: 24849–24858.
36. Pentikainen, M. O., E. M. Lehtonen, and P. T. Kovanen. 1996. Aggregation and fusion of modified low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **37**: 2638–2649.
37. Oorni, K., J. K. Hakala, A. Annala, M. Ala-Korpela, and P. T. Kovanen. 1998. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles. Two distinct mechanisms leading to increased binding

- strength of LDL to human aortic proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **273**: 29127–29134.
38. Suits, A. G., A. Chait, M. Aviram, and J. W. Heinecke. 1989. Phagocytosis of aggregated lipoprotein by macrophages: low density lipoprotein receptor-dependent foam-cell formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 2713–2717.
39. Williams, K. J., and I. Tabas. 1998. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr. Opin. Lipidol.* **9**: 471–474.
40. Volker, W., A. Schmidt, and E. Buddecke. 1989. Cytochemical changes in a human arterial proteoglycan related to atherosclerosis. *Atherosclerosis.* **77**: 117–130.
41. Olsson, U., G. Ostergren-Lunden, and J. Moses. 2001. Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction. *Glycoconj. J.* **18**: 789–797.
42. Naghavi, M., R. John, S. Naguib, M. S. Siadaty, R. Grasu, K. C. Kurian, W. B. van Winkle, B. Soller, S. Litovsky, M. Madjid, et al. 2002. pH Heterogeneity of human and rabbit atherosclerotic plaques; a new insight into detection of vulnerable plaque. *Atherosclerosis.* **164**: 27–35.
43. Leake, D. S. 1997. Does an acidic pH explain why low density lipoprotein is oxidised in atherosclerotic lesions? *Atherosclerosis.* **129**: 149–157.
44. Bjornheden, T., M. Levin, M. Evaldsson, and O. Wiklund. 1999. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 870–876.
45. Weisgraber, K. H., S. C. Rall, Jr., R. W. Mahley, R. W. Milne, Y. L. Marcel, and J. T. Sparrow. 1986. Human apolipoprotein E. Determination of the heparin binding sites of apolipoprotein E3. *J. Biol. Chem.* **261**: 2068–2076.
46. Ji, Z. S., W. J. Brecht, R. D. Miranda, M. M. Hussain, T. L. Innerarity, and R. W. Mahley. 1993. Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 10160–10167.
47. Shuvaev, V. V., I. Laffont, and G. Siest. 1999. Kinetics of apolipoprotein E isoforms-binding to the major glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *FEBS Lett.* **459**: 353–357.
48. Paananen, K., J. Saarinen, A. Annala, and P. T. Kovanen. 1995. Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles strengthen their binding to human aortic proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **270**: 12257–12262.
49. Liu, H., D. G. Scraba, and R. O. Ryan. 1993. Prevention of phospholipase-C induced aggregation of low density lipoprotein by amphipathic apolipoproteins. *FEBS Lett.* **316**: 27–33.
50. Schissel, S. L., J. Tweedie-Hardman, J. H. Rapp, G. Graham, K. J. Williams, and I. Tabas. 1996. Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins. *J. Clin. Invest.* **98**: 1455–1464.
51. Boren, J., I. Lee, W. Zhu, K. Arnold, S. Taylor, and T. L. Innerarity. 1998. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J. Clin. Invest.* **101**: 1084–1093.
52. Sartipy, P., G. Camejo, L. Svensson, and E. Hurt-Camejo. 1999. Phospholipase A(2) modification of low density lipoproteins forms small high density particles with increased affinity for proteoglycans and glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **274**: 25913–25920.
53. Sartipy, P., G. Bondjers, and E. Hurt-Camejo. 1998. Phospholipase A2 type II binds to extracellular matrix biglycan: modulation of its activity on LDL by colocalization in glycosaminoglycan matrixes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**: 1934–1941.
54. Camejo, G., U. Olsson, E. Hurt-Camejo, N. Baharamian, and G. Bondjers. 2002. The extracellular matrix on atherogenesis and diabetes-associated vascular disease. *Atheroscler. Suppl.* **3**: 3–9.

## SUPPLEMENTAL DATA.

Figure 1. Far-UV CD-spectra of LDL(-) subfractions. Spectra of LDL(-) subfractions were separated according their binding affinity to PGs. One representative experiment is shown. Samples were measured at 0.05 g/L of apoB using a 0.2 mm quartz cuvette at 25°C as described in Methods.

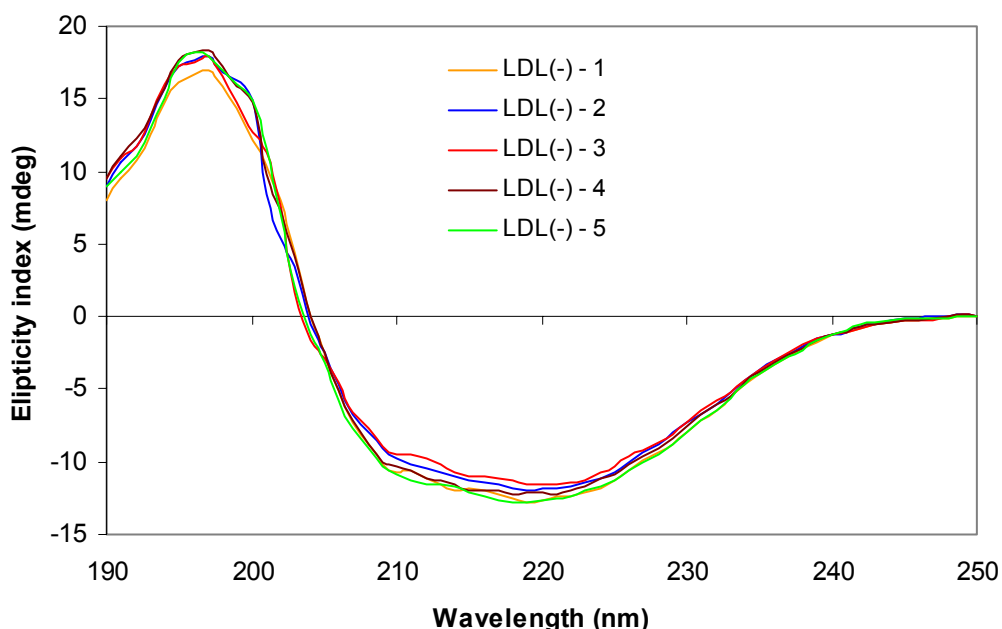


Table 1. CD spectra were deconvolved by the analysis program CDSSTR from the DICHROWEB server (Birkbeck University, London) to calculate the relative contribution of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turns, and random coil secondary structures) (1,2). Results are the mean $\pm$ SD of two independent experiments.

LDL(-) subfraction	$\alpha$ -helix (%)	$\beta$ -sheet (%)	$\beta$ -turn (%)	Random coil (%)
1	34.0 $\pm$ 2.8	29.0 $\pm$ 2.8	16.5 $\pm$ 2.1	20.5 $\pm$ 0.7
2	33.5 $\pm$ 2.1	27.0 $\pm$ 0.0	17.5 $\pm$ 0.7	22.0 $\pm$ 1.4
3	32.5 $\pm$ 0.7	27.0 $\pm$ 2.8	18.5 $\pm$ 0.7	22.0 $\pm$ 2.8
4	33.0 $\pm$ 2.8	29.0 $\pm$ 1.4	16.5 $\pm$ 0.7	21.5 $\pm$ 0.7
5	34.0 $\pm$ 1.4	27.5 $\pm$ 0.7	17.0 $\pm$ 1.4	21.5 $\pm$ 0.7

### References

1. Lobley, A., and Wallace, B. A. (2001) DICHROWEB: a website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *Biophys. J.* 80, 373a.
2. Lobley, A., Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2002) DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *Bioinformatics* 18, 211-212.

Bancells, C., S. Benítez, et al. (2006): pòster presentat al XIX congrés de la Societat Espanyola d'Arteriosclerosi, Santander 2006.

## EFECTO DEL CONTENIDO EN LISOFOSFATIDILCOLINA Y ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS DE LA LDL SOBRE LA LIBERACIÓN DE CITOQUINAS EN LEUCOCITOS

**Cristina Bancells, Sònia Benítez, José Luis Sánchez-Quesada, Jordi Ordóñez-Llanos.**  
**Servicio de Bioquímica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.**

### INTRODUCCIÓN

La LDL electronegativa (LDL(-)) es una fracción minoritaria de la LDL presente en el plasma con elevada actividad inflamatoria. Se ha descrito que induce la liberación de mediadores inflamatorios en células endoteliales, acción que parece ser mediada por su contenido aumentado en lisofosfatidilcolina (LPC) y ácidos grasos no esterificados (NEFA). Estudios recientes muestran que la LDL(-) induce también una mayor liberación de citoquinas en monocitos y linfocitos, pero no se conoce si este efecto es debido también al mayor contenido en LPC y NEFA.

### OBJETIVO

Modificar LDL aumentando su contenido en LPC y NEFA, y comprobar si estas partículas reproducen el comportamiento de la LDL(-). Para ello, incubar monocitos y linfocitos con las LDL modificadas y evaluar la producción de factores inflamatorios que son inducidos por la LDL(-).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se aisló la LDL a partir de plasmas de pacientes normolipémicos mediante ultracentrifugación. Se modificó la LDL por tratamiento enzimático con fosfolipasa secretora A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (a concentración de 10 y 20 µg/L) o por incubación con una mezcla de NEFA (a una concentración de 1 mmol/L).

Por otra parte, a partir de sangre periférica humana se aislaron monocitos y linfocitos en función de su densidad y capacidad de adhesión. Los dos tipos celulares fueron incubados durante 24 horas con las LDL modificadas y en los sobrenadantes celulares se valoró mediante ELISA la producción de las citoquinas IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, MCP-1, GROβ y GROγ que son las inducidas en estas células por la LDL(-). También se incubaron las células con lipopolisacárido (LPS, 0.1 mg/L) como control positivo de inflamación.

### RESULTADOS

El tratamiento con PLA<sub>2</sub> produjo un incremento de LPC y NEFA en la LDL, mientras que la incubación con NEFA sólo aumentó el contenido de estos compuestos en la partícula (Tabla 1). La LDL-PLA<sub>2</sub> a 20 µg/L reproduce aproximadamente la composición en LPC y NEFA de la LDL(-) (LPC: 57.8 ± 22.9 mol/mol apoB, NEFA: 30.7 ± 4.3 mol/mol apoB).

Tabla 1.

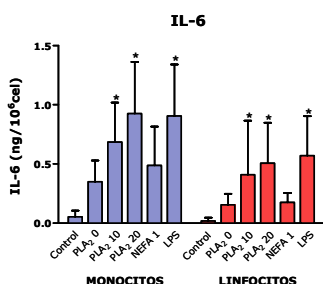
	LDL control	PLA <sub>2</sub> 10 µg/L	PLA <sub>2</sub> 20 µg/L	NEFA 1 mmol/L
NEFA *	2.2 ± 0.7	15.7 ± 2.1	36.2 ± 7.4	35.4 ± 13.7
LPC *	5.7 ± 1.2	35.7 ± 17.9	78.6 ± 25.2	ND
PL *	721.1 ± 93.2	680.3 ± 83.4	672.9 ± 49.0	ND

\* mol/mol apoB PL: fosfolípidos totales ND: no determinado. n=6

Las LDL modificadas indujeron en los leucocitos una mayor liberación que la LDL control de los factores evaluados relacionados con la inflamación (IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, MCP-1, GROβ y GROγ). Dicha inducción se produjo en diferente grado según el tipo celular y la citoquina evaluada.

En todas las citoquinas evaluadas la producción de los monocitos fue mayor que la de los linfocitos. En la Figura 1 se muestra como ejemplo representativo la liberación de IL-6.

Figura 1.



Los dos tipos de modificaciones de la LDL no afectaron por igual la inducción de las distintas citoquinas como se muestra en la Tabla 2 (incremento versus LDL control, restando la producción basal).

Las LDL cargadas con NEFA estimularon sólo la producción de GM-CSF (2.1 veces) en ambos tipos celulares y de IL-10 en linfocitos (1.7 veces) (Tabla 2). Esto indica que el incremento de NEFA en la LDL confiere un potencial inflamatorio moderado a estas partículas.

En contraste, el aumento de LPC combinado con el de NEFA, producido por el tratamiento con PLA<sub>2</sub>, produjo una estimulación dosis dependiente de IL-6, IL-10, GM-CSF, GROβ y GROγ en monocitos (incrementando de 1.3 a 3.8 veces), y de IL-6, GROβ y GROγ en linfocitos (de 2.0 a 4.2 veces) (Tabla 2), niveles parecidos a los inducidos por la LDL(-) (datos no presentados). Esto sugiere que el aumento de LPC incrementa sensiblemente la capacidad inflamatoria de la LDL, comparado con el efecto aislado de los NEFA. Por lo tanto, el caso más frecuente fue que la modificación con PLA<sub>2</sub> indujo una mayor liberación de citoquinas, como se muestra en la Figura 1.

Finalmente, IL-8 y MCP-1 no aumentaron significativamente en respuesta a LPC o NEFA en ninguno de los tipos celulares (Tabla 2).

Tabla 2.

MONOCITOS	PLA <sub>2</sub> 10 µg/L	PLA <sub>2</sub> 20 µg/L	NEFA 1 mmol/L
IL-6 #	2.5 ± 1.4 *	3.8 ± 2.3 *	1.0 ± 0.5
IL-8 #	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.5
IL-10 #	1.7 ± 1.3 *	1.4 ± 0.8	1.5 ± 0.8
GM-CSF #	3.4 ± 2.4 *	3.5 ± 3.2 *	2.1 ± 0.7 *
MCP-1 #	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.3	1.4 ± 0.7
GROβ #	1.5 ± 0.3 *	1.7 ± 0.5 *	1.2 ± 0.6
GROγ #	1.3 ± 0.1 *	1.7 ± 0.7 *	1.1 ± 0.3

LINFOCITOS	PLA <sub>2</sub> 10 µg/L	PLA <sub>2</sub> 20 µg/L	NEFA 1 mmol/L
IL-6 #	2.6 ± 1.1 *	4.2 ± 2.4 *	1.2 ± 0.7
IL-8 #	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.3
IL-10 #	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.6	1.7 ± 1.3 *
GM-CSF #	1.4 ± 0.7	1.4 ± 0.8	2.1 ± 1.1 *
MCP-1 #	1.1 ± 0.7	0.9 ± 0.4	1.1 ± 0.3
GROβ #	2.4 ± 0.9 *	2.6 ± 0.7 *	1.5 ± 0.8
GROγ #	2.0 ± 0.8 *	2.2 ± 0.9 *	0.9 ± 0.4

# Incremento respecto LDL-PLA<sub>2</sub> 0 \*p<0.05 n=6

### CONCLUSIÓN

Estos resultados indican que un aumento del contenido en LPC y NEFA en la LDL induce un efecto inflamatorio diferencial sobre los monocitos y linfocitos, estimulando cada uno de estos compuestos la producción de distintas citoquinas.

En consecuencia, los datos sugieren que la actividad inflamatoria de la LDL(-) sobre los leucocitos en parte podría ser debida a su contenido aumentado en NEFA y especialmente en LPC. Sin embargo, deben haber otras diferencias físico-químicas en la partícula que le confieren actividad proinflamatoria, dado que moléculas claramente inducidas por la LDL(-), como son IL-8 y MCP-1, no son estimuladas por las LDL modificadas por PLA<sub>2</sub> y/o NEFA.