

DISCUSSIÓ

ANTECEDENTS SOBRE L'ESTUDI DE L'LDL ELECTRONEGATIVA

Nombroses evidències indiquen que la forma oxidada d'LDL està implicada en el procés ateroscleròtic. Aquest fet queda palès en múltiples estudis "in vitro" que demostren que els productes d'oxidació de l'LDL intervenen a diferents nivells a l'origen i desenvolupament de la placa ateromatosa (Steinberg 1989, Witztum 1993, Berliner 1995). També s'ha comprovat que el fet de tenir una LDL més susceptible a l'oxidació s'associa a major risc cardiovascular (veure introducció 5.2.4).

La hipòtesi de l'existència d'una forma d'LDL modificada a circulació és força atractiva. Tanmateix, tradicionalment es descartava la presència plasmàtica d'LDL oxidada (van Berkel 1991, de Rijke 1992), però han sorgit diverses evidències que recolzen la idea d'LDL modificada a circulació. D'una banda, l'existència plasmàtica d'autoanticossos en front a LDL oxidada (Salonen 1992, Maggi 1994) o productes lipídics oxidats (Yagi 1987). A més, s'ha detectat LDL oxidada a circulació mitjançant anticossos antiLDLox i antiMDA-LDL (Holvoet 1995). Finalment, s'ha descrit la presència d'una forma d'LDL plasmàtica amb major càrrega negativa, anomenada LDL electronegativa.

L'LDL electronegativa és una forma modificada d'LDL present a circulació, la qual es troba augmentada en patologies com la hipercolesterolèmia i la diabetis, i produeix citotoxicitat en cultius de cèl.lules endotelials. Varis autors han aïllat aquesta fracció d'LDL electronegativa, mitjançant cromatografia de bescanvi aniónic, amb l'objectiu d'estudiar les seves propietats. L'estudi de la partícula ha aportat molts resultats contradictoris, dificultant la coneixença del seu origen, característiques fisicoquímiques i relevància fisiopatològica. Aquestes discrepàncies estan comentades més detalladament a la introducció. Respecte a l'origen de la partícula, hi han dues tendències: considerar l'LDL electronegativa

com a una forma oxidada (Cazzolato 1991, Avogaro 1991, Sevanian 1995, 1996 i 1997) o, contràriament, com el resultat de l'existència d'altres diferències composicionals (Shimano 1991, Chappay 1995, Demuth 1996). A més de les característiques fisico-químiques, també existeix controvèrsia en el comportament d'aquesta partícula respecte a la forma electropositiva o nativa en la interacció amb els receptors cel·lulars, trobant resultats de igual (Shimano 1991), menor (Avogaro 1988) o major afinitat (Chappay 1995a, Demuth 1996) de la partícula pel rLDL, i de major (Holvoet 1995, Tertov 1995) o igual inducció (Avogaro 1988, Shimano 1991) en ésters de colesterol intracel·lular a través del receptor scavenger.

És difícil donar una explicació conciliadora a tots els resultats discrepants en la caracterització de l'LDL electronegativa. Com s'ha comentat a la introducció, pot ser conseqüència de diferències metodològiques, com el tipus de gradient salí utilitzat o l'ús de diferents concentracions d'EDTA al tampó. Altra causa pot ser l'heterogeneïtat a les poblacions a partir de les quals es va aïllar la fracció electronegativa, com suggereixen alguns dels resultats de la present tesi. En el present treball de tesi doctoral s'ha aprofundit en el caracterització fisico-química i funcional de l'LDL electronegativa procedent d'individus normolipèmics (NL) i d'hipercolesterolèmics familiars (HF). El motiu de l'estudi en els dos tipus d'individu és que, tal i com suggereixen els diferents resultats dels grups quant a la caracterització de l'LDL electronegativa, aquesta partícula deu ser heterogènia i, per tant, presentarà diferents característiques depenent del tipus d'individu del qual s'aïlli.

Nota:

En aquesta discussió s'anomenarà com a LDL electronegativa la partícula en general, i, en canvi es citarà com a LDL(-) la partícula aïllada i caracteritzada amb la metodologia desenvolupada pel nostre grup.

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

A.1 PROPORCIÓ LDL(-)

El percentatge d'LDL electronegativa en els individus NL va ser del 2-10% (n=51), mentres que en HF va correspondre entre 6-17% del total de l'LDL (n=31). La quantitat d'LDL electronegativa en NL coincideix amb el rang de valors trobats per altres autors, malgrat que la coincidència no és total, ja que no hi ha consens respecte a un valor concret. El grup d'Avogaro va obtenir un percentatge del 1-5% i el de Moatti 3-10%, mentres que el de Shimano (Shimano 1991) va descriure valors de menys de l'1% del total de l'LDL. Com indica el treball d'aquest últim autor, la proporció de la partícula vindrà determinat pel sistema cromatogràfic emprat, el tipus de gradient salí (continu o esglaonat) i la força iònica d'elució de les fraccions utilitzats. Els nostres resultats coincideixen més amb els de Moatti, degut probablement a que es va utilitzar el mateix mètode de separació per FPLC mitjançant un gradient de NaCl esglaonat.

La major proporció d'LDL electronegativa en HF ja havia estat descrita pel nostre grup en un treball anterior (Sánchez-Quesada 1999). També en un treball amb pacients amb dislipèmia IIa (Vedie 1998), que serien els equivalents als individus del nostre estudi, es descriu que la seva LDL presenta major mobilitat electroforètica i percentatge d'LDL electronegativa.

El resultat de major percentatge d'LDL(-) en HF es pot relacionar amb el fet de que en alguns treballs (Demuth 1996, Nyssönen 1996, Vedie 1998) es relaciona el percentatge d'LDL electronegativa amb factors de risc cardiovasculars tradicionals, com el colesterol total i el cLDL. En l'estudi previ del nostre grup es va

observar que el tractament amb simvastatina va disminuir considerablement el percentatge elevat de l'LDL(-) dels HF. El percentatge d'LDL electronegativa en HF obtingut en l'anterior treball (Sánchez-Quesada 1999) era considerablement més gran que el de la present tesi. Això és degut a diferències metodològiques (M.1.4), ja que en el treball experimental d'aquesta tesi l'aïllament va ser per mitjà de columna preparativa, mentre que, a l'altre estudi la separació tenia lloc per columna analítica. El fet d'utilitzar la columna preparativa va provocar l'aparició en els HF d'un segon pic cromatogràfic, posterior a l'HF-LDL(+), fracció que va ser anomenada HF-LDL(+)_{bis} (Figura R.2). Aquesta fracció no es va separar utilitzant la columna mono-Q, en la qual eluïa juntament amb l'HF-LDL(-), i per tant és aquesta l'explicació de que amb la columna analítica el percentatge de la fracció electronegativa fos superior que amb la columna de Q-Sepharosa. A més, la fracció HF-LDL(+)_{bis} va presentar característiques composicionals compreses entre l'HF-LDL(+) i l'HF-LDL(-), i també una mobilitat electroforètica intermitja entre les dues fraccions. Amb la finalitat de no complicar excessivament els experiments i degut a que l'HF-LDL(+)_{bis} no és una fracció pura, es va descartar aquesta fracció, i, en conseqüència, es van triar per als estudis subsegüents les dues fraccions més diferents respecte a la seva càrrega elèctrica.

Considerant que els individus HF presenten nivells augmentats d'LDL en circulació, ja que tenen disminuït el seu aclariment pel rLDL (Goldstein 1983), i que, a més, l'LDL electronegativa representa una proporció superior de l'LDL total que en els NL, es dedueix que els individus HF tenen un nivells força elevats d'aquesta partícula modificada. La presència d'una major proporció d'LDL(-) per part dels HF pot ser deguda a que l'LDL és aclarida més lentament i romà més temps a circulació, on és susceptible a sofrir modificacions que incrementin la seva càrrega elèctrica negativa.

A.2 ¿ÉS L'LDL(-) UN ARTEFACTE O CONSEQÜÈNCIA DE CONTAMINACIÓ AMB ALTRES LIPOPROTEÏNES?

Existeixen proves confirmatòries de que l'LDL electronegativa no és un artefacte ni el resultat de la contaminació per part d'altres lipoproteïnes. Ratificant la primera afirmació hi han alguns treballs previs (Cazzolato 1991, Vedie 1991). També nosaltres hem confirmat que l'LDL(-) no es genera durant el procés cromatogràfic (Figura R.1a i 1b), ja que la cromatografia de les dues fraccions per separat mostra la seva puresa. D'altra banda, altres resultats previs del nostre grup indiquen que l'LDL(-) no es forma degut a oxidació durant el seu aïllament ni pel procés d'ultracentrifugació, com demostra l'ús de BHT a l'aïllament (Córdoba-Porras 1996) i la separació de l'LDL mitjançant gel filtració enlloc de l'ultracentrifugació. A més, en un treball (Bittolo-Bon 1999) a partir de plasma s'aïllen subfraccions d'LDL amb diferent càrrega elèctrica mitjançant electroforesi capil·lar, i correlaciona una major proporció d'LDL de més càrrega elèctrica negativa amb major proporció d'LDL electronegativa. Totes aquestes dades demostren que l'LDL(-) no és un artefacte generat per l'aïllament i/o manipulació de les mostres.

També es va descartar que la presència de l'LDL(-) fos deguda a contaminació per part d'altres lipoproteïnes de major càrrega negativa. Per una part, l'apo CII i l'apoAI van ser indetectables en totes les fraccions. L'apoCII és pròpia de les partícules riques en TG i també està present en HDL, i l'apoAI és característica de l'HDL, per tant es pot descartar contaminació per part d'aquestes altres lipoproteïnes. També quedaria descartada la presència d'VLDL i d'Lp(a), lipoproteïnes que presenten major càrrega negativa que l'LDL, pel rang de densitat utilitzat per aïllar l'LDL, el qual va ser de 1.019-1.050 kg/L. A més, com l'VLDL presenta una grandària superior al tamany d'exclusió de la columna això ens assegura que no elueix amb l'LDL(-).

A.3 DENSITAT I GRANDÀRIA

Un dels aspectes en els quals hi ha cert consens entre els autors és el de que l'LDL electronegativa es distribueix preferentment en les fraccions més denses (Shimano 1991, Chappey 1995a, Demuth 1996, Sevanian 1996). Aquests estudis han estat realitzats amb poblacions normolipèmiques i, per tant, no s'ha avaluat si aquesta diferent densitat també és característica de l'LDL electronegativa aïllada a partir d'altres tipus d'individus, com, al nostre cas, els HF.

Els HF presenten una LDL total predominantment més gran i lleugera que els individus NL (Patsch 1982, Tilly-Kiesi 1991, Raal 1999), ja que aquests últims presenten preferentment una LDL de densitat intermitja (Chapman 1988). Hi han dades que indiquen que no només l'LDL petita i densa és més aterogènica, sinó que també l'LDL dels HF, de menor densitat i major grandària, presenta major aterogenicitat (Rudel 1985 i 1986, Campos 1995).

Per estudiar la densitat en la fracció electronegativa, en el nostre estudi es va separar l'LDL total d'individus NL i HF en sis subfraccions de densitat (LDL1 a LDL6), per mitjà d'ultracentrifugació en gradient de densitat. De cada subfracció es va determinar el percentatge d'LDL(-) avaluat per cromatografia de bescanvi aniónic i amb columna analítica (Figura R-3). En NL es van confirmar les troballes d'altres autors, de manera que en les subfraccions més denses (LDL4-6) el percentatge d'LDL(-) és molt superior que a les subfraccions més lleugeres. De fet, el 68% de l'LDL(-) d'NL es distribueix en les fraccions de major densitat. Tanmateix, els resultats són molt diferents en els individus HF, en els quals l'LDL electronegativa és majoritàriament lleugera, trobant un % d'LDL(-) en les subfraccions LDL4-6 de tan sols el 14%. Els resultats indiquen que, malgrat que en NL hi ha poca LDL densa, aquesta és majoritàriament electronegativa. En canvi, en

HF hi ha també poca LDL densa, i l'LDL(-) es troba distribuïda bàsicament entre les formes lleugeres.

L'origen de l'LDL gran i lleugera dels HF podria ser degut a que els seus precursors, l'VLDL i l'IDL, tenen un catabolisme enlentit (James 1989, Krauss 1987). Aquestes VLDL i IDL són partícules petites i denses, les quals podrien generar les LDL grans i de menor densitat dels HF. La menor densitat de l'HF-LDL(-) respecte a l'NL-LDL(-) podria tenir com a origen aquests precursors incorrectament metabolitzats d'HF, ja que, l'IDL petita i densa característica d'aquests individus (Krauss 1987, James 1989) podria donar lloc a la formació d'LDL(-) lleugera.

D'altra banda, com en l'LDL la densitat és un paràmetre que està vinculat amb la grandària, per determinar si la partícula també és heterogènia en el seu tamany es van realitzar electroforesis en gradient d'acrilamida en condicions no desnaturalitzants. En el cas de l'LDL(-) d'individus normolipèmics, s'observava al gel una banda de major migració, fet que ens indica que és una partícula més petita. En canvi, l'LDL(-) aïllada de subjectes HF presentava una banda amb igual migració que la seva respectiva fracció electropositiva. Val a dir, que l'LDL(-) d'HF, sempre, i la d'NL, en alguns casos, van presentar alguna banda de tamany més gran, superior a 30 nm. Una de les possibles causes d'aquest fenomen seria la formació d'agregats de la partícula, ja que l'LDL(-) és més susceptible a l'agregació, com s'ha indicat a resultats.

Com a conseqüència d'aquests resultats, es dedueix que l'NL-LDL(-) i l'HF-LDL(-) semblen ser dues partícules força diferents, almenys quant a grandària i densitat, ja que la d'NL és de petita grandària i densitat incrementada, mentres que la procedent d'HF és lleugera i de major tamany. Per tant, l'LDL(-) és heterogènia depenent del seu origen, sent possible que aquestes partícules presentin unes característiques diferents, degut a que la grandària i la densitat són dos factors

íntimament relacionats que determinaran el comportament de l'LDL en diferents aspectes, com la unió al proteoglicans, la susceptibilitat a l'oxidació o la interacció amb els receptors (I-4.3). D'altra banda, el fet que l'LDL(-) presenti una distribució preferencial en les fraccions més denses i més lleugeres estaria d'acord amb els resultats descrits per altres autors mitjançant electroforesi (Chapman 1988, LaBelle 1997, Lund-Katz 1998) que assenyalen que aquestes fraccions, denses i lleugeres, tenen major càrrega elèctrica negativa que l'LDL de densitat intermitja .

A.4 COMPOSICIÓ

Alguns estudis previs mostren una diferent composició de l'LDL electronegativa respecte a la forma nativa. En la present tesi s'ha avaluat la composició de les fraccions per descobrir trets diferencials de l'LDL(-), i per avaluar si existeixen divergències entre l'aïllada d'NL i d'HF. Com a resultat de l'estudi de la composició, es van observar algunes de les diferències composicionals ja descrites prèviament per a l'LDL electronegativa, i a més es van detectar d'altres diferents. També es van obtenir diferències de composició en l'LDL(-) depenent de si l'origen són individus NL o HF (Taula R-3).

Respecte a les diferències composicionals comunes en NL-LDL(-) i HF-LDL(-) en front a les seves respectives LDL(+), van presentar, de forma significativa, increment en el contingut en àcid siàlic, en les apoproteïnes apoCIII i apoE, en colesterol lliure, en triglicèrids, i en àcids grassos no esterificats, i disminució en el contingut d'apoB. A més d'aquestes diferències mencionades, l'HF-LDL(-) també presenta un menor contingut significatiu en fosfolípids respecte l'HF-LDL(+) i major en colesterol total i esterificat. Aquestes característiques diferencials en composició de l'HF-LDL(-), a més del menor contingut en apoB, podrien estar relacionades amb el fet de que, com indiquen els resultats trobats en els estudis de les

subfraccions de densitat, l'HF-LDL(-) es tracta d'una forma d'LDL de menor densitat. A més, l'LDL d'individus HF presenta més colesterol total i esterificat en ambdues fraccions respecte a les d'NL, potser indicant la predominància de partícules més lleugeres.

En referència a l'augment d'àcid siàlic, els resultats d'altres estudis són discrepants, de manera que alguns indiquen que l'LDL electronegativa és una forma desialitzada (Tertov 1995), i en canvi d'altres coincideixen amb les nostres dades de contingut augmentat en siàlic (Demuth 1996, Vedie 1998). L'augment en àcid siàlic pot ser atribuït al major contingut en apoE i apoCIII, les quals són formes sialitzades que presenten un màxim de 2 mols d'àcid siàlic per molècula (Zannis 1984 i 1986, Ito 1989). Tanmateix, l'augment en el contingut de siàlic no es pot justificar totalment pel percentatge augmentat en el contingut d'aquestes apoproteïnes, les quals, malgrat que es troben incrementades en front a la fracció electropositiva, representen un petit percentatge en el contingut global de la partícula. Fent la conversió molar, i considerant el màxim de siàlic en les apoE i apoCIII, la seva contribució al contingut de siàlic de la LDL(-) podria arribar a 1.5 mols. D'altra banda, la resta de l'enriquiment en siàlic podria provenir de la petita contaminació amb Lp(a) ja que l'apo(a) es troba altament sialitzada (7% de la masa total es àcid siàlic, refe). El càlcul de la aportació de la petita contaminació de Lp(a) en la LDL(-) oscil·la entre 1 i 4 mols, depenent de la grandària de la Lp(a) contaminat. Tanmateix, és poc probable que aquesta contaminació amb Lp(a) interferís en altres propietats de l'LDL(-) com la interacció amb receptors o la activitat inflamatòria. Així doncs, el augment de àcid siàlic podria ser conseqüència de la presència de apoE, apoCIII i Lp(a).

Per altra banda, també hi han dades contradictòries respecte a si l'àcid siàlic proporciona a l'LDL un increment de càrrega positiva (Tertov 1995) o negativa (Camejo 1985). De fet, desialitzant l'LDL "in vitro" amb neuraminidasa es pot

comprovar per electroforesi en agarosa que la pèrdua d'àcid siàlic proporciona un guany de càrrega positiva a la partícula (Camejo 1985), fet pel qual es pot deduir que un enriquiment en àcid siàlic provoca un increment en la proporció de l'LDL electronegativa, que coincideix amb les nostres dades.

Quant a la major presència d'apoCIII i apoE en l'LDL(-), els resultats coincideixen amb els del grup de Moatti (Chappey 1995, Demuth 1996, Vedie 1998). Aquest fenomen es va observar en tots els casos i, malgrat les grans desviacions observades, els valors trobats per les LDL(-) d'NL i HF coincideixen clarament amb els calculats a partir de les dades d'un recent treball de Campos et al (Campos 2001) on s'indica, al igual que reflexen els nostres resultats, que, contràriament al que es considerava tradicionalment, l'LDL pot contenir en petites quantitats apoCIII i apoE. A més, està descrit que les formes lleugeres i denses de l'LDL presenten major contingut en apoE que les de densitat intermitja (Chapman 1988). En el treball de Chapman també s'indica un major enriquiment en la fracció densa, fet que correspondria amb que l'LDL(-) d'NL (densa) també presenta més quantitat d'apoE que la d'HF (lleugera). D'altra banda, les dades indiquen, juntament amb les d'altre recent treball (Campos 2001) que l'HF-LDL(-) conté menys apoE i apoCIII que la d'NL, de manera que la major quantitat d'altres apos diferents de l'apoB en NL-LDL(-) podria contribuir en una petita part, juntament amb altres característiques com el menor contingut en colesterol, a la major densitat de la partícula respecte a la fracció d'HF. La conseqüència de l'increment en aquestes apoproteïnes diferents de l'apo B és un guany de càrrega negativa en l'LDL, podent ser aquest factor responsable en part de la formació de l'LDL(-) (Demuth 1996). De totes maneres, els valors d'aquestes no justifiquen l'origen de totes les partícules d'LDL(-), ja que, hipotetitzant que la presència de tan sols 1 única molécula d'apoE o apoCIII ja generés LDL(-), es podria atribuir a aquestes apoproteïnes l'origen de com a màxim el 70% de la fracció electronegativa per NL i del 30% per HF.

Respecte a la apoproteïna majoritària de l'LDL, l'apoB, es va observar una lleugera disminució en apoB de l'LDL(-) en front a l'LDL(+), concretament del 6% en NL i del 7% en HF. En general s'havia descrit en treballs previs un major contingut en proteïnes o una relació minvada colesterol/proteïna (Avogaro 1991, Cazzolato 1991, Vedie 1991, Shimano 1991, Sevanian 1996), que és contrari al nostre resultat. No obstant això, en els estudis mencionats es va valorar la proteïna total, mentres que en el nostre estudi s'ha quantificat apoB, i val a dir que en l'LDL estan associades altres proteïnes, com les apoCIII i apoE que es troben augmentades en l'LDL(-). D'altra banda, cal remarcar que es va avaluar el contingut en apoB per un mètode immune, de manera que si l'apoB de l'LDL electronegativa presenta un canvi conformacional (Parasassi 2001) també pot provocar una menor reactivitat amb l'anticòs. En principi, el menor contingut d'apoB en l'LDL(-) indicaria una densitat disminuïda de la partícula en front la forma nativa, que podria estar d'acord en el cas de l'HF-LDL(-), però no per la d'NL. Tanmateix, molts altres components de l'LDL influiran en en la densitat, com per exemple la presència d'altres proteïnes associades, diferents de l'apoB.

Respecte al colesterol lliure els treballs d'altres grups coincideixen en el seu major contingut en la fracció electronegativa (Avogaro 1991, Cazzolato 1991, Chappey 1995a, Nyysönen 1996). També hi ha acord en la major proporció de triglicèrids (TG) en la partícula (Chappey 1995a, Nyysönen 1996). A més, està descrit que l'LDL amb un major contingut en TG presenta un increment en la càrrega elèctrica negativa (Aviram 1988, McKeone 1993). En el nostre cas, l'increment en TG de l'LDL(-) respecte la seva LDL(+) va ser bastant marcat, del 18% en NL i del 36% en HF. El major augment observat en HF pot ser degut a que el contingut en HF-LDL(+) va ser significativament inferior respecte a NL. D'altra banda, el guany en TG no pot ser degut a contaminació amb VLDL, com s'ha explicat anteriorment.

S'ha descrit que els TG es troben preferentment associats a les subfraccions més lleugeres i més denses de l'LDL (LaBelle 1997), les quals presenten major càrrega elèctrica negativa, fet que estaria relacionat amb el major contingut en TG de les LDL(-) d'NL i HF. Aquesta relació també queda palesa pel fet que, tant en individus hipertriglicèrídèmics com en estudis en què s'enriqueix "in vitro" l'LDL en TG, es genera LDL petita i densa (Kleinman 1987, Kinoshita 1991, McKeone 1993, Chen 1994). Per tant, el major contingut en TG en NL-LDL(-) podria influir en la seva major densitat. Diferent seria el cas de l'HF-LDL(-), la qual està enriquida en TG i, no obstant això, és una forma més lleugera. Tanmateix és evident que en aquesta partícula existeixen altres components que intervenen alterant la seva densitat, com l'elevat contingut en colesterol. D'altra banda, es podria relacionar el major contingut en TG amb el de les apos CIII i E, ja que en un estudi "in vitro" l'enriquiment d'LDL en TG provoca una major unió a apoproteïnes intercanviables com l'apoE (Saito 1996). Quant a la major quantitat en TG i apoproteïnes es podria establir una relació en el seu origen, ja que la causa podria tractar-se d'una metabolització incompleta de la partícula d'IDL.

Apart de les diferències en composició abans mencionades, també es va observar una altra característica no descrita amb anterioritat de l'LDL(-): un elevat contingut en NEFA. Aquest augment en la quantitat de NEFA és la diferència composicional més marcada que s'obté en l'LDL(-), tant d'NL com d'HF, sent el seu contingut aproximadament el doble. Al igual que en el cas dels TG, s'ha descrit que l'LDL carregada amb NEFA presenta major mobilitat electroforètica en agarosa i major electronegativitat (Shafir 1958, Chung 1995, Braschi 1997), fet que també és confirmat en la present tesi en els estudis de càrrega "in vitro" d'LDL total amb una barreja de NEFA en proporció fisiològica. També, en un estudi "in vitro" en què es tracta l'LDL amb PLA2 i es provoca un guany de NEFA en la partícula, augmenta la mobilitat en gel d'agarosa, la qual s'elimina quan s'incuba amb albúmina (Kleinman 1988). A més, aquesta LDL tractada amb PLA2 també

presenta algunes característiques de composició semblants a l'LDL(-), com ara un contingut augmentat en CT i TG i disminuït en fosfolípids i proteïna. Aquestes observacions podrien tenir alguna relació amb el fet de que s'ha descrit activitat PLA2 associada a la fracció d'LDL (Parthasarathy 1990b).

Algunes situacions fisiològiques en què es produeix un augment de NEFA al plasma i que conjuntament també hi ha un increment en la proporció d'LDL(-) són l'exercici agut i la DMII (Benítez 2002, Sánchez-Quesada 2001). En conseqüència, l'increment en NEFA podria estar implicat en la generació d'LDL(-). En l'exercici agut, situació en què augmenta el percentatge d'LDL(-), s'ha comprovat que la característica més marcada en la LDL postexercici és el contingut augmentat en NEFA, de manera que es suggereix que en condicions en què quedés sobrepassada la capacitat de l'albumina, els NEFA es poden distribuir a altres molècules, com l'LDL, suggerint la implicació d'aquest component en la formació d'LDL(-). Altres situacions en què els NEFA en circulació es troben augmentats, però que no es coneix si això es relaciona amb un augment en l'LDL(-), poden ser l'analbuminèmia i la disfunció renal.

Per tant, resumint, s'observen diverses diferències composicionals entre les fraccions LDL(-) i les seves respectives LDL(+), i entre les fraccions provinents de subjectes NL i HF. En aquest aspecte és important incidir en que la composició alterada de l'LDL(-) pot afectar a la conformació de l'apoB. Per una banda, el canvis als components superficials de l'LDL afecten al nucli, i viceversa (Saito 1996), i, d'altra banda, l'apoB-100 està en contacte amb tots els lípids, de manera que els canvis en els constituents lipídics de la partícula, tant de la superfície com del nucli lipídic, a través o no de la modificació del tamany de la partícula, tindran influència en la conformació de l'apoB (Marcel 1987, Harduin 1993, Bañuelos 1995, Hevonoja 2000). A més, la composició de l'LDL està fortament relacionada amb la densitat i grandària de la partícula, propietats que també influeixen en la

conformació de l'apoB (Chapman 1988, McNamara 1996). Aquestes possibles alteracions a la conformació determinaran el metabolisme i funció de la partícula, provocant una diferent interacció amb els receptors cel·lulars i susceptibilitat a l'oxidació, aspectes que es tractaran a continuació.

A.5 FRACCIÓ HF-LDL(+)^{bis}

Referent al tema de la composició de la fracció d'HF-LDL(+)^{bis} es va trobar que les seves característiques eren intermitges, presentant un comportament entre les fraccions HF-LDL(+) i HF-LDL(-) en la majoria dels components lipídics i apoproteics, però diferint més de la fracció electronegativa que de l'HF-LDL(+). Aquests resultats trobats són esperables, ja que l'LDL és una partícula heterogènia, presentant un ampli ventall quant a grandària, càrrega, o composició (Capell 1996, McNamara 1996, Packard 1997). En conseqüència, dins de l'LDL(+) i LDL(-) no s'engloben partícules amb exactament la mateixa càrrega, sinó que també hi ha tot un rang de partícules amb diferent electronegativitat, que poden eluir en una fracció o una altra, segons les característiques cromatogràfiques del mètode. Per tant, és esperable que, ja que LDL(+) i LDL(-) divergeixen considerablement en composició, una forma amb càrrega intermitja també presenti diferències composicionals. L'HF-LDL(+)^{bis} conté una major quantitat que HF-LDL(+) i menor que HF-LDL(-) en colesterol, NEFA i TG, i menor contingut que HF-LDL(+) però major que l'HF-LDL(-) en fosfolípids i apoB, (Taula R-4). En la majoria dels casos la diferència és més marcada respecte a la fracció electronegativa. També la migració electroforètica en agarosa de l'HF-LDL(+)^{bis} és intermitja. Aquesta fracció es va descartar per estudis posteriors pels motius ja explicats amb anterioritat, i es van realitzar els següents estudis amb les fraccions pures de càrrega elèctrica més diferent.

A.6 CARACTERÍSTIQUES OXIDATIVES

Degut a la controvèrsia existent sobre el possible origen oxidatiu de l'LDL electronegativa, es van avaluar una sèrie de paràmetres indicadors de processos lipoperoxidatius en les diferents fraccions. Es va determinar el contingut d'hidròxids i aldehids, que s'originen com a conseqüència de l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats de l'LDL, i també la quantitat d'antioxidants, ja que el seu contingut disminueix quan es produeix un procés de peroxidació lipídica (Taula R-5). No es van detectar més nivell oxidatiu en l'LDL(-) per la presència d'hidròxids ni de l'aldehyd MDA. Els resultats tampoc mostren diferències en el contingut de - tocoferol, ni en el de carotenoids.

Per tant, els resultats no indiquen que l'LDL(-) sigui una forma oxidada, ni en NL ni en HF, dades que estan en contra de la postura d'aquells que hipotetitzen que es troba oxidada, ja que indiquen que la partícula presenta un contingut disminuït en antioxidants i/o un nivell augmentat d'MDA (Avogaro 1991, Cazzolato 1991, Holvoet 1995, Sevanian 1996) i en lipoperòxids, per un mètode molt sensible, (Sevanian 1997). En canvi, els treballs del grup de Moatti descarten que l'LDL(-) presenti característiques pròpies de l'LDL oxidada (Chappey 1995a, Demuth 1996).

Altra prova que ratifica que l'LDL(-) no és una forma amb un grau d'oxidació important és l'electroforesi en SDS-PAGE, en la qual es va comprovar la integritat de l'apoB de l'LDL(-), ja que no s'observa al gel fragmentació ni agregació (Figura R-6), mentres que sí es detecten aquests fenòmens a l'LDL oxidada "in vitro". Utilitzant aquesta metodologia, també hi han diferents resultats entre els treballs en el tema de trobar proves que indiquin que l'LDL(-) presenti característiques oxidatives, detectant en alguns la presència d'agregats d'apoB en l'LDL electronegativa (Avogaro 1988, Avogaro 1991, Cazzolato 1991) o no (Shimano 1991, Chappey 1995a, Demuth 1996). D'altra banda, per electroforesi en gel

d'agarosa s'observà una major migració de l'LDL(-), causada per una càrrega negativa augmentada, però aquest increment en la mobilitat electroforètica és lleuger i molt menor que al cas de l'LDL oxidada "in vitro". Aquesta dada també ens confirma que no es tracta d'una LDL molt modificada o amb un grau d'oxidació considerable.

La susceptibilitat a l'oxidació "in vitro" de l'LDL es va determinar mitjançant incubació amb coure i monitorització de diens conjugats valorats a 234 nm. Els resultats (Figura R-4) indiquen que l'LDL(-) no tan sols no presenta característiques pròpies d'una forma oxidada, sinó que a més té una major resistència a l'oxidació, valorada com a una fase de latència més llarga, tant en el cas d'individus HF com el d'NL, en front a la seva fracció electropositiva. Aquest efecte és més patent al cas de l'HF-LDL(-).

Prèviament no s'havia descrit que l'LDL electronegativa fos més resistent a l'oxidació, sinó que el més acceptat en diferents treballs era just l'efecte contrari, és a dir, que l'LDL electronegativa era més susceptible a oxidar-se (Shimano 1991, Sevanian 1996). A més, com a mínim al cas de l'NL-LDL(-) era esperable que fos més susceptible a l'oxidació, ja que està àmpliament acceptat que les LDL petites i denses presenten una major oxidabilitat (de Graaf 1991, Tribble 1992). No obstant això, en les nostres mostres i amb les nostres condicions metodològiques l'efecte observat és el de una menor susceptibilitat a l'oxidació, fet que es pot hipotetitzar que sigui degut a diferents causes. Una d'elles és que l'LDL(-) presenta un major contingut en colesterol lliure, el qual protegeix a la partícula de l'oxidació (de Graaf 1991). S'ha proposat que pot exercir el seu efecte a dos nivells: disminuint la fluidesa en la superfície de l'LDL (Li 1992, Tribble 1995) i actuant com a antioxidant (Smith 1991). Respecte al primer factor està descrit que el colesterol lliure dóna rigidesa a la superfície de l'LDL, impeding l'entrada de radicals lliures iniciadors del procés oxidatiu.

Altra possibilitat candidata a oferir una explicació de la menor susceptibilitat a l'oxidació de l'LDL(-) és que l'apoB d'aquesta partícula presenti un canvi conformacional que faci més difícil la seva accessibilitat al core. De fet, està descrit que la seva apoB presenta una conformació alterada (Parasassi 2001). Hi han treballs on es descriu que canvis conformacionals en l'apoB indueixen una major resistència a l'oxidació de l'LDL (Abuja 1999, Brunelli 2000). A més, com s'ha comentat amb anterioritat, hi ha àmplia bibliografia en què es descriu que les subespècies de diferent densitat de l'LDL presenten canvis en la composició que provoquen canvis en la conformació de l'apoB, fet que pot afectar a diferents nivells, sent un d'ells la capacitat de la partícula per oxidar-se (McNamara 1996).

Una altra possible explicació de la menor susceptibilitat a l'oxidació de l'LDL(-) radica en el fet que l'LDL(-) s'agrega amb més facilitat, i està descrit que l'LDL agregada és més resistent a l'oxidació (Herman 1992). Es va observar induint l'agregació de les fraccions per agitació intensa amb vòrtex en temps creixents i posterior mesura d'absorbància a 680 nm, que l'LDL(-), independentment del tipus d'individu d'origen, presentava tant a temps inicial com a temps creixents d'agitació un major valor d'absorbància. Això no obstant, és difícil discernir si l'LDL(-) és una forma amb un cert grau d'agregació, o bé, com a conseqüència de presentar-hi una major susceptibilitat, es formen agregats més fàcilment per efecte de la manipulació de la mostra que en el cas de la forma nativa. La possibilitat que l'LDL(-) sigui una forma agregada es comentarà al següent apartat.

Apart de la fase de latència es van avaluar altres paràmetres en la cinètica de formació de diens conjugats, concretament el pendent i l'absorbància inicial i final. El pendent de la cinètica va ser, en el cas d'NL-LDL(-) significativament inferior respecte la seva fracció positiva, corroborant que la partícula s'oxida més lentament. L'absorbància inicial va ser significativament superior en l'LDL(-) en front l'LDL(+), tant en NL com en HF. Aquesta dada podria apuntar que la fracció

electronegativa podria tenir, prèviament a la inducció de l'oxidació, un petit contingut en lípids oxidats. No obstant això, pels altres resultats presentats, queda descartat que es tracti d'una forma extensament oxidada. D'altra banda, l'HF-LDL(-) va presentar una major absorbància final i increment d'absorbància que la d'NL, possiblement degut a que conté una major quantitat de substracte oxidable. Això indica que, malgrat que l'HF-LDL(-) és més resistent a l'oxidació que la d'NL, un cop superat el llindar necessari per iniciar l'oxidació, la partícula s'oxida més.

Quant a l'oxidabilitat de l'LDL total dels dos tipus de subjectes existeixen diferents resultats, alguns autors descriuen major susceptibilitat per part de l'LDL d'HF (Lavy 1991, Cominacini 1993, Napoli 1995), mentres que altres apunten més resistència (Raal 1995) o igual comportament (Sánchez-Quesada 1999). En el nostre cas la forma predominant o nativa, és a dir, LDL(+) no presenta diferent susceptibilitat a l'oxidació entre NL i HF. En canvi, l'HF-LDL(-) presenta major resistència a l'oxidació, potser perquè, assumint que les LDL(-) són més resistents a l'oxidació per l'augment en colesterol lliure o per canvis conformacionals, entre elles l'NL-LDL(-) al ser més densa podria ser relativament més susceptible a oxidar-se que la d'HF (de Graaf 1991).

Els resultats obtinguts en els paràmetres oxidatius apunten que l'LDL(-) no presenta un origen oxidatiu, o almenys no corresponen amb que presenti un grau d'oxidació important, fet que no descarta que pugui presentar uns nivells basals de lipoperòxids lleugerament augmentats i que no siguin detectables pels nostres mètodes, però sí per altres més sensibles (Sevanian 1997). De totes maneres, per les dades presentades, no sembla que la causa de l'electronegativitat de la partícula sigui la presència de productes d'oxidació, sinó altres diferències composicionals com el major contingut en TG, NEFA, apoE, apoCIII i àcid siàlic. Varis treballs descriuen que l'augment d'aquests components lipídics i apoproteics en l'LDL augmenten la seva càrrega negativa, i per tant poden ser candidats

responsables de la formació d'LDL(-). Totes aquestes diferències en les propietats oxidatives es poden atribuir a causes metodològiques, bàsicament a nivell de l'aïllament i manipulació de l'LDL electronegativa, processos que poden propiciar l'oxidació de la partícula, fet que provocarà que la mostra presenti diferents propietats (I-6.5). Una de les causes per les quals alguns autors troben evidències d'oxidació podria ser que tan sols utilitzen una concentració de 10 μ M d'EDTA al tampó, mentre que en el nostre cas és de 1 mM d'EDTA per evitar la modificació oxidativa de la partícula.

A.7 AGREGACIÓ

Com s'ha mencionat, es va comprovar, avaluant la susceptibilitat a l'agregació "in vitro", que l'LDL(-) mostra una major agregabilitat que la forma electropositiva (Figura R-8). El fet que l'absorbància a temps zero ja fos més elevada a l'LDL(-) indica que no tan sols és més agregable, sinó que el nivell basal d'agregació també va ser lleugerament més alt. Però, com s'ha esmentat quan es tractava el tema de la susceptibilitat a l'oxidació, és difícil conèixer si realment l'LDL(-) està més agregada, o al ser més susceptible a l'agregació es modifica per la manipulació de la mostra. D'altra banda, el fet que l'LDL sigui més susceptible a agregar-se podria ser en part responsable de la presència de bandes de major pes molecular observades en els gels en gradient d'acrilamida, tant en individus NL com en HF.

Respecte als resultats d'altres autors, no s'han realitzat estudis de susceptibilitat a l'agregació, però sí s'ha evaluat l'estat d'agregació de l'apoB per mitjà de gels en SDS-PAGE. En aquest aspecte els altres grups, en general, no han detectat presència d'agregats en l'LDL electronegativa, excepte el grup d'Avogaro,

associant aquest efecte a que la partícula es troba modificada oxidativament, que és la hipòtesi que defensen.

L'agregació és una modificació que proporciona aterogenicitat a l'LDL (Khoo 1988), ja que és internalitzada induint l'acumulació de colesterol esterificat. Tanmateix, la presència d'LDL amb un grau extens d'agregació a circulació és poc factible, però s'ha descrit, a la teoria de la retenció de les lipoproteïnes (Williams 1995 i 1998, Boren 2000) que l'LDL retinguda a la íntima és modificada per fusió/agregació i adquireix propietats aterogèniques. Això és degut a que en l'espai subendotelial abunden els agents prooxidants i també enzims proteolítics d'origen cel·lular, per acció dels quals es produeix fragmentació de l'apoB i pèrdua de part d'aquests fragments, el que comporta que components del nucli lipídic quedin exposats a la superfície, augmentant la hidrofobicitat. En potenciar-se les interaccions hidrofòbiques entre partícules d'LDL es faciliten els processos d'agregació (reversible) i fusió (irreversible) (Hevonoja 2000). Això concorda amb que en fases primerenques de la placa ateromatosa s'observa la formació de gotes i vesícules lipídiques originades a partir de l'LDL. Per aquestes raons, el fet que l'LDL(-) sigui més susceptible a agregar-se pot comportar una major aterogenicitat de la partícula, ja que és més fàcilment modificable a l'espai subendotelial.

A.8 CONCLUSIONS DEL BLOC A - CARACTERÍSTIQUES FÍSICO-QUÍMIQUES

- 1) En l'estudi de l'LDL electronegativa existeixen múltiples discrepàncies entre els autors. Un dels factors que deu contribuir és que es donin diferències metodològiques al moment d'aïllar la partícula, com el tipus de gradient salí i la força iònica utilitzada per a l'elució. Altre és l'heterogeneïtat de la mostra, ja que, l'LDL electronegativa presenta heterogeneïtat entre individus i, en conseqüència,

en funció de la població triada inicialment la partícula presentarà diferents característiques.

- 2) Els resultats confirmen que, efectivament, els individus HF presenten un major percentatge d'LDL(-) que els NL.
- 3) Les LDL(-), tant d'NL com d'HF, presenten una sèrie de característiques comunes, entre elles, quant a composició, el major contingut en apoproteïnes CIII i E, àcids grassos lliures, triglicèrids, colesterol lliure i àcid siàlic, i menor en apoB. També hi ha coincidència en la incrementada susceptibilitat a l'agregació
- 4) S'observa absència de característiques oxidatives en NL-LDL(-) i HF-LDL(-), ja que ambdues fraccions no presenten fragmentació ni agregació de l'apoB, contingut augmentat en MDA o hidròxids, ni disminuïts en antioxidants, i, a més, són menys susceptible a l'oxidació "in vitro". Aquestes dades indiquen que l'LDL(-) no és una forma originada per processos oxidatius, sinó que la major càrrega negativa pot venir determinada per altres factors.
- 5) Tanmateix, existeixen trets diferencials entre les LDL(-) dels dos tipus d'individu, fonamentalment un major contingut en colesterol i menor en fosfolípids i apoproteïnes CIII i E en HF-LDL(-). També difereixen quant a densitat, sent l'NL-LDL(-) una forma preferentment densa, mentres que l'HF-LDL(-) es distribueix a les fraccions més lleugeres.

B- INTERACCIÓ AMB ELS RECEPTORS CEL·LULARS

Existeixen diferents treballs sobre la interacció de l'LDL electronegativa amb els receptors cel·lulars, amb resultats discordants entre els grups. La finalitat d'aquests estudis seria discernir si la diferència en càrrega i altres característiques de l'LDL electronegativa poden interferir amb el reconeixement pel rLDL, i per tant influir en el seu aclariment plasmàtic. Per altra banda, el fet que l'LDL electronegativa presenti un increment en càrrega negativa, podria implicar el seu reconeixement pel receptor scavenger, SR, i com a conseqüència provocar l'acumulació intracel·lular d'ésters de colesterol de forma incontrolada, comportant la formació de cèl·lules espumoses (Goldstein 1979, Brown 1983 i 1990).

B.1 ACUMULACIÓ DE COLESTEROL ESTERIFICAT EN MACRÒFAGS

Respecte a la interacció amb el SR, el comportament de l'LDL(-) és igual en NL i HF, no promovent acumulació en colesterol esterificat respecte la forma nativa en macròfags de la línia de macròfags P388D1, la qual expressa el SRA-II (Figura R-9). En canvi, l'LDL acetilada va incrementar en sis vegades el contingut intracel·lular d'ésters de colesterol respecte a la forma nativa. De totes maneres, com s'ha comprovat per electroforesi en gel d'agarosa, el guany de càrrega elèctrica negativa de l'LDL(-) no és equiparable a la d'altres modificacions com l'acetilació o l'oxidació que sí indueixen acumulació en EC i per tant originen cèl·lules espumoses. Per tant, sembla que el lleuger guany en càrrega negativa de l'LDL(-) no és suficient per a que la partícula sigui reconeguda pel SRAII.

El fet que l'LDL(-) no sigui reconeguda per aquest receptor concret, el SRAII, no implica que no pugui ser captada per altre tipus de SR. El SRAI presenta petites diferències estructurals amb el SRAII, concretament la presència d'un domini ric en cisteïnes, però comparteixen la capacitat de reconèixer els mateixos lligands, fet pel qual és poc probable que l'LDL(-) pogués ser reconeguda pel SRAI. De totes maneres, malgrat que tots els lligands dels SR tenen en comú la càrrega negativa, dins d'aquest grup de receptors hi han englobats diversos tipus amb diferent especificitat de lligand, com el CD36, SRB-I, LOX-1, SREC (Terpstra 2000) i per tant, no es pot descartar que algun d'aquests SR tingui la capacitat de reconèixer l'LDL(-) i provocar una sèrie d'efectes biològics de caràcter aterogènic.

Comparant els nostres resultats d'interacció de l'LDL(-) amb el SR amb els trobats per altres grups, s'observen diferents resultats, ja que, per una banda hi han treballs que indiquen que aquesta fracció no és reconeguda pel SR (Avogaro 1988, Avogaro 1991, Shimano 1991), coincidint amb les nostres dades. Contràriament, altres autors defensen que l'LDL electronegativa pot generar cèl.lules espumoses (Tertov 1995, Holvoet 1995), induint l'acumulació d'ésters de colesterol. Entre aquests estudis es troba el de Tertov en col.laboració amb el grup d'Avogaro (Tertov 1995), el qual descriu que també la forma desialitzada té capacitat d'augmentar el contingut d'ésters de colesterol intracel.lular, i per aquesta i altres coincidències arriben a la conclusió de l'LDL electronegativa podria ser una forma desialitzada. No obstant, aquests últims resultats entren en contradicció amb el que havien descrit prèviament els mateixos autors de que l'LDL(-) no era reconeguda pel SR (Avogaro 1988).

B.2 INTERACCIÓ AMB EL RECEPTOR D'LDL

El fet que l'LDL(-) no sigui reconeguda pel SR no implica que el seu comportament amb el rLDL sigui igual al de la forma nativa. Les marcades diferències que presenta l'LDL(-), envers la forma nativa en composició, grandària i densitat, característiques íntimament relacionades amb la conformació de l'apoB i amb la interacció amb el rLDL, poden suggerir que l'LDL(-) presenti una afinitat pel receptor disminuïda. Amb la finalitat de caracteritzar la interacció de l'LDL(-) amb el rLDL es van realitzar una sèrie d'estudis d'unió al receptor a 4°C, utilitzant fibroblasts de pell, els quals expressen de forma abundant rLDL, expressió que resulta potenciada després de cultivar durant 48 hores en medi deficient en lipoproteïnes. Primerament es van realitzar estudis de saturació de la unió, per tal de determinar les constants d'afinitat (KD) i la unió màxima (Bmax) de les diferents fraccions. La quantitat de mostra emprada en aquests experiments és considerable, ja que s'ha de marcar la mostra amb el compost fluorescent Dil i, a més, utilitzar-ne un excés per a eliminar la unió inespecífica. Això, sobretot pel cas de l'LDL(-), representava un consum de mostra considerable i, com a conseqüència, el número d'aquests experiments va ser limitat (n=4). Per això, malgrat que els resultats trobats són força clars, es van dur a terme altres estudis per acabar de corroborar els de saturació, concretament es van fer estudis de desplaçament de la unió d'LDL total, tant desplaçant amb fraccions del mateix tipus d'individu que l'LDL marcada, com estudis de desplaçament creuat. Tots els tipus d'experiments van coincidir en els resultats (R- B.2.2 i B.2.3), els quals indiquen una menor afinitat per part de l'LDL(-), tant la procedent d'individus NL com la d'HF. Aquest efecte és més marcat en els NL, ja que en els HF l'HF-LDL(+) és menys afí que la NL-LDL(+) i, per tant, malgrat que les LDL(-) tenen un comportament similar, s'observa més diferència entre les fraccions de diferent càrrega en el cas d'NL.

B.2.1 Experiments de saturació de la unió

Analitzant els resultats detalladament (Figures R-11 i R-12, Taula R-8), als estudis de saturació de la unió s'observa que l'NL-LDL(+) o forma nativa presenta una $KD=10.88\pm 5.72$ nM, del mateix ordre de la descrita a la literatura (Innerarity 1987, Agnani 1991, Nigon 1991), mentres que la d'HF té una constant d'afinitat incrementada un 53%, indicant que la seva afinitat pel receptor es troba lleugerament minvada.

Comparant les LDL(-) dels dos tipus d'individus es comprova que l'NL-LDL(-) sembla menys afí que l'HF-LDL(-). La diferència de KD és d'un 35%, però val a dir que la desviació en l'NL-LDL(-) és bastant gran i la diferència no és estadísticament significativa. En tots dos casos, l'LDL(-) interacciona amb el receptor amb menor afinitat que la corresponent forma nativa. Però, com a conseqüència de que l'HF-LDL(+) presenta menor afinitat i l'HF-LDL(-) major que les fraccions equivalents d'NL, la disminució de l'LDL(-) en front l'electropositiva en l'afinitat pel receptor és d' 1.5 vegades en HF, en front de les 3 vegades observades en els NL.

Referent a la unió màxima, expressat com a valor de B_{max} , no s'observen diferències entre NL i HF. Comparant entre fraccions de diferent càrrega existeix una tendència per part de l'LDL(-) a presentar un valor de B_{max} més elevat. Per tant, s'observa que aquesta fracció presenta pèrdua d'afinitat pel rLDL, però no deguda a una menor ocupació dels receptors, ja que la unió màxima és major que la de la forma nativa. Això suggereix que l'LDL(-) es pot unir inespecíficament a altres parts de la membrana cel.lular, que no siguin el rLDL amb menor afinitat. També podria ser que com aquesta partícula és més susceptible a agregar-se, s'associés en forma de dímers o polímers d'LDL que s'unissin al receptor, havent-hi partícules que no interaccionen amb ell però donant senyal fluorescent.

B.2.2 Estudis de desplaçament de la unió

Per confirmar els resultats abans obtinguts es van realitzar els estudis de desplaçament de la unió d'LDL marcada amb excés d'LDL sense marcar i es va determinar la IC₅₀, i a partir del valor de KD obtingut als experiments de saturació es va calcular la Ki o constant d'inhibició. Quan es marcava l'LDL total d'un tipus d'individu i es desplaçava amb les fraccions del mateix, es va observar una menor capacitat significativa de l'LDL(-) per a desplaçar la unió. La capacitat de desplaçament de la unió per part de l'LDL(-) no va ser mai tan petita com en els casos de l'LDL oxidada i l'LDL acetilada. La menor afinitat de l'LDL(-) va ocórrer en els dos casos, NL i HF, però la diferència va ser menys pronunciada en el cas dels HF. Aquests resultats van en el mateix sentit que els trobats a les cinètiques de saturació. També es confirma que l'HF-LDL(+) presenta una Ki amb un increment del 53% respecte a la d'NL, sent per tant menys afí en la seva interacció amb el receptor. Respecte al comportament mostrat per les fraccions electronegatives dels dos tipus d'individu, ambdues van mostrar una capacitat similar per desplaçar.

Per contrastar millor el diferent comportament entre fraccions d'NL i HF es van realitzar estudis de desplaçament creuat en què es desplaçava l'LDL total marcada d'un tipus d'individu amb les fraccions procedents de l'altre tipus (Figures R-14a i 14b, Taula R-10). Es va comprovar que les fraccions d'NL posseeixen pràcticament la mateixa capacitat per desplaçar LDL total d'NL i HF, coincidint en l'afinitat disminuïda de l'NL-LDL(-). Respecte a les fraccions d'HF, en els experiments en què es desplaçava Dil-NL-LDL amb concentracions creixents d'HF-LDL(+) i HF-LDL(-), no s'observà una disminució tan marcada en l'afinitat per part de l'HF-LDL(-), ja que aquesta presenta una IC₅₀ del mateix ordre que l'HF-LDL(+). Les dades de les cinètiques de saturació i els altres estudis de desplaçament indicaven que l'NL-LDL(+) presentava una major unió al rLDL que l'HF-LDL(+) i, en

conseqüència, es pot deduir que aquesta última no és tan eficaç per desplaçar la unió de Dil-NL-LDL, minvant les diferències en afinitat entre HF-LDL(+) i HF-LDL(-).

El comportament de l'LDL electronegativa amb el rLDL havia estat prèviament bastant controvertit. Entre els estudis de desplaçament realitzats, alguns estarien d'acord amb els presentats a aquesta tesi, com els primers treballs del grup d'Avogaro (Avogaro 1988 i 1991) en què van descriure que l'LDL electronegativa presentava pèrdua parcial de l'afinitat pel receptor d'LDL i no era reconeguda pel receptor "scavenger" expressat en macròfags. Aquestes característiques coincidien amb la idea d'aquests autors de que l'LDL electronegativa era una forma mínimament oxidada present a circulació. De fet, van comprovar per experiments amb anticossos que reconeixien dominis d'unió al receptor, que l'LDL electronegativa tenia una menor reactivitat a aquests anticossos (Avogaro 1988). Contràriament als resultats de menor afinitat al receptor de l'LDL electronegativa, n'hi han que descriuen una afinitat igual a la de l'LDL(+) (Shimano 1991), o incrementada (Chappey 1995a, Demuth 1996). Els que descriuen un increment d'afinitat el justifiquen per la presència d'un contingut augmentat en apoproteïna E (apo E) per part de l'LDL(-), la qual és un lligand del rLDL, malgrat que l'LDL electronegativa també presenta major contingut en apoCIII, la qual s'ha descrit que pot inhibir la unió al rLDL (Agnani 1991). Les diferències trobades entre els grups són de difícil explicació, es pot tornar a hipotetitzar que són degudes a diferències en el mètode cromatogràfic d'aïllament, en la manipulació o en l'heterogeneïtat en les poblacions de mostra. Això provocaria que s'estigués treballant amb diferents subespècies de partícules, amb diferents propietats, i també diferent comportament en la interacció biològica amb els receptors. Altre factor que podria explicar els resultats de major afinitat, els quals difereixen dels nostres, és l'ús d'un tipus cel.lular diferent que podria expressar altres receptors d'elevada afinitat per l'apoE.

B.2.3 Possibles causes de la menor afinitat de l'LDL(-)

En les nostres condicions experimentals es comprova, per tots els resultats obtinguts dels diferents tipus d'assajos, que l'LDL(-) presenta una menor afinitat pel receptor en front a la fracció nativa. Ja s'ha esmentat quan es tractava el tema de la susceptibilitat a l'oxidació que la diferent composició, densitat i grandària d'aquestes partícules podrien ser responsables de canvis conformacionals, els quals poden afectar a la seva interacció amb el receptor. En aquest aspecte hi ha un treball força interessant (McNamara 1996), en què s'estudia la diferent composició i carrega superficial de les subfraccions de densitat, i per un model computeritzat es dedueix que tenen lloc canvis conformacionals en les més lleugeres i les més denses, fet que implicaria una alteració en la susceptibilitat a l'oxidació i en la interacció amb els receptors cel·lulars. Molts treballs descriuen que les característiques de composició-grandària-densitat estan íntimament interrelacionades i que diferents subfraccions de densitat, diferint en grandària i amb una composició pròpia, presenten també divergències en la seva interacció amb el receptor (Nigon 1991, Campos 1996, Lund-Katz 1998). En el cas de l'LDL(-) ens trobem amb una LDL més gran i lleugera, la corresponent a HF, i amb una més petita i densa, la d'NL, i pels estudis d'unió s'ha comprovat que presenten una afinitat disminuïda pel rLDL. Està ben determinat que l'LDL petita i densa, presenta una menor afinitat pel receptor (Kleinman 1987, Aviram 1988, Kinoshita 1990, McKeone 1993). Aquest és el cas dels individus hipertriglicèrèmics, en què predominen aquesta partícula. No obstant això, quan s'aconsegueix amb tractament millorar el seu perfil lipídic i normalitzar la grandària de l'LDL també es normalitza la seva unió amb el receptor (Kleinman 1987, Toyota 1999).

A més de trobar-se aquesta disminució en afinitat en les subfraccions més denses, també s'ha descrit el mateix per a les més lleugeres. De fet, en diferents estudis relitzats amb subfraccions de densitat de l'LDL s'observen que les

partícules més lleugeres i les més denses presenten menor afinitat que les de densitat intermitja (Jaakola 1989, Nigon 1991, Arad 1992, Galeano 1994, Campos 1996).

El fet que les fraccions de major i menor densitat presentin una afinitat disminuïda pel receptor seria una causa bastant plausible de l'efecte observat per part d'una partícula com l'LDL(-) que presenta una densitat i grandària diferents de la nativa. Concretament, l'NL-LDL(-) és més densa que la seva respectiva fracció electropositiva, mentres que l'HF-LDL(-) és més lleugera que l'HF-LDL(+), i com a conseqüència presenten una menor afinitat pel rLDL.

Apart del fet que les fraccions més lleugeres i denses presentin menor afinitat pel receptor, també està descrit que posseeixen una major mobilitat electroforètica en gels d'agarosa, fet indicador de que tenen una major càrrega negativa (Chapman 1988, LaBelle 1997, Lund-Katz 1998) que pot interferir en la seva interacció amb el rLDL. Aquestes característiques coincidrien amb les de l'LDL(-), tant d'NL, densa, com les d'HF, lleugera.

La major càrrega negativa, tamany i conformació dependran, en major o menor grau, de diferències en la composició, de les quals les principals que poden tenir influència en la interacció amb el receptor són les apoproteïnes CIII i E, els NEFA i els TG. De fet, qualsevol component de l'LDL pot afectar a la conformació de l'apoB, ja que els lípids i les apoproteïnes es troben fortament associats, contribuint a mantenir l'apoB en la disposició espacial adient per interaccionar amb el receptor. D'aquesta manera, si tenen lloc canvis en el contingut lipídic es produeix una diferent reactivitat amb anticossos antiapoB, i, per tant, estarà alterada la unió al receptor (Marcel 1987, Harduin 1993). A més, recolçant això, cal remarcar un recent estudi en què s'ha descrit que l'LDL electronegativa presenta alteracions a la conformació de l'apoB (Parasassi 2001), concretament té una

pèrdua de l'estructura secundària, desplegament i enfonsament a zones hidrofòbiques.

Malgrat que l'LDL(-) presenta un major contingut en apoCIII i apoE i que l'apoE que és un lligand d'unió al rLDL, els nostres resultats indiquen que l'LDL(-) presenta una afinitat disminuïda pel rLDL. Això es pot explicar perquè el contingut en apoE de l'LDL(-) és massa baix comparat amb el de l'apoB, malgrat que estigui incrementat respecte la forma nativa, com per influir en el comportament metabòlic de l'LDL(-). A més, hauria de contenir més d'una molècula d'apoE perquè la partícula presentés major afinitat i el contingut en apoCIII pot inhibir la unió (Agnani 1991). De totes maneres, una major quantitat d'apoE no implica necessàriament que hagi d'adquirir més afinitat del receptor, ja que la unió dependrà de si la conformació de la partícula és l'adequada i els epítops implicats en la unió estan accessibles. De fet, un major contingut en apolipoproteïnes intercanviables no tan sols no implica una major afinitat sinó que pot alterar la conformació de l'apoB provocant precisament l'efecte contrari. Recolçant aquesta idea hi han proves de que un major contingut en apoE i apoCIII afecta a la immunoreactivitat de l'apoB, impedit el reconeixement de certs epítops per part d'alguns anticossos monoclonals (Ginsberg 1986, Agnani 1991, Harduin 1993).

Un altre factor composicional que podria influir en la menor capacitat de l'LDL(-) per interaccionar amb el rLDL són els NEFA, el contingut dels quals és el doble en aquesta fracció. Hi han estudis sobre l'efecte dels NEFA per si sols en la interacció amb el rLDL (Bihain 1989, Rumsey 1995, Bucci 1998), però no sobre com altera el seu enriquiment en l'LDL a la unió de la partícula amb el rLDL. Es coneix, però, que els NEFA alteren la fluidesa de les lipoproteïnes (Foucher 1996), fet que podria suggerir que el seu enriquiment indueix modificacions conformacionals en l'apoB, les quals podrien comportar una alteració en la unió al receptor, explicant el fenomen observat en l'LDL(-) de menor afinitat pel rLDL. Per comprovar aquesta hipòtesi es van realitzar estudis carregant LDL amb NEFA "in

vitro" i estudiant l'afinitat amb el receptor (bloc C), obtenint una sèrie de resultats que es comentaran posteriorment.

Altra de les característiques composicionals de l'LDL(-) és que té un nivell de TG augmentat. Diversos estudis indiquen que el contingut en TG pot afectar al aclariment de l'LDL, per tant els TG poden ser responsables de la menor afinitat pel rLDL de l'LDL(-). Entre els estudis realitzats sobre l'efecte de l'increment de TG en l'LDL i la consegüent menor afinitat pel receptor, hi han estudis "in vitro" realitzats carregant LDL amb TG (Aviram 1988, Kinoshita 1990, McKeone 1993) i estudis "in vivo" aïllant LDL d'individus hipertriglicèrèmics (HTG), la qual té un major contingut en TG i menor afinitat pel rLDL (Kleinman 1987, Galeano 1994, Toyota 1999) inclús en HTG moderada (Kleinman 1987). En tots aquests estudis s'atribueix l'afinitat minvada de la partícula a canvis conformacionals de tipus local. En el cas de l'LDL de HTG, com es tracta d'una partícula petita i densa, es probable que estigui alterada la conformació, ja que estaria forçada la corbatura, sobretot dels dominis més plàstics de l'apoB, que serien els dominis d'unió (McNamara 1996). En els treballs de càrrega "in vitro" hi han diferents punts de vista, alguns indiquen que l'efecte dels TG és a través de la inducció de canvis en la grandària de la partícula (Kleinman 1987, Chen 1994, Galeano 1994, Toyota 1999), mentres que altres opinen que la menor afinitat causada per la major quantitat de TG és independent de la modificació del tamany de la partícula (Kunitake 1990, McKeone 1993). De totes maneres, el contingut incrementat en TG de l'LDL(-) deu ser un dels factors responsables de la menor afinitat de l'LDL(-) pel rLDL. No es pot afirmar, però, que expliqui totalment el fenomen, ja que, per exemple, en un treball (Chen 1994) s'indica que l'efecte en HTG és depenent del contingut concret en TG, i quan el valor és d'un 9%, que seria aproximadament el contingut en l'LDL(-), no es produeixen canvis en l'afinitat de l'LDL pel rLDL.

Altres components que es troben incrementats en l'LDL(-) que també podrien tenir influència en la interacció amb el receptor són el colesterol lliure

(Harduin 1993) i l'àcid siàlic que, degut a que proporciona càrrega negativa a l'LDL (Camejo 1985, Chappey 1995b), pot contribuir a dificultar la unió al rLDL.

D'altra banda, malgrat la menor afinitat de l'LDL(-), tant d'NL com d'HF, la partícula presenta una unió màxima, indicada com a valor de Bmax, superior a la de la respectiva fracció electropositiva. Això podria implicar l'existència d'unió inespecífica de l'LDL(-), la qual podria ser deguda a unió a les membranes cel·lulars a llocs diferents del rLDL. Aquest fenomen es pot relacionar amb el que ocorre tractant "in vitro" l'LDL amb PLA2 (Kleinman 1988), cas en el que es produeix una major unió cel·lular però menor degradació. En aquest treball, mitjançant diferents proves, es descriu que la unió d'aquesta LDL modificada és inespecífica, ja que per efecte del tractament enzimàtic es produeix pèrdua de fosfolípids, fet que comporta una major penetració superficial de components del nucli, els quals no interaccionen específicament amb el rLDL. De igual manera, l'LDL(-) podria tenir menor afinitat, però, com indica el major valor de Bmax (unió màxima), presentar major unió inespecífica, de fet, per les representacions de les cinètiques de saturació sembla haver més inespecificitat en el cas de les LDL(-). Tanmateix caldria comprovar aquesta hipòtesi amb altre tipus d'experiments, com ara estudis de degradació, ús d'anticossos antireceptor o estudis de desplaçament marcant LDL(-) i observació de l'efecte de concentracions creixents de la respectiva LDL(+).

B.2.4 Comparació entre HF i NL en afinitat

Fins ara s'han comentat els resultats comparant l'afinitat de l'LDL(-) d'HF o NL amb la seva respectiva LDL(+), i discutit les diferències en composició de l'LDL(-) com a possibles causants de la menor afinitat de la partícula. Però, d'altra banda, també són interessants les diferències trobades quant a afinitat en el receptor entre els individus NL i els HF, ja que els resultats indiquen que l'HF-

LDL(+) presenta menor afinitat en front a l'NL-LDL(+), fet que provocaria un major temps de circulació de la partícula.

Els subjectes HF tenen augmentada la concentració d'LDL a circulació perquè presenten defectes en el rLDL, i com a conseqüència un aclariment de la partícula disminuït. No obstant això, prèviament no s'havia descrit per estudis d'unió al receptor que la pròpia partícula d'LDL fos menys afí pel receptor, però si hi ha dades que els HF presenten partícules d'LDL amb un metabolisme enlentit (Caslake 1993). Altra patologia, caracteritzada també per nivells plasmàtics augmentats d'LDL, la de l'apoB defectiva (FDB), és un cas en que la partícula en sí presenta una menor unió pel rLDL deguda a una mutació en el residu 3500, de substitució d'arginina per cisteïna (Innerarity 1987). També, s'ha descrit altres mutacions diferents de l'apoB que poden afectar a la unió al receptor (Pullinger 1995). És molt poc probable que hi hagués algun FDB o afecte d'altra mutació a l'apoB en els nostres pacients, malgrat que s'ha descrit que, en alguns països, 2-5% dels diagnosticats com a HF són realment FDB (Innerarity 1990).

Altra possible explicació de l'afinitat disminuïda de l'HF-LDL(+) es basa en la diferent densitat de la partícula, que ja s'ha comentat aplicada al cas de la menor afinitat de les LDL electronegatives d'NL i HF en front a les seves respectives LDL(+). Els individus HF tenen formes d'LDL més grans i lleugeres que els NL (Raal 1999), els quals presenten predominantment LDL de densitat intermitja (Chapman 1988). Això comportaria que, degut a que l'LDL de densitat intermitja és la forma que presenta la conformació ideal per interaccionar amb el receptor, les LDL d'HF presentessin una tendència a unir-se menys eficaçment amb el rLDL. Una possibilitat de la menor unió al receptor de les LDL lleugeres i grans d'HF són els impediments estèrics (Chapell 1991), ja que el rLDL és petit en front a l'LDL, sobretot considerant que els receptors es troben concentrats a les zones dels pous de clatrina, i especialment si aquestes són de major tamany.

Com s'ha esmentat abans, apart del defecte en els rLDL, s'ha descrit que els HF tenen partícules d'LDL que romanen més temps a circulació (Caslake 1993), concretament perquè presenten més nombre de partícules de l'anomenat "pool B" que s'aclareixen més lentament, contrastant amb les LDL del "pool A", amb major fracció de tasa catabòlica i major afinitat pel receptor. Es podria comparar el "pool B" amb la nostra LDL(-) i el "pool A" amb l'LDL(+). De manera que això coincidiria amb el descrit (Caslake 1993) que els HF presenten més partícules al "pool B", major proporció d'LDL(-) en aquests individus, i menor fracció de tasa catabòlica dins del "pool A" respecte a NL, això podria tenir relació amb l'aclariment minvat de l'HF-LDL(+) en front a NL-LDL(+).

En resum, està clar que deu haver una forta relació entre composició i interacció amb el receptor. Pot ser que la composició alterada de l'LDL(-) minvi la seva afinitat pel receptor, però també el fet de que s'uneixi menys al receptor provocaria que l'LDL(-) estigués més temps a circulació, susceptible a patir modificacions, entre elles alteracions a la seva composició. Aquest fenomen es podria relacionar amb l'explicat anteriorment en HF, ja que, degut a l'aclariment impedit de la partícula per la disminució de funcionalitat dels seus receptors, l'LDL restaria més temps a circulació, de manera que la seva composició podria resultar alterada i provocar la generació d'LDL(-).

B.3 CONCLUSIONS BLOC B - INTERACCIÓ AMB ELS RECEPTORS CEL·LULARS

- 1) L'LDL(-) no és reconeguda pel SRAII de macròfags P388D1, o, com a mínim no causa l'efecte biològic consegüent de la interacció a través d'aquest receptor, és a dir, l'acumulació intracel·lular de colesterol esterificat.
- 2) L'LDL(-) presenta una disminució en l'afinitat pel rLDL respecte a la forma nativa, fet que comportarà un pitjor aclariment de la partícula. Aquesta minvada afinitat pel receptor és probablement deguda als canvis en composició que presenta l'LDL(-), on bàsicament estarien implicats NEFA, TG, apoproteïnes diferents de l'apoB, àcid siàlic i colesterol lliure, els qual condicionaran la grandària i densitat de la partícula. Aquests canvis poden alterar localment la conformació, alterant l'òptima per a la correcta interacció amb el receptor, de manera que LDL més lleugeres o més denses que la fracció intermitja presenten una menor afinitat pel rLDL.
- 3) L'HF-LDL(+) presenta una afinitat pel rLDL inferior a l'NL-LDL(+), pot ser degut a que la forma d'HF és més lleugera que la d'NL, la qual presenta majoritàriament una densitat intermitja i, en conseqüència, una major afinitat.
- 4) El fet que les LDL(-) d'NL i HF no presentin una correcta interacció amb el receptor, comportarà un impediment en el seu aclariment plasmàtic. Això provocaria un major temps de residència a circulació, durant el qual seria més susceptible a sofrir altres modificacions que podrien provocar l'adquisició per part de la partícula de més característiques aterogèniques.

C – RELACIÓ DE L'LDL ELECTRONEGATIVA AMB EL CONTINGUT EN NEFA

Els NEFA són transportats en el plasma associats a l'albumina, però quan s'incrementa la concentració de NEFA i/o disminueix la d'albumina es modifica la relació entre ambdós, de manera que es sobrepassa la capacitat de transport de l'albumina, els NEFA poden passar a altres molècules com les lipoproteïnes. Això succeeix en algunes situacions de risc cardiovascular com la diabetis, la hipertensió o la síndrome nefròtica, i en altres no patològiques, com després de l'exercici físic agut. En algunes d'aquestes situacions en què s'observen valors augmentats de NEFA, també hi ha associat un increment en l'LDL(-). En el nostre cas, una de les característiques diferencials de l'LDL(-) en els dos tipus d'individus objectius d'aquest estudi, normolipèmics i hipercolesterolèmics, és un increment en el contingut de NEFA que com a mitjana representa el doble respecte a la fracció electropositiva. La hipòtesi plantejada va ser que aquest nivell augmentat de NEFA de l'LDL(-), no descrit prèviament, podria ser responsable, en part, de les característiques fisico-químiques i biològiques de la partícula.

Es van realitzar una sèrie d'estudis "in vitro" d'incubació d'LDL amb diferents concentracions d'una barreja fisiològica de NEFA per estudiar posteriorment el seu comportament a nivell fisico-químic i d'interacció amb el receptor i comparar-lo amb el de l'LDL(-).

C.1 CARACTERÍSTIQUES FISICO-QUÍMIQUES

Es va observar que a major concentració de la barreja de NEFA, l'LDL experimenta un enriquiment en aquest component, de manera que a les concentracions de 0.25 i 0.5 mM s'obtenia un contingut en NEFA equivalent al de

l'LDL(-), sobre uns 20 mols NEFA/mol apoB (Figura R-15). A concentracions superiors de la barreja l'LDL es va carregar en NEFA de forma massiva, adquirint valors superiors a 100 mol NEFA/mol apoB, contingut que és poc probable que es doni en situació fisiològica. Els valors fisiològics del contingut en NEFA de l'LDL no estan ben establerts, però, normalment, en els treballs en què es valora aquest paràmetre no excedeix els 50 mols NEFA/mol apoB. D'altra banda, el guany en NEFA no modifica la composició en altres components de l'LDL. Tanmateix, proporciona a la partícula un progressiu increment en la proporció d'LDL electronegativa i en la mobilitat electroforètica en agarosa (Figures R-16 i R-17), coincidint amb el descrit a altres treballs (Shafir 1958, Chung 1995, Braschi 1997), quedant confirmada d'aquesta manera la relació de l'electronegativitat de l'LDL i el contingut en NEFA. No s'observen diferències en mobilitat en gel agarosa quan el guany en NEFA és baix, tanmateix, per cromatografia de bescanvi aniònic sí que es detecten les diferències, inclús en les de càrrega en NEFA més baixa, i l'increment en electronegativitat és progressiu amb l'augment en el contingut en NEFA de l'LDL. Per tant, el percentatge d'LDL(-) és una mesura més sensible que la mobilitat electroforètica en agarosa a l'increment de càrrega elèctrica negativa en l'LDL originada pel guany en NEFA.

Respecte a les propietats oxidatives de l'LDL enriquida en NEFA s'observa un curiós comportament (Figura R-18), ja que amb una càrrega en NEFA inferior a 50 mol NEFA/mol apoB la partícula és més susceptible a oxidar-se "in vitro", però quan s'incrementa el nivell de NEFA el que s'observa és l'efecte contrari, és a dir una major fase de latència que indica una resistència incrementada a l'oxidació. La major resistència a l'oxidació a un contingut de NEFA superior a 50 mols per partícula d'LDL correspon amb els resultats d'altres autors (Viens 1996). Això pot ser degut a que els NEFA alterin la conformació de la partícula (Foucher 1996) i aquesta afecti a la interacció amb el coure; altra possibilitat és la formació

d'agregats en aquestes circumstàncies d'LDL altament carregades amb NEFA (Hakala 1999), fet que comportaria una oxidabilitat disminuïda (Herman 1992).

Per altre costat, el fet que amb poca càrrega en NEFA l'LDL es faci més oxidable coincideix amb resultats obtinguts en individus que havien realitzat exercici físic agut (Benítez 2002), els quals presenten un increment en la proporció d'LDL(-) atribuïda a un contingut augmentat de NEFA en l'LDL, i aquesta LDL postexercici també és més susceptible a l'oxidació. També es podria trobar una relació en els diabetics tipus 2 (DMII), que és una situació en què augmenta el nivell plasmàtic de NEFA i també el percentatge d'LDL(-). En aquests individus l'LDL és més susceptible a l'oxidació (Sánchez-Quesada 2001). Aquestes dues situacions, postexercici i DMII, són dos casos en els quals existeix relació entre elevada proporció d'LDL(-) i NEFA augmentats, amb LDL més susceptibles a l'oxidació. Tanmateix, aquests resultats en susceptibilitat a l'oxidació discrepen amb el trobat per l'NL-LDL(-) i l'HF-LDL(-), les quals s'ha observat que no tan sols no són més susceptibles a oxidar-se que la seva respectiva fracció electropositiva, sinó que són més resistents a patir oxidació "in vitro". Això pot ser degut a que el major contingut en NEFA no es l'única divergència entre LDL(+) i LDL(-), sinó que hi han altres diferències composicionals, de grandària i densitat, les quals poden influir en el comportament oxidatiu de la partícula. En canvi, en les LDL postexercici no hi ha canvi en grandària de la partícula ni en cap component de la composició excepte en els NEFA (Benítez 2002), i en els DMII les diferències amb els individus normoglicèmics són diferents de les trobades entre LDL(+) i LDL(-).

Aquests estudis fisico-químics es van realitzar amb la barreja d'àcids grassos, i a més incubant amb els diferents NEFA individualment, situació en què també es va comprovar que es reproduïen les mateixes característiques (Taula R-11). En aquests estudis d'incubació amb els àcids grassos independents no es va utilitzar àcid araquidònic per ser un NEFA minoritari, i les concentracions emprades

dels altres van ser 0.5 mM, per ser una concentració amb què s'assoleixen valors de NEFA en l'LDL similars als de l'LDL(-), i una de més elevada, 2 mM, situació a la que l'LDL assoleix un enriquiment suprafisiològic en NEFA, però que serveix per contrastar l'efecte amb càrregues més baixes. Independentment del tipus de NEFA augmenta l'electronegativitat de la partícula, per tant, en la barreja tots els NEFA contribueixen a augmentar la càrrega negativa. En canvi, en la susceptibilitat a l'oxidació prima l'efecte de l'oleic i el linoleic, els quals, al ser insaturats, són més susceptibles a oxidar-se i, en conseqüència, podrien intervenir en l'inici del procés oxidatiu. L'àcid palmític, malgrat que a igual concentració s'incorpora en major grau a l'LDL en incubació "in vitro", no sembla tenir tanta influència en el comportament oxidatiu de l'LDL incubada amb la barreja de NEFA, ja que el palmític no s'oxida tan fàcilment, probablement degut a que es tracta d'un àcid gras saturat. La incorporació del palmític va ser el doble que la d'oleic i linoleic, però en aquests estudis la incubació era amb els NEFA per separat, i no es pot saber si tindrà el mateix comportament en la barreja, on pot haver interacció entre els diferents NEFA. En funció dels resultats, es podria suggerir que el palmític afecta augmentant la càrrega negativa en l'LDL, però no sembla actuar, quan s'incuba amb la barreja, en la susceptibilitat a l'oxidació, on els iniciadors de la reacció serien l'oleic i el linoleic. Els experiments d'interacció amb els receptors cel·lulars es van portar a terme només amb les LDL incubades amb la barreja de NEFA, que és la situació més fisiològica.

C.2 INTERACCIÓ AMB ELS RECEPTORS CEL·LULARS

Respecte l'efecte de l'LDL-NEFA en la inducció d'acumulació de colesterol esterificat en macròfags, després d'incubar durant 72 hores amb les diferents concentracions no s'observà la inducció de citotoxicitat, contràriament al descrit a altres estudis (Chung 1995), i tampoc va provocar acumulació en ésters de

colesterol que poguessin originar la formació de cèl.lules espumoses (Taula R-12 i Figura R-18). Aquests resultats es corresponen amb els trobat amb l'LDL(-), tant d'NL com d'HF. El fet que l'LDL enriquida en NEFA no provoqui acumulació en colesterol esterificat coincideix amb treballs previs (Aviram 1988) però discrepa d'altres (Hayashi 1987, Rumsey 1995). Probablement la causa de les diferències és metodològica, com les condicions d'assaig, la càrrega en NEFA de les partícules o el tipus cel.lular.

Quant a la interacció amb el rLDL, no hi ha bibliografia adeqüada amb les condicions dels nostres assajos per tal de poder comparar els resultats, ja que els estudis publicats estan realitzats amb NEFA sols, no amb LDL carregada en NEFA. En els mencionats estudis els resultats són que els NEFA activen el rLDL (Rumsey 1995, Bucci 1998) i competeixen amb l'LDL per la unió al receptor (Bihain 1989). En aquesta tesi, els estudis de la interacció de l'LDL-NEFA amb el rLDL, avaluada per experiments de desplaçament de la unió, van proporcionar resultats força interessants, ja que s'observa que l'LDL que ha sofert un guany en NEFA respecte a la forma nativa presenta una afinitat disminuïda pel receptor, coincidint amb el comportament de l'LDL(-) dels individus estudiats en aquesta tesi (Figura R-20).

Segons els valors mitjans obtinguts d'IC₅₀ (Taula R-13), s'observa que fins i tot l'LDL amb menor ganància en NEFA, que presenta poca diferència respecte de la forma nativa, és pitjor reconeguda pel rLDL. A més, amb una càrrega en NEFA equivalent a la de l'LDL(-) d'NL i HF, interpol.lant en aquest resultats, la IC₅₀ tindria un valor al voltant de 30 mg/L, que correspon força aproximadament al trobat en els estudis realitzats directament amb l'LDL(-). Aquests resultats suggereixen que en augmentar el contingut en NEFA de l'LDL es deu alterar d'alguna manera la conformació de la partícula fent-la menys afí pel receptor. Aquesta hipòtesi està recolzada pel coneixement de que els NEFA alteren la fluidesa de la superfície de les lipoproteïnes (Foucher 1996). També existeix la possibilitat de que la càrrega

negativa alteri la interacció amb el rLDL, per exemple emmascarant les lisines responsables de la unió. En el cas de més quantitat de NEFA a l'LDL, incubant amb 2 mM, s'obté una IC₅₀ major però la pèrdua d'afinitat no és proporcional al valor molt incrementat de NEFA que presenta la partícula. Per tant, independentment de com alterin els NEFA a l'LDL fent que presenti menor afinitat pel rLDL, sembla que arriba un punt en què l'efecte no és linial o proporcional a l'augment en NEFA.

L'LDL tractada "in vitro" amb PLA₂, que s'enriqueix en NEFA, reproduïx algunes característiques fisico-químiques de l'LDL(-), i també perd afinitat pel rLDL de manera depenent al contingut en NEFA (Kleinman 1988). Això coincideix amb els resultats aquí presentats amb LDL carregades en NEFA per incubació "in vitro". En el cas de l'LDL-PLA₂, els autors del treball van atribuir el comportament amb el receptor a canvis conformacionals originats a la partícula (Kleinman 1988). Aquest fet podria estar relacionat amb la idea d'un canvi conformacional induït pels NEFA a l'LDL(-), la qual és força atractiva, ja que en part podria ser en part la causa del comportament oxidatiu i de la menor afinitat pel receptor presentada per la partícula. A més, en un recent treball ja mencionat (Parasassi 2001) es descriu que l'LDL electronegativa presenta diferències conformacionals respecte a la forma nativa, atribuint a aquestes alteracions en la conformació la menor afinitat pel rLDL.

L'enriquiment en NEFA de l'LDL(-) és una de les característiques principals de la partícula. L'origen d'això no està ben establert, però es poden fer hipòtesis. Aquests NEFA podrien provenir d'un augment local, per exemple a les zones de lipòlisi de VLDL i quilomicrons. Aquests NEFA s'unirien a l'LDL circulant d'aquesta zona proporcionant-li electronegativitat i generant LDL(-), la qual, com presenta un aclariment disminuït pel receptor, romandria més temps a circulació, on seria més susceptible a patir altres modificacions. Altra possibilitat és la generació de NEFA per acció de la PLA₂, la qual en estudis "in vitro" provoca un increment del contingut

en NEFA de l'LDL, en absència d'albumina (Kleinman 1988). Aquest estudi coincideix amb els resultats d'aquesta tesi en una sèrie de característiques que podrien suggerir una implicació entre la PLA2 i la generació de l'LDL(-). Aquestes propietats comunes són bàsicament la menor afinitat al rLDL, la presència a la partícula de fosfolípids oxidats, també recolzat per altres estudis (Whatley 1990, Murakami 1997, Serhan 1996), i la reproducció d'algunes de les seves característiques fisico-químiques, citades al bloc A de la discussió. En aquest sentit, la PLA2, al igual que l'LDL, té la capacitat d'unir-se als PG (Anthonsen 2000, Hurt-Camejo 2001), com hi ha coexistència de les dues molècules, és possible l'acció de l'enzim sobre l'LDL (Hurt-Camejo 1997), generant-se un augment de NEFA localment.

El que sembla prou clar és que els NEFA són en una gran part responsables d'algunes de les principals característiques de l'LDL(-), com ara la major càrrega elèctrica negativa i la interacció disminuïda amb el rLDL. D'altra banda, com es comentarà posteriorment, s'ha descrit que els NEFA provoquen efectes inflamatoris sobre les cèl.lules endotelials. Això és de gran interès, ja que, a més, s'ha descrit que els NEFA activen el factor NF-kB (Henning 1996, Thurberg 1998), AP-1 (Rao 1995) i el PPAR (Forman 1997, Ares 2000), els quals indueixen gens implicats en la inflamació, i, en conseqüència els NEFA podrien ser responsables de l'efecte inflamatori que, com s'explicarà al següent apartat, posseeix l'LDL(-).

C.3 CONCLUSIONS BLOC C - RELACIÓ DE L'LDL(-) AMB ELS NEFA

- 1) La càrrega amb NEFA de l'LDL "in vitro" proporciona major càrrega elèctrica negativa a la partícula, augmentant la mobilitat electroforètica i el % d'LDL(-).
- 2) D'altra banda, provoca un diferent comportament oxidatiu depenent del contingut en NEFA, amb una càrrega equivalent a la de l'LDL(-) d'NL i HF, contràriament a l'esperable, indueix una major susceptibilitat a l'oxidació, possiblement degut a la influència d'altres factors en les LDL(-) a més dels NEFA. En canvi, amb càrregues de NEFA superiors, l'LDL va presentar una major resistència a l'oxidació.
- 3) Respecte a la interacció amb els receptors cel·lulars, l'LDL-NEFA reproduïx les característiques de l'LDL(-), ja que no induïx formació d'èsters de colesterol, però presenta una disminució en l'afinitat pel rLDL, la qual és paral·lela a l'enriquiment en NEFA.
- 4) Per tant, els resultats apunten que el major contingut en NEFA de l'LDL(-) és un dels factors que determinen, si bé no totalment, algunes de les característiques de l'LDL(-).

D- EFECTE DE L'LDL ELECTRONEGATIVA SOBRE LES CÈL·LULES ENDOTELIALS

L'endoteli vascular desenvolupa funcions de importància fisiològica vital, sent les de major relevància el manteniment d'una barrera íntegra entre els teixits i la circulació, la capacitat antitrombòtica per mitjà de la síntesi de prostaciclina i el manteniment del to vascular per la producció d'àcid nítric. No obstant això, per acció de certs estímuls pot tenir lloc una disfunció endotelial que comporta una resposta inflamatòria crònica, fet que succeeix en processos fisiopatològics com l'aterosclerosi. Les cèl·lules endotelials activades per acció de lipopolisacàrids (LPS), lipoproteïnes modificades o citoquines com IL-1 i el TNF , poden sintetitzar entre altres molècules quimioquines, molècules d'adhesió, PAF o PAI-1 (Mantovani 1992). Com les lipoproteïnes modificades poden activar l'endoteli, es va voler avaluar el possible efecte de l'LDL(-), ja que és una forma modificada present a circulació que difereix en les seves característiques de l'LDL nativa. Amb aquest objectiu es van dur a terme una sèrie d'experiments, els quals es van realitzar en dos blocs. En el primer bloc es van utilitzar fraccions d'NL i es van establir les condicions adients dels assajos en la valoració de l'agent procoagulant PAI-1 i de les quimioquines IL-8 i MCP-1. Posteriorment, al segon bloc d'experiments, es van realitzar els estudis amb HF, i NL per comparar els efectes, i es va avaluar l'acció de les fraccions sobre l'alliberament de PAI-1 i sobre el reclutament de leucòcits a dos nivells, en la producció de les quimioquines, el qual ja s'havia observat que estava augmentat en NL, i en la inducció de la molècula d'adhesió VCAM.

D.1 PRODUCCIÓ DE PAI-1

Per avaluar el potencial efecte de l'LDL(-) sobre la regulació per part de l'endoteli de l'estat de coagulació, es va estudiar la inducció de PAI-1 en cèl·lules endotelials.

Respecte a l'efecte de les lipoproteïnes sobre la síntesi de PAI-1, està ben determinat que l'VLDL indueix l'expressió de PAI-1 (Stiko-Rahm 1990, Mussoni 1992, Kaneko 1994). En canvi, hi han resultats contradictoris sobre l'efecte de la forma nativa i modificades d'LDL en els diferents treballs en la bibliografia. Quant a la forma nativa, alguns resultats indiquen que indueix l'expressió de PAI-1 (Camera 1993, Tremolli 1993), mentres que altres no observen aquest efecte (Latron 1991, Kaneko 1994). Respecte a l'LDL oxidada, es troba, en general, que l'LDL oxidada a través d'exposició a ultraviolat sí indueix PAI-1 (Latron 1991, Chautan 1993, Allison 1999). En canvi, l'LDL en la qual s'ha induït l'oxidació amb coure no augmenta la síntesi d'aquest agent procoagulant (Tremolli 1993). Possiblement els resultats divergents deuen ser conseqüència de diferències metodològiques, com ara l'aïllament i preparació de les lipoproteïnes, heterogenitat de la mostra o les condicions de cultiu cel·lular.

En la nostra primera part de l'estudi sobre la funció endotelial, és a dir la realitzada amb les fraccions provinents d'individus NL, es va avaluar l'efecte de l'LDL(-) a diferents concentracions sobre la inducció de PAI-1. Es va obtenir que amb l'LDL(+), l'LDL(-) i LDLox s'indueix la producció de PAI-1 respecte les cèl·lules no estimulades, però no hi ha un efecte diferenciat entre les fraccions d'LDL (Figura R-22c).

En el segon bloc d'experiments, en què es va estudiar la inducció de PAI-1 amb una concentració fixa de les fraccions d'HF i les d'NL per comparar, tampoc

es va observar una diferent producció de l'LDL(-) en front a la seva respectiva LDL(+) (Figura R-25c). D'altra banda, no es van observar diferències en la síntesi de PAI-1 entre HF i NL, això concordaria amb l'absència de proves a la literatura que suggereixin una major expressió de PAI-1 en HF, ja que s'ha descrit que en aquests individus l'activitat plasmàtica de PAI-1 és similar a la de la població general (Hamsten 1985). D'altra banda, el fet que l'LDL(-) no indueixi significativament l'alliberament de PAI-1 al medi no descarta que produxi una major expressió a membrana o que presenti efecte sobre altres activitats procoagulants, com ara el TF.

D.2 ATRACCIÓ DE LEUCÒCITS: QUIMIOQUINES (MCP-1 I IL-8) I MOLÈCULES D'ADHESIÓ (VCAM)

Un dels primers fenòmens que tenen lloc a l'origen de la lesió ateroscleròtica és el reclutament de leucòcits circulants cap a l'endoteli en els llocs d'inflamació. En aquest procés intervenen conjuntament les quimioquines i les molècules d'adhesió, de les quals hi ha poca expressió en condicions basals per part de les cèl·lules endotelials, però que en resposta a diferents estímuls s'indueix la seva síntesi (Mantovani 1992, Adams 1997, Price 1999).

Les quimioquines tenen un paper central en l'atracció de leucòcits a l'endoteli i en llur posterior activació. L'IL-8 ha estat clàssicament associada a l'atracció de neutròfils, implicats en una resposta inflamatòria primerenca, mentres que l'MCP-1 és quimioattractant de monòcits, amb paper principal en els processos d'inflamació crònica. Apart d'aquestes funcions ben determinades d'MCP-1 i IL-8, s'ha proposat que poden desenvolupar d'altres. En el cas d'MCP-1, atracció de limfòcits (Terkeltaub 1998), inducció de mediadors de la inflamació com IL-1 i TF (Boisvert 1997, Schechter 1997) i migració de SMC i HUVEC (Hayes 1998, Weber

1999). Respecte a l'IL-8 s'ha descrit adhesió i quimiotaxi de monòcits (Boisvert 1997 i 1998, Gerszten 1999), factor de creixement i quimioatracent per HUVEC (Koch 1990), i quimioatracent de limfòcits T (Terkeltaub 1994) i SMC (Yue 1994). El paper d'ambdues quimioquines en el procés ateroscleròtic és consistent, ja que s'ha detectat la seva presència a la lesió en regions riques en macròfags (Navab 1991, Yla-Herttuala 1991, Apostopoulous 1996, Liu 1997, Boisvert 1997).

Les molècules d'adhesió mitjançen la interacció dels leucòcits a l'endoteli i tenen una acció relacionada amb l'efecte de les quimioquines. Les quimioquines produïdes per les cèl.lules endotelials resten unides als proteoglicans del glicocàlix de l'endoteli, de manera que augmenta la seva concentració localment (Hoogewerf 1997, Hub 1998, Kuschert 1999) i promouen la migració dels leucòcits per un gradient de concentració cap a les zones d'inflamació. Un cop a l'endoteli els leucòcits experimenten una primera interacció reversible, de manera que van rodant fins que troben una senyal que els activi, com les quimioquines, les quals interaccionen mitjançant receptors específics dels leucòcits fet que provoca l'activació de les seves integrines (Weber 1996a i 1996b, Tanaka 2000). Aquestes integrines guanyen afinitat cap a altres molècules d'adhesió de l'endoteli, tipus Ig-like, que originen una unió més forta (Shattil 1997). Un cop s'ha produït aquesta unió, les quimioquines també faciliten la diapèdesi o migració a través de la barrera endotelial.

Com a resultat de tot això, es pot observar que la producció de quimioquines i de molècules d'adhesió estan íntimament interrelacionades, per això en aquest estudi s'han avaluat aquests dos factors fonamentals per l'atracció dels leucòcits a l'endoteli. L'especificitat en l'atracció d'aquests leucòcits vindrà determinada per les molècules d'adhesió i les quimioquines expressades per l'endoteli i els seus respectius receptors als leucòcits.

Entre els estímuls que indueixen la producció de quimioquines i molècules d'adhesió en cèl.lules endotelials, a part dels clàssics (IL-1, TNF, LPS), hi han d'altres descrits que activen MCP-1 i IL-8, com la homocisteïna (Podar 2001), forces de flux sanguini (Okada 1998), adhesió cel.lular amb monòcits (Lukaacs 1995) o les formes modificades d'LDL. L'LDL modificada actua sobre les cèl.lules endotelials, interaccionant amb elles a través del receptor scavenger (Havekes 1985), mentres que la forma nativa presenta poca interacció amb aquestes cèl.lules (van Hinsberg 1986). Està descrit que les LDL modificades oxidativament indueixen la producció d'MCP-1 (Cushing 1990, Navab 1991, Watson 1997), IL-8 (Schwartz 1994, Terkeltaub 1994, Claise 1996, Brand 1997) i VCAM (Kume 1992, Kim 1994, Cominacini 1997 i 1999). Tanmateix no s'havia estudiat prèviament l'acció de l'LDL electronegativa sobre la síntesi de quimioquines i/o molècules d'adhesió per part de l'endoteli.

D.2.1 IL-8 i MCP-1

En els estudis realitzats amb concentracions creixents d'NL-LDL(+), NL-LDL(-) i LDL oxidada es va observar un efecte dosi-depenent molt marcat per part de l'LDL(-) tant en l'alliberament d'MCP-1 com el d'IL-8 (Figures R-22a i 22b). Aquesta acció inductora va superar fins i tot a la de l'LDL oxidada. Com a control, el TNF va potenciar eficientment la producció de quimioquines, mentres que les cèl.lules sense tractar van presentar una producció basal molt petita. La idea de que l'LDL(-) posseeixi una acció tan potent en la inducció d'MCP-1 i IL-8, de manera que supera a la de l'LDL oxidada, es pot explicar, ja que el fet que no sigui una forma extensament oxidada no descarta que sigui més activa des del punt de vista inflamatori. En aquest sentit, s'ha descrit que l'LDL modificada mínimament és més inflamatòria que l'extensament oxidada (Cushing 1990, Berliner 1995, Navab 1996, Lee 1999).

En els estudis amb les fraccions d'HF es va utilitzar una concentració fixa d'LDL (100 mg/L), ja que en els experiments prèviament exposats ja s'havia observat que amb aquesta concentració la resposta de HUVEC era notable i es podien observar clarament les diferències amb la forma electropositiva. En HF els resultats van anar en el mateix sentit que en NL, trobant una major inducció d'MCP-1 i IL-8 per part de l'LDL(-) respecte la nativa, aproximadament del doble (Figures R-25a i 25b). En aquest cas l'LDL(-) no va superar l'efecte de l'LDL oxidada. En aquests experiments no es van observar diferències en l'acció activadora entre les fraccions d'NL i HF, cosa que indica que les diferències trobades entre les dues formes electronegatives en altres aspectes com la composició, densitat o interacció amb el receptor no comporten una diferent activitat inflamatòria. D'altra banda, el control positiu de la IL-1 va induir de forma eficaç la producció d'MCP-1 i IL-8, com ja havien comprovat prèviament amb el TNF, fet àmpliament descrit a la literatura (Mantovani 1992). En aquests experiments es confirma la inducció de quimioquines de l'LDL(-) no tan sols en NL sinó també en HF, però l'efecte no es tan marcat com en els estudis anteriors en què es van realitzar les corbes de concentració, possiblement degut a causes metodològiques. Aquestes diferències són que als experiments realitzats amb HF es va utilitzar sèrum boví fetal enlloc d'humà, 24 hores d'incubació en front a 16-18 hores, no prèvia incubació de 24 hores en medi de manteniment, incubació amb les LDL en medi amb 1% SBF versus el 4% i kits de determinació d'IL-8 i MCP-1 de diferents marques comercials. El fet d'incubar durant 24 hores a la segona tanda d'experiments, respecte a les 16 hores dels primers, dona lloc a que la producció d'MCP-1 i IL-8 sigui més elevada en ambdues fraccions, sobretot en el cas de l'LDL(+). Aquesta última observació podria ser deguda a que el major temps d'incubació podria originar quelcom d'oxidació de l'LDL, que afectaria sobretot a l'LDL(+), ja que l'LDL(-) és més resistent a l'oxidació. Aquest fet podria ser responsable de la generació d'LDL modificada a partir de la forma nativa, de manera que en la considerada com a LDL(+) s'observaria més inducció de

quimioquines, disminuint les diferències amb l'LDL(-). D'altra banda, el diferent nivell en la inducció de l'LDL oxidada respecte a l'LDL(-) pot ser degut a un diferent grau d'oxidació en l'LDL oxidada "in vitro". De manera que, en la primera tanda d'experiments és probable que l'LDL estigués més extensament oxidada que als següents experiments, on l'LDL devia ser més aviat mínimament oxidada, la qual està descrit que presenta un major efecte aterogènic, entre d'altres motius perquè indueix més fortament l'expressió de quimioquines (Berliner 1995).

Es va comprovar que l'efecte de les LDL era específic i no era degut a contaminació amb lipopolisacàrids (LPS), ja que no es van trobar nivells detectables d'LPS a les mostres ni es va produir disminució de l'efecte per l'addició de polimixina B, un inhibidor dels LPS.

D'altra banda, la inducció d'MCP-1 i IL-8 per part de l'LDL(-) d'NL va tenir lloc sense inducció de citotoxicitat a HUVEC, ni a les concentracions més elevades de l'assaig, o a les 48 hores d'incubació (Figures R-24a i 24b). Com es va descartar l'efecte citotòxic en NL i l'acció de la fracció electronegativa d'HF va ser similar a la d'NL, almenys en la producció de quimioquines, no es va avaluar la viabilitat de les cèl.lules incubades amb HF-LDL(-) pels mateixos mètodes que en NL. No obstant, mitjançant el seguiment per microscopia òptica no es va trobar cap indicatiu que suggerís inducció de necrosi o dany cel.lular. Tanmateix, en els primers experiments més exhaustius de citotoxicitat, la concentració de 210 mg/L d'LDLox al temps d'incubació de 24 hores ja va produir alguns efectes com desenganxament de les cèl.lules, i a les 48 hores l'efecte citotòxic ja era bastant significatiu. Aquest efecte tòxic de l'LDLox és paral·lel al trobat incubant amb 7-hidroxicolesterol, el qual produeix dany sobre HUVEC de manera concentració i temps dependent. Es pot concloure doncs, que l'efecte citotòxic de la forma oxidada és degut al seu contingut en productes finals de l'oxidació com els oxisterols. Per tant, com l'LDL(-) no produeix toxicitat a HUVEC, no deu contenir aquest tipus de

composts oxidatius, cosa que confirma indirectament les nostres dades de la caracterització fisicoquímica, les quals indicaven que l'LDL(-) no és una forma extensament oxidada. Aquests resultats que descarten la inducció de citotoxicitat per l'LDL(-) es troben en contradicció amb altres trobats prèviament (Hodis 1994, Sevanian 1995, Demuth 1996). Contrastant molt amb els nostres resultats, en alguns dels treballs (Hodis 1994, Sevanian 1995) s'atribueix la citotoxicitat en aorta de conill a l'elevat contingut en colesterol oxidat, superior al 30%, de l'LDL electronegativa. D'altra banda, el grup de Moatti, que defensa la postura de que l'LDL electronegativa no presenta un grau important d'oxidació, també descriuen que aquesta partícula provoca mortalitat cel.lular en HUVEC (Demuth 1996). De totes maneres, val a dir que l'efecte sobre les cèl.lules dependrà molt de l'estat del cultiu cel.lular i de les condicions d'assaig, en el nostre cas es va treballar amb cèl.lules confluents i amb un 4% de sèrum humà al medi de cultiu, mentres que en els altres estudis es van utilitzar cèl.lules en estat de subconfluència i en absència de sèrum, factors que poden provocar molt fortament una menor viabilitat cel.lular i una major vulnerabilitat per part de les cèl.lules a factors externs.

La inducció d'MCP-1 i IL-8 en absència de citotoxicitat per part de l'LDL(-), pot tenir una gran relevància, ja que fins ara no havia cap estudi en què es describís que la partícula presentés aquestes característiques aterogèniques. A més, aquest efecte ja es produeix amb concentracions fisiològiques d'LDL(-), ja que, per exemple al cas de normolipèmics, considerant que el plasma presenta una concentració de 1 g/L apoB, i que l'LDL(-) representa al voltant d'un 6% de l'LDL total, això implicaria que la concentració d'LDL(-) plasmàtica seria d'uns 60 mg/L apoB, a la qual ja presenta un efecte diferenciat de l'LDL(+). Com en augmentar la concentració també té lloc paral·lelament un increment en la síntesi de quimioquines, aquest fet explicaria la situació d'algunes patologies, com els HF, en què es troba augmentada la proporció d'LDL electronegativa i en què està descrit que hi ha disfunció endotelial.

S'ha associat l'hipercolesterolèmia amb disfunció endotelial i canvis en l'expressió gènica de les cèl·lules endotelials (Vogel 1997). També s'ha descrit activació d'altres cèl·lules vasculars en condicions d'hipercolesterolèmia, com un increment de producció d'MCP-1 en SMC (Yu 1992) o la presència de monòcits funcionalment alterats en HF, els quals tenen una major resposta a factors inflamatoris i una major adhesió a l'endoteli (Weber 1997, Kimura 1997). A més, s'ha determinat que l'LDL augmenta la resposta a estímuls inflamatoris, de manera que un increment en la concentració d'LDL, com succeeix en l'hipercolesterolèmia, genera una hiperresposta a insults proinflamatoris, com per exemple una major producció de VCAM induïda per IL-1 (Zhu 1999). L'LDL també afecta a l'expressió de CCR2 (Han 1998), i nivells augmentats d'LDL com en HF es relacionen amb un increment en CCR2 (Han 1999) que també generaria una major migració de monòcits mitjançat per MCP-1. Aquests efectes i d'altres descrits en hipercolesterolèmia poden ser deguts als valors augmentats d'LDL total, però també podria estar implicada l'LDL(-) de dues possibles maneres: que l'HF-LDL(-) fos més aterogènica que la d'NL, o bé que l'acció aterogènica vingués determinada per la major proporció d'LDL(-) dels HF. Els nostres resultats suggereixen que la major disfunció endotelial en HF pot venir determinada per l'increment en concentració plasmàtica d'LDL(-), ja que aquests individus tenen més quantitat d'LDL i d'aquesta, l'LDL(-) representa un percentatge més gran que en el cas d'NL. Com a conseqüència global, en els HF hi ha presència d'una major quantitat d'LDL(-), la qual comportarà una major producció de quimioquines i potser d'altres factors inflamatoris no estudiats en aquesta tesi.

De totes maneres cal recordar que aquests experiments són realitzats "in vitro" en cultius d'HUVEC, i que, en conseqüència, no es pot tenir la certesa de que reproduxi exactament la situació "in vivo" a l'endoteli.

D.2.2 EXPRESSIÓ DE VCAM

Referent a les molècules d'adhesió, es va estudiar l'expressió de VCAM induïda per l'LDL(-). LA VCAM és la responsable de la unió a l'endoteli dels monòcits i els limfòcits, mentres que la ICAM mitjança la dels neutròfils (Albeda 1994). Malgrat que s'ha atribuït a l'IL-8 la capacitat d'atracció de neutròfils, es coneix que aquestes cèl.lules estan més aviat implicades en respostes agudes en front a infeccions, però que la seva acció en el procés ateroscleròtic pot ser qüestionada, ja que la detecció de neutròfils a la lesió és força escassa (Quinn 1988, Ross 1993). Per tant, sembla que l'IL-8 actuaria més aviat com a quimioatracient de monòcits (Boisvert 1997 i 1998) i limfòcits T, sobre aquests últims exerceix el seu efecte a una concentració 10 vegades inferior que pels neutròfils (Larsen 1989). Les cèl.lules T es troben a la lesió, podent representar fins a un 20% (Jonasson 1986). Els limfòcits, al igual que els monòcits, s'uneixen a l'endoteli a través de VCAM, per tant, es va avaluar als nostres assajos l'expressió d'aquesta molècula d'adhesió, i no la de ICAM-1. A més, l'MCP-1 també està implicada en l'atracció de monòcits, que s'uneixen a través de VCAM.

Contràriament al fenomen observat amb l'LDL oxidada, la qual indueix VCAM (Kume 1992, Cominacini 1997 i 1999), l'LDL(-) no provoca expressió d'aquesta molècula d'adhesió (Figura R-26). De totes maneres, l'LDL(-) és més semblant a una LDLmm que a una LDLox, i s'ha descrit que l'LDLmm s'uneix a l'endoteli a través d'altres molècules diferents de VCAM (Kim 1994). D'altra banda, es va observar que a concentracions elevades d'LDL nativa s'indueix VCAM-1, fet ja descrit a la literatura (Lin 1996). Com en HUVEC es dona una certa expressió constitutiva de VCAM (Adams 1997), si per acció de les quimioquines, que són induïdes per LDL(-), s'activa en els leucòcits la integrina que interacciona amb VCAM, el possible efecte global seria el d'una major adhesió a la superfície endotelial per activació leucocitària, independentement de que no s'expressi més

VCAM. També com a conseqüència de l'activació dels leucòcits per les quimioquines s'afavoriria el procés de diapèdesi o transmigració cap a la íntima endotelial.

D.3 POSSIBLES MECANISMES QUE MITJANÇIN L'ACCIÓ DE L'LDL(-). ÚS D'INHIBIDORS

L'alliberament augmentat d'MCP-1 i IL-8 induït per l'LDL(-) pot ser degut a diverses causes, una d'elles seria la interacció amb determinats receptors i altra l'existència de components propis en la partícula que desencadenin la resposta.

Respecte a la unió de l'LDL(-) als possibles receptors, d'una banda, sembla que, segons els estudis d'unió al rLDL, la partícula presenta una afinitat minvada respecte a la forma nativa, però tampoc està prou modificada com per ser captada a través del SRAII. El fet que l'LDL(-) promogui un major alliberament d'MCP-1 i IL-8 que la forma electropositiva, però que la seva afinitat cap al rLDL estigui disminuïda fa poc probable que l'efecte sigui per mitjà d'aquest receptor, el qual s'expressa en baixos nivells en cèl.lules endotelials (Kenagy 1994). No es pot descartar, però, que produxi el seu efecte a través del rLDL, ja que, encara que la unió sigui menys eficaç, per components propis de l'LDL(-) es podrien activar una sèrie de gens implicats en el seu efecte. Tanmateix, en aquest treball de tesi no s'ha aprofundit si l'efecte inductor de quimioquines de l'LDL(-) és a través de la interacció amb el rLDL o amb algun tipus de SR que es trobi a les HUVEC, les quals expressen LOX, CD36 i SREC (Moriwaki 1998, Kerkhoff 2001, Adachi 1997).

Independentment de la possible interacció de la partícula amb un receptor de lipoproteïnes en HUVEC, es va tractar de discernir el mecanisme pel qual l'LDL(-) exerceix la inducció d'IL-8 i MCP-1, utilitzant diferents molècules per testar el seu

efecte inhibitori i descobrir quin/s components de l'LDL(-) podrien desencadenar la resposta d'activació de l'endoteli. Es van utilitzar inhibidors de compostos derivats de peroxidació lipídica, ja que la inducció de l'alliberament d'MCP-1 i IL-8 és un fenomen associat a LDL oxidada i mínimament modificada, però no a LDL nativa. Hi han estudis previs que indiquen que l'estat REDOX cel.lular està relacionat amb activació de les cèl.lules endotelials i la producció de quimioquines. D'una banda es descriu que les espècies reactives d'oxigen activen i que el tocoferol inhibeix la producció de molècules d'adhesió i IL-8 (Roebuck 1999, Wu 1999). Altre antecedent important és el treball de Claise (Claise 1996) en el qual es demostra que en la inducció d'IL-8 en una línia cel.lular d'endotelials per part de l'LDL oxidada està implicat l'estrés oxidatiu, i que, concretament, desenvolupa un paper central el cicle REDOX del glutatió, el qual duu a terme l'efecte de contrarestar la lipoperoxidació i els radicals lipoperòxids.

Els nostres resultats respecte a l'estudi de les característiques oxidatives de l'LDL(-) no són indicatius de que es tracti d'una forma que presenti un estat d'oxidació avançat, però no es pot descartar que contingui compostos del tipus fosfolípids oxidats amb potent activitat biològica. Amb l'objectiu de discernir si l'LDL(-) exerceix el seu efecte a través de components de caràcter oxidatiu, es van testar diferents inhibidors de l'oxidació, concretament dos captadors de radicals lliures: el BHT i el NAC, sent aquest últim, a més, precursor del glutatió, i l'antagonista del receptor del PAF anomenat BN-50730. El resultat de l'ús d'aquests compostos es pot observar a les Figures R-23a i 23b.

El NAC és un captador de radicals lliures i a més incrementa el potencial antioxidant de les cèl.lules, ja que és precursor del glutatió i incrementa el seu nivell intracel.lular (Brunet 1995). El NAC va inhibir en més d'un 60% l'efecte de l'LDL oxidada i també el de l'LDL(-). A més també va produir una inhibició superior al 70% de l'efecte del TNF . La inhibició pel NAC suggereix que la producció de

quimioquines estimulada per l'LDL(-) està relacionada amb processos oxidatius, ja que aquest efecte inhibitori coincideix amb els resultats trobats en la inducció d'IL-8 per LDL oxidada (Claise 1996) i pel TNF (Muñoz 1996). L'estat REDOX del glutatió sembla tenir un paper important en la regulació de la producció de quimioquines. Altra dada confirmatòria del paper del glutatió és que la glutatió peroxidasa també inhibeix la inducció d'IL-8 (Claise 1996).

El BHT neutralitza els radicals lliures derivats de lipoperòxids continguts en l'LDL oxidada. La preincubació de l'LDL amb BHT abans de la seva addició a HUVEC va tenir un petit efecte sobre l'alliberament d'MCP-1 i IL-8, el qual, contràriament a l'obtingut amb el NAC, només va resultar significatiu al cas de l'LDL oxidada. Quan es va afegir el BHT simultàniament a les LDL al cultiu, el compost no va exercir cap efecte inhibitori. Aquests resultats semblen indicar que l'LDL oxidada i l'LDL(-) poden presentar un diferent mecanisme d'inducció de quimioquines, ja que l'LDLox actuaria mitjançant lipoperoxidació, mentre que l'LDL(-) tindria altra via d'acció. Aquests resultats contrastarien amb els del NAC, però tampoc es pot descartar la hipòtesi de que l'LDL(-) presenti un petit nivell de lipoperòxids, i que, degut a la seva acció, les EC produïxin més radicals lliures, amplificant-se l'efecte i alterant l'estat REDOX, fet que podria activar el gens de les quimioquines. Tanmateix, l'acció de l'LDL(-) podria ser deguda a la presència d'altres compostos bioactius que no desencadenen cadenes lipoperoxidatives. Entre aquests compostos es podria trobar el PAF o les molècules PAF-like .

El PAF, factor activador de plaquetes, és un fosfolípid fraccionat, concretament un alquil-acetil-glicerol-fosfocolina. Hi han diferents molècules del tipus "PAF-like", que consisteix en fosfatidilcolina amb el grup 2 fragmentat per oxidació de l'àcid gras a diferents nivells, de manera que pot presentar en aquesta posició un grup metil, hidroxil, aldehídic o carboxílic (Tokumora 2000). El PAF és l'agonista fosfolipídic de més relevància en events fisiopatològics inflamatoris com

l'aterosclerosi, posseint efecte trombogènic sobre plaquetes, en les quals indueix agregació, o sobre les cèl.lules endotelials, induint la producció de citoquines proinflamatòries i radicals lliures (Evangelou 1994).

El PAF realitza el seu efecte en les cèl.lules que expressen el receptor específic anomenat receptor del PAF (rPAF). El rPAF és un receptor acoblat a proteïnes G que presenta set dominis transmembrana, contenint al domini citoplasmàtic residus serina i treonina (Shukla 1992). En interaccionar el PAF amb el rPAF s'activen una sèrie de senyals implicades en la transcripció de gens de resposta ràpida. La transmissió d'aquestes senyals semblen originar-se a través de proteïnes G i activació de tirosines quinases, fet que a la vegada pot activar les fosfolipases C, A2 i D (Shukla 1992).

Les cèl.lules sintetitzen PAF en resposta a diferents estímuls en processos patofisiològics (Prescott 1990, Whatley 1990). Però també l'LDL mínimament modificada conté PAF i gran part dels seus efectes proinflamatoris els realitza a través d'aquest compost (Lehr 1993, Leitinger 1999). Hi han diferents treballs en què es descriu que a través del PAF s'indueixen processos d'adhesió de leucòcits a cèl.lules endotelials (Zimmerman 1996, Chao 1993, Lee 1999). Aquests fets suggereixen que també el poder inductor de quimioquines de l'LDL(-) podria estar mitjançat a través del PAF o altres fosfolípids fragmentats, els quals està descrit que indueixen l'expressió d'MCP-1 i IL-8 (Yeh 2001). En diversos estudis s'ha observat que amb antagonistes del receptor s'inhibeix l'efecte del PAF (Frostedgard 1997, Lee 1999). Aquest va ser el criteri per avaluar el possible rol del PAF en els efectes originats per l'LDL(-). Es va utilitzar un antagonista del receptor del PAF, concretament el BN-50730, obtenint que amb concentracions creixents d'aquest antagonista es va produir una inhibició en la producció d'MCP-1 i IL-8 depenent de concentració. A una concentració de BN-50730 de 10 µmol/L ja s'observà una inhibició del 50% de l'efecte induït per l'LDL(-) i també per l'LDLox. Això suggereix

que en el cas de l'LDL(-), el PAF pot ser, com a mínim en part, responsable de la inducció de quimioquines. La possibilitat que l'LDL(-) realitzi el seus efectes a través del PAF suggereix que és una partícula amb un potencial aterogènic considerable.

Val a dir, que el fet que l'LDL(-) contingui PAF o altres fosfolípids oxidats que generin resposta biològica no està en contradicció amb les nostres dades de que la partícula no estigui oxidada. No es pot deduir, però, si l'LDL(-) conté PAF o molècules "PAF-like", o bé indueix la producció de PAF per part de les HUVEC. Si realment l'LDL(-) conté més PAF es pot suggerir que podria ser degut a que la partícula presenta una menor activitat PAF acetil hidrolasa (PAF-AH). El PAF s'inactiva per mitjà d'aquest enzim, el qual hidrolitza el grup acetil a la posició 2, donant lloc a lisoPAF que és menys actiu. La PAF-AH es troba associat sobretot més a LDL que a HDL (Stafforini 1987, Steinbrecher 1989), l'associació té lloc a través de dos dominis d'unió específics de l'enzim a l'extrem C-terminal de l'apoB (Stafforini 1999a i b). Com s'ha descrit que l'LDL electronegativa presenta alteracions en la conformació respecte a la forma nativa (Parasassi 2001) es pot hipotetitzar que aquest fet podria comportar una menor capacitat d'associació amb la PAF-AH, amb el conseqüent augment en el contingut de PAF a la partícula.

Els resultats comentats anteriorment suggereixen que l'LDL(-), per una banda, exerceix els seus efectes a través de compostos del tipus "PAF-like" que interaccionen específicament amb el rPAF desencadenant diferents possibles senyals intracel·lulars. D'altra banda, la inhibició en la producció d'MCP-1 i IL-8 pel NAC suggereix la implicació de l'estrés oxidatiu cel·lular en l'efecte de l'LDL(-). És possible que hagin variats mecanismes, potser relacionats entre ells, que mitjançin l'efecte d'aquesta partícula.

L'ús de l'inhibidor de la transcripció actinomicina D, va inhibir l'efecte de l'LDL(-) sobre la producció d'IL-8 i MCP-1 fins a un 80%, assolint valors similars als trobats amb la forma electropositiva. Això ens indica que probablement l'efecte de l'LDL(-) implicava transcripció dels gens d'IL-8 i MCP-1. Així doncs, l'LDL(-) no comporta activació de les quimioquines ja sintetitzades, sinó que l'augment en l'alliberament ve determinat per síntesi de novo, degut a inducció en la transcripció. Aquesta inducció de l'expressió dels gens d'MCP-1 i IL-8 per l'LDL(-) deu estar mitjançada per l'activació de factors de transcripció.

Altre dels candidats que podrien mitjançar l'efecte de l'LDL(-) serien els NEFA, els quals es troben augmentats en la partícula i es coneix que presenten efecte inflamatori sobre les cèl·lules endotelials, a nivell de citotoxicitat i disfunció cel·lular (Zilvermit 1973, Wenzel 1978, Henning 1996, Chung 1998). També es coneix que els NEFA estan implicats en l'activació d'alguns factors de transcripció com el NF- κ B (Henning 1996, Thurberg 1998) i els PPAR (Forman 1997, Ares 2000). Per tant l'LDL(-) podria induir expressió de gens inflamatoris mitjançant aquests factors de transcripció degut al seu contingut augmentat en NEFA. Tanmateix, la identitat dels possibles factors de transcripció relacionats amb l'efecte de l'LDL(-) encara no s'ha estudiat, però es té com a futur objectiu de les nostres investigacions. De totes maneres, hi han algunes dades que ens permeten especular sobre el paper d'aquests diferents factors.

D.4 FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ

Diversos indicis suggereixen que en la inducció d'MCP-1 i IL-8 en HUVEC per part de l'LDL(-) es pot trobar involucrat el factor de transcripció NF- κ B. Aquest factor és responsable de l'activació de varis gens relacionats amb el procés ateroscleròtic. Entre d'altres, els promotors dels gens d'MCP-1 i IL-8 presenten

llocs d'unió per NF-kB (Thurberg 1998, Terkeltaub 1998) i, a més, es coneix que l'efecte de l'LDL oxidada en la inducció d'aquestes quimioquines és també a través d'NF-kB (Brand 1997, Landry 1997, Marumo 1997). L'LDL(-) també induïx la transcripció dels gens d'IL-8 i MCP-1, però no l'expressió de PAI-1, el qual sembla estar induït pel AP-1 i no pel NF-kB (Deescheemaker 1992). Una via d'activació del factor NF-kB és a través de la inducció d'estrés oxidatiu, ja que està descrit que l'activa (Canty 1999). Això també ho suggereix la inhibició de l'efecte de l'LDL(-) produït per NAC, al igual que en el cas de l'LDL oxidada (Claise 1996). A més, la NAC també inhibeix la inducció de citoquines a través de TNF (Muñoz 1996), impedit l'activació de NF-kB. No obstant totes aquestes dades que podrien fer pensar en la implicació de NF-kB, en el nostre cas no hi han proves directes de la seva activació. És més, indirectament, el fet que l'LDL(-) no induïx expressió de VCAM està en contra de l'activació de NF-kB, ja que aquesta molècula d'adhesió s'activa a través d'aquest factor de transcripció. El fet que en l'efecte de l'LDL(-) estigui implicats els productes d'oxidació lipídica, sense activació de NF-kB, no té perquè ser contradictori, ja que l'LDL(-) pot tenir un cert contingut en fosfolípids oxidats o altres components amb activitat biològica, però que són insuficients per a generar l'activació del factor de transcripció NF-kB.

Apart del NF-kB, existeixen altres factors de transcripció amb relevància en l'expressió de gens implicats en l'aterosclerosi. Aquests factors de transcripció, els PPAR i el AP-1, podrien activar-se per acció de l'LDL(-) i mitjançar l'efecte inductor de quimioquines d'aquesta partícula. En aquest aspecte hi han treballs que confirmen l'implicació d'aquests altres factors de transcripció, com el de l'AP-1 en l'expressió de molècules d'adhesió, IL-8 i MCP-1 (Martin 1997, Roebuck 1999, Wang 1999) i el de PPAR en mitjançar l'efecte d'LDLmm en la inducció de MCP-1 i IL-8 en endotelials d'aorta humana (Lee 2000). Respecte a la inducció per l'LDL, contràriament al NF-kB que sembla més relacionada amb l'LDL_{ox}, l'AP-1 està principalment activat per LDL nativa (Zhu 1998b). Està descrit que el PPAR

mitjança l'efecte de l'LDLmm i els fosfolípids oxidats en la inducció d'IL-8 i MCP-1 (Lee 2000). En canvi, sembla descartat el paper del PPAR en aquest aspecte, ja que està descrit que aquest factor de transcripció inhibeix l'expressió de quimioquines (Marx 2000) i indueix la de PAI-1 (Marx 1999), efectes contraris al que produeix l'LDL(-).

De totes maneres, és difícil discernir quins podrien ser els factors de transcripció implicats, ja que hi han moltes senyals reguladores en la transcripció dels gens i a més els factors de transcripció de vegades estan relacionats entre ells, podent presentar un efecte sinèrgic (Martin 1997, Zhu 1999).

D'altra banda, podria ser que per efecte de l'LDL(-) no s'activi directament la transcripció dels gens d'MCP-1 i IL-8, sinó que la seva acció pot desencadenar l'activació de citoquines de "primera onada" com l'IL-1 o el TNF, les quals poden ser produïdes per les cèl.lules endotelials en resposta a l'exposició exposades a certs estímuls (Mantovani 1992), com podria ser l'LDL(-), i un dels seus efectes és la inducció de les esmentades quimioquines. Això no obstant, existeixen alguns estudis que mostren inducció d'MCP-1 i IL-8 de manera independent a la producció d'IL-1 o el TNF en HUVEC (Lukaacs 1995) i en monòcits (Terkeltaub 1994). A més, aquestes citoquines activen l'expressió de VCAM, mentre que l'LDL(-) no, fet que sembla que descarta la producció d'IL-1 i TNF com a mediadors de l'efecte de l'LDL(-).

No hi han bases sòlides per hipotetitzar respecte a les possibles vies de transmissió de senyals induïdes per l'LDL(-), les quals acabarien desencadenant en la transcripció dels gens. Tanmateix pot ser qualsevol de les vies proposades en l'activació per la interacció del PAF amb el seu receptor. Algunes vies que semblen estar implicades en la transmissió de senyals que comporta l'activació de quimioquines per certs estímuls són la PLC, la PKC i tirosínquinasa (Okada 1998), les quals coincideixen amb les que es poden activar a través del rPAF.

D.5 POSSIBLE RELEVÀNCIA FISIOPATOLÒGICA DE L'ACCIÓ DE L'LDL(-)

Respecte a l'efecte inductor de l'LDL(-) sobre l'alliberament d'MCP-1 i IL-8 cal remarcar que aquests estudis estan realitzats "in vitro" i per tant no es pot preveure l'efecte "in vivo", on 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. D'altra banda, referent a les molècules d'adhesió, el fet que l'LDL(-) no indueix VCAM no descarta que pogués induir altres molècules d'adhesió per part de l'endoteli. No s'observa un diferent efecte en la inducció de PAI-1 entre les fraccions d'LDL, però això no implica que l'LDL(-) no exerceixi acció sobre l'activitat d'altres factors procoagulants. Aquests serien aspectes d'interés a valorar respecte la funció endotelial, conjuntament amb altres, com per exemple substàncies que controlen el to vascular com la prostaciclina, l'òxid nítric o l'endotelina.

En la síntesi de quimioquines, en aquest estudi s'ha valorat l'alliberament d'MCP-1 i IL-8 induït per l'LDL(-), però no s'ha avaluat l'efecte biològic resultant d'aquesta acció, és a dir l'atracció de leucòcits, que en principi ha de ser proporcional a la producció de quimioquines. Aquest efecte es podria amplificar si l'LDL(-) afectés a més induint l'expressió en leucòcits del receptor d'aquestes quimioquines, és a dir CCR2 per MCP-1 i CXCR2 per IL-8. Aquests leucòcits, a més, podrien activar-se per acció de l'LDL(-) i produir citoquines amb efecte sobre les cèl.lules endotelials. A més de la possible activació de leucòcits, l'LDL(-) també podria actuar sobre cèl.lules vasculares presents a la lesió com els macròfags i les SMC, cèl.lules que són una font de producció de factors inflamatoris i per tant tenen un paper relevant en l'evolució de l'aterosclerosi. Està descrit que els macròfags a les zones de lesió produeixen IL-8 (Terkeltaub 1994, Apostopoulos 1996, Wang 1996) i a més sintetitzen MCP-1 (Yu 1992). A més, els macròfags activats també

sintetitzen IL-1 i TNF , citoquines de primera onada que indueixen la producció d'altres factors i que són activadores de les cèl.lules endotelials. Per aquests motius, seria molt interessant l'estudi dels efectes de l'LDL(-) sobre altres cèl.lules relacionades amb el procés ateroscleròtic, diferents de les endotelials, ja que aleshores l'atracció dels leucòcits induïda per l'LDL electronegativa seria a dos nivells, primer induïnt l'atracció dels leucòcits circulants a la superfície endotelial i activació per acció de les quimioquines produïdes per l'endoteli, i segon la diapèdesi i migració a l'espai subendotelial dels leucòcits prèviament adherits a l'endoteli mitjançant per les quimioquines alliberades pels macròfags o SMC (Adams 1997).

D.6 CONCLUSIONS BLOC D - EFECTES SOBRE LES CÈL.LULES ENDOTELIALS

- 1) L'LDL(-) activa l'endoteli induint l'expressió de les quimioquines IL-8 i MCP-1, que intervendran en la quimiotaxi i activació dels leucòcits, originant una resposta inflamatòria. Tanmateix no presenta efecte en la producció de VCAM ni en la de PAI-1.
- 2) L'efecte inductor de quimioquines que desenvolupa l'LDL(-) té lloc sense producció de citotoxicitat, de manera que possiblement induiria una disfunció endotelial sense produir dany físic o denudació de l'endoteli, fet que, segons les últimes revisions de la teoria de resposta a la lesió de Ross i col.laboradors (Ross 1999), pot originar una lesió ateroscleròtica per sí.
- 3) Els experiments realitzats amb inhibidors indiquen que en l'efecte de l'LDL(-) sobre la síntesi d'MCP-1 i IL-8 pot estar implicat el PAF o substàncies "PAF-like". També hi pot contribuir la generació de radicals lliures intracel.lulars.

CONCLUSIONS FINALS

CONCLUSIONS FINALS

- 1) Existeixen discrepàncies en l'estudi de l'LDL electronegativa entre els grups d'investigació. Els nostres resultats mostren que segons l'individu, NL o HF, l'LDL(-) presenta diferències en densitat, grandària i composició. Aquestes dades apunten que l'LDL(-) és una partícula heterogènia depenent del seu origen.
- 2) Els resultats no expressen evidències de que l'LDL(-) de NL i HF sigui una forma amb un grau d'oxidació important, sinó que l'increment en càrrega negativa es deu a altres causes, com el major increment en àcid siàlic, apos CIII i E, TG i NEFA.
- 3) L'afinitat pel rLDL de l'LDL(-) està disminuïda respecte a la forma nativa, fet que suggereix un major temps a circulació de la partícula. Això comportarà que la LDL(-) estigui exposada a altres modificacions que poden a la vegada alterar més les seves propietats.
- 4) L'LDL carregada amb NEFA "in vitro" reproduïx algunes de les característiques de l'LDL(-). Això suggereix que l'enriquiment de l'LDL amb NEFA "in vivo" podria estar implicat en la generació de l'LDL(-).
- 5) L'LDL(-), tant en NL com en HF, presenta característiques inflamatòries, ja que induïx la producció de les quimioquines MCP-1 i IL-8 per part de cèl.lules endotelials en cultiu.

- 6) El mecanisme d'acció de l'LDL(-) en l'alliberament d'MCP-1 i IL-8 podria estar relacionat amb la generació de radicals lliures intracel.lulars i la presència de productes tipus "PAF-like".

BIBLIOGRAFIA

- Abuja 1999.** Abuja PM, Lohner K, Prassl R. *Modification of the lipid-protein interaction in human low-density lipoprotein destabilizes apo B-100 and decreases oxidizability.* Biochemistry 1999; 38: 3401-8.
- Acton 1994.** Acton S, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. *Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor.* J Biol Chem.1994; 269: 21003-9.
- Acton 1996.** Acton S, Rigotti A, Landschutz KT, Hobbs HH, Krieger M. *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor.* Science 1996; 271: 518-20.
- Adachi 1997.** Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. *Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells.* J Biol Chem 1997; 272: 31217-20.
- Adams 1997.** Adams DH, Lloyd AR. *Chemokines: leucocyte recruitment cytokines.* Lancet 1997; 349: 490-5.
- Agnani 1991.** Agnani G, Bard JM, Candelier L, Delattre S, Fruchart JC, Clavey V. *Interaction of LpB, LpB:E, LpB:CIII, LpB:E:CIII lipoproteins with the low density lipoproteins receptor of HeLa cells.* Arterioscler Thromb 1991; 11: 1021-9.
- Ailhaud 1993.** Ailhaud G. *Regulation of gene expression by fatty acids in the adipose cell.* Prostaglandins Leukotriens Essent Fatty Acids 1993; 48: 89-90.
- Albeda 1994.** Albeda SM, Smith CW, Ward PA. *Adhesion molecules and inflammatory injury.* FASEB J 1994; 8: 504-12.
- Allison 1999.** Allison BA, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A, Eriksson P. *Effects of native, triglyceride-enriched, and oxidatively modified LDL on plasminogen activator inhibitor-1 expression in huma endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 1354-60.
- Anber 1996.** Anber V, Griffin BA, McConnell M, Sheperd J, Packard C. *Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile and interaction between low density lipoproteins with human arterial proteoglycans.* Atherosclerosis 1996; 190: 189-99.

- Angel 1991.** Angel P, Karin M. *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transfromation.* Biochim Biophys Acta 1991; 1072: 129-57.
- Antischk w 1913.** Antischk w N, Chalatow S. * ber experimentelle cholestinstatose und ihre bedeutung f r die entstehung einiger pathologische.* Centralbl Allg Pathol 1913; 24: 1.
- Anthonsen 2000.** Anthonsen MW, Stengel D, Hourton D, Ninio E, Johansen B. *Midly oxidized LDL induces expression of group Ila secretory phospholipase A2 in human monocyte-derived macrophages.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 1276-82.
- Ant n 1998.** Ant n R, PuigL, Esgleyes T, de Moragas JM, Vila L. *Occurence of hepoxilins and trioxilins in psoriatic lesions.* J Invest Dermatol 1998; 110: 303-10.
- Ant n 2002.** Ant n R, Camacho M, Puig L, Vila L. *Hepoxilin B3 and its enzymatically-formed derivative trioxilin B3 are incorporated into phospholipids in psoriatic lesiona.* J Invest Dermatol (in press)
- Apostopoulos 1996.** Apostopoulos J, Davenport P, Tipping PG. *Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 1007-12.
- Aqel 1985.** Aqel NM, Ball RY, Waldmann H, Mitchinson MJ. *Identification of macrophages and smooth muscle cells in human atherosclerosis using monoclonal antibodies.* J Pathol 1985; 146: 197-204.
- Arad 1992.** Arad Y, Rumsey SC, Galeano NF, Al-Haideri M, Walsh MT, Marcel YL, Milne RW, Kwiterovich RW, Deckelbaum RJ. *HDL has optimal size for maximal binding to the LDLr.* Circulation 1992; 86: 2194.
- Arai 1989.** Arai H, Kita T, Yokode M, Narumiya S, Kawai C. *Multiple receptors for modified low density lipoproteins in mouse peritoneal macrophages: different uptake mechanisms for acetylated and oxidized low density lipoproteins.* Biochem Biophys Res Comm 1989; 159: 1375-82.

- Ares 1995.** Ares MPS, Kallin B, Eriksson P, Nilsson J. *Oxidized low-density lipoprotein induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor-kB in human vascular smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15: 1584-90.
- Ares 2000.** Ares MP. *Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins.* Curr Opin Lipidol 2000; 11: 563-5.
- Aviram 1988.** Aviram M, Lund-Katz S, Phillips MC, Chait A. *The influence of the triglyceride content of the low density lipoprotein on the interaction of apolipoprotein B-100 with cells.* J Biol Chem 1988; 263: 16842-48.
- Avogaro 1988.** Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G. *Presence of a modified low density lipoprotein in humans.* Arteriosclerosis 1988; 8: 79-87.
- Avogaro 1991.** Avogaro P, Cazzolato G, Bittolo-Bon G. *Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma.* Atherosclerosis 1991; 91: 163-71.
- Baeuerle 1994.** Baeuerle PA, Henkel T. *Function and activation of NF-kB in the immune system.* Annu Rev Immunol 1994; 12: 141-79.
- Bailey 1997.** Bailey AL, Wortley G, Southon S. *Measurement of aldehydes in low-density lipoprotein by high performance liquid chromatography.* Free Rad Biol Med 1997; 23: 1078-85.
- Bañuelos 1995.** Bañuelos S, Arrondo JL, Goni FM, Pifat G. *Surface-core relationships in human low density lipoprotein as studied by infrared spectroscopy.* J Biol Chem 1995; 270: 9192-96.
- Basu 1976.** Basu SK, Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. *Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73: 3178-82.

- Benítez 2002.** Benítez S, Sánchez-Quesada JL, Lucero L, Arcelus R, Ribas V, Jorba O, Castellví A, Alonso E, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J. *Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids.* *Atherosclerosis* 2002; 160: 223-32.
- Berliner 1990.** Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM. *Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions.* *J Clin Invest* 1990; 85: 1260-6.
- Berliner 1995.** Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. *Atherosclerosis: Basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics.* *Circulation* 1995; 91: 2488-96.
- Bihain 1989.** Bihain BE, Deckelbaum RJ, Yen FT, Gleeson AM, Carpentier YA, Witte LD. *Unesterified fatty acids inhibit the binding of low density lipoproteins to the human fibroblast low density lipoprotein receptor.* *J Biol Chem* 1989; 264: 17316-21.
- Bittolo-Bon 1999.** Bittolo-Bon G, Cazzolato G. *Analytical capillary isotachopheresis of total plasma lipoproteins: a new tool to identify atherogenic low density lipoproteins.* *J Lipid Res* 1999; 40: 170-7.
- Bligh 1959.** Bligh EG, Dyer WJ. *A rapid method of total lipid extraction and purification.* *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-7.
- Boisvert 1997.** Boisvert WA, Spangenberg J, Curtiss LK. *Role of leukocyte-specific LDL receptors on plasma lipoprotein cholesterol and atherosclerosis in mice.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 340-7.
- Boisvert 1998.** Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. *A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice.* *J Clin Invest* 1998; 101: 353-63.
- Borén 1998a.** Borén J, Olin KL, Lee I, Chait A, Wight T, Innerarity TL. *Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL: a single point mutation in apolipoprotein B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding.* *J Clin Invest* 1998; 101: 2658-64.

- Borén 1998b.** Borén J, Olin KL, O'Brien KD, Arnold KS, Ludwig EH, Wight TN. *Engineering non-atherogenic low density lipoproteins: direct evidence for the 'Response-to-Retention' hypothesis of atherosclerosis.* Circulation 1998; 101: 1084-93
- Borén 2000.** Borén J, Gustafsson M, Skalen K, Flood C, Innerarity T.L. *Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis.* Curr Opin Lipidol 2000; 11: 451-6.
- Boring 1997.** Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV, Broxmeyer HE, Charo IF. *Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice.* J Clin Invest 1997; 100: 2552-61.
- Boulanger 1992.** Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher F. *Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium.* Circ Res 1992; 70: 1191-7.
- Boyd 1989.** Boyd HC, Gown AM, Wolfbauer G, Chait A. *Direct evidence for a protein recognized by a monoclonal antibody against oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions from a Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.* Am J Pathol 1989; 135: 815-22.
- Bradford 1976.** Bradford MA. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding.* Anal Biochem. 1976; 72: 248-54.
- Brand 1991.** Brand K, Fowler BJ, Edgington TS, Mackman N. *Tissue factor mRNA in THP-1 monocytic cells is regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels in response to lipopolysaccharide.* Mol Cell Biol 1991; 9: 4732-8.
- Brand 1997.** Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann F, Mackman N, Baeuerle P, Walli A, Neumeier D. *Dysregulation of monocytic nuclear factor- κ B by oxidized low-density lipoprotein.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 1901-9.

- Braschi 1996.** Braschi S, Lagrost L, Florentin E, Martin C, Athias A, Gambert P, Krempft M, Lallemand C, Jacotot B. *Increased cholesteryl ester transfer activity in plasma from analbuminemic patients.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 441-9.
- Braschi 1997.** Braschi S, Masson D, Rostoker G, Florentin E, Athias A, Martin C, Jacotot B, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L. *Role of lipoprotein-bound NEFAs in enhancing the specific activity of plasma CETP in the nephrotic syndrome.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 2559-67.
- Brown 1979.** Brown SM, Goldstein JL. *Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system.* Proc Natl Acad Sci 1979; 76: 3330-7.
- Brown 1980.** Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. *The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells: continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmatic cholesteryl esters.* J Biol Chem. 1980; 255: 9344-52.
- Brown 1983.** Brown MS, Goldstein JL. *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis.* Ann Rev Biochem 1983; 52: 223-61.
- Brown 1985.** Brown MS, Goldstein JL. *The LDL receptor and HMG-CoA reductase. Two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis.* Curr Topics Cell Reg 1985; 26: 3-15.
- Brown 1986.** Brown MS, Goldstein JL. *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.* Science 1986; 232: 34-47.
- Brown 1990.** Brown MS, Goldstein JL. *Scavenging for receptors.* Nature 1990; 343: 508-9.
- Brown 1999.** Brown AJ, Jessup W. *Oxysterols and atherosclerosis.* Atherosclerosis 1999; 142: 1-29.
- Brown 2000.** Brown AJ, Mander EL, Gelissen IC, et al. *Cholesterol and oxysterol metabolism and subcellular distribution in macrophage foam cells: accumulation of oxidized esters in lysosomes.* J Lipid Res 2000; 41: 226-36.

- Brunelli 2000.** Brunelli R, Mei G, Krasnowska EK, Pierucci F, Zichella L, Ursini F, Parasassi T. *Estradiol enhances the resistance of LDL to oxidation by stabilizing apoB-100 conformation.* Biochemistry 2000; 39: 13897-903.
- Brunet 1995.** Brunet J, Boily MJ, Cordeau S, Des Rosiers C. *Effects of N-acetylcysteine in the rat heart reperfused after low-flow ischemia: evidence for a direct scavenging of hydroxyl radicals and a nitric oxide-dependent increase in coronary flow.* Free Rad Biol Med 1995; 19: 627-38.
- Bucci 1998.** Bucci C, Seru R, Annella T, Vitelli R, Lattero D, Bifulco M, Mondolo P, Santillo M. *Free fatty acids modulate LDL receptor activity in BHK-21 cells.* Atherosclerosis 1998; 137: 329-40.
- Caixàs 1997.** Caixàs A, Ordóñez-Llanos J, de Leiva A, Payés A, Homs R, Pérez A. *Optimization of glycemic control by insulin therapy decreases the proportion of small dense LDL particles in diabetic patients.* Diabetes 1997; 46: 1207-13.
- Calara 1998.** Calara F, Dimayuga P, Niemann A, Shah PK, Cercek B, Witztum J, Palinski W, Thyberg J, Nilsson J, Regnstrom J. *An animal model to study local oxidation of LDL and its biological effects in the arterial wall.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 884-93.
- Calvo 1993.** Calvo D and Vega MA. *Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family.* J Biol Chem. 1993; 268: 18929-35.
- Calvo 1998.** Calvo D, Gómez-Coronado D, Suárez Y, Lasunción MA, Vega MA. *Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL.* J Lipid Res. 1998; 39: 777-88.
- Camejo 1985.** Camejo G, López A, López F, Quiñones J. *Interaction with arterial proteoglycans. The role of charge and sialic acid content.* Atheroscler 1985; 55: 93-105.
- Camejo 1993.** Camejo G, Hurt-Camejo E, Olsson U, Bondjers G. *Proteoglycans and lipoproteins in atherosclerosis.* Curr Opin Lipidol 1993; 4: 385-91.
- Camejo 1998.** Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. *Association of apoB lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis.* Atheroscler 1998; 139: 205-22.

- Camera 1993.** Camera M, Mussoni L, Maderna P, Sironi L, Prati L, Colli S, Bernini F, Corsini A, Tremolli E. *Effect of atherogenic lipoproteins on PAI-1 synthesis by endothelial cells.* Cytotechnology 1993; 11: S144-6.
- Campos 1995.** Campos H, Roederer GO, Lussier-Cacan S, Davignon J, Krauss RM. *Predominance of large LDL and reduced HDL2 cholesterol in normolipemic men with cardiovascular artery disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15: 1043-8.
- Campos 1996.** Campos H, Arnold KS, Balestra ME, Innerarity TL, Krauss RM. *Differences in receptor binding of LDL subfractions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 794:801.
- Campos 2001.** Campos H, Perlov D, Khoo C, Sacks FM. *Distinct patterns of lipoproteins with apoB defined by presence of apoE or apoCIII in hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia.* J Lipid Res 2001; 42: 1239-49.
- Canty 1999.** Canty TG, Boyle EM, Farr A, Morgan EN, Verrier ED, Pohlmar TH. *Oxidative stress induces NF-kB nuclear translocation without degradation of IκB.* Circulation 1999; 100 (suppl): 361-4.
- Carew 1987.** Carew TE, Schwenke DE, Steinberg D. *Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: evidence that antioxidants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.* Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 7725-9.
- Carlsson 2000.** Carlsson M, Wessman P, Almgren P, Groop L. *High levels of nonesterified fatty acids are associated with increased familial risk of cardiovascular disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 1588-94.
- Caslake 1993.** Caslake MJ, Packard CJ, Gaw A, Murray E, Griffin BA, Vallance BD, Shepherd J. *Fenofibrate and LDL metabolic heterogeneity in hypercholesterolemia.* Arteriosclerosis and Thrombosis 1993; 13: 702-11.

- Castellarnau 2000.** Castellarnau C, Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Rosa R, Caveda L, Vila L, Ordóñez- Llanos J. *Electronegative LDL from normolipemic subjects induces IL-8 and monocyte chemotactic protein secretion by human endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2281-87.
- Cathcart 1989.** Cathcart MK, McNally AK, Morel DW, Chisolm GM. *Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low density lipoprotein and conversion of low density lipoprotein to a cytotoxin.* J Immunol 1989; 142: 1963-69.
- Cazzolato 1991.** Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo-Bon G. *Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC.* Free Rad Biol Med 1991; 11: 247-53.
- Chait 1993.** Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM. *Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B.* Am J Med 1993; 94: 350-6.
- Chao 1993.** Chao W, Olson MS. *Platelet-activating factor: receptors and signal transduction.* Biochem J 1993; 292: 617-29.
- Chapell 1991.** Chapell DA, Fry GL, Waknitz MA, Berns JJ. *Ligand size as a determinant of catabolism by the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway.* J Biol Chem 1991; 266: 19296-302.
- Chapman 1984.** Chapman MJ, Cadman H, Laplaud PM. *Heterogeneity in apoB, E receptor binding of human LDL subspecies.* Circulation 1984; 70 II-137, abst n°547.
- Chapman 1985.** Chapman MJ, Loisy F, Forgez P, Cadman H. *Characterisation of heterologous low density lipoprotein binding to apo-B, E receptors on porcine adrenal cortex membranes: enhanced binding to trypsin-modified human low-density lipoprotein.* Biochim Biophys Acta 1985; 835: 258-72.
- Chapman 1988.** Chapman MJ, Laplaud PM, Luc G, Forgez P, Bruckert E, Goulinet S, Lagrange D. *Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation.* J Lipid Res 1988; 29: 442-58.

- Chappell 1991.** Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Berns JJ. *Ligand size as a determinant for catabolism by the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway (a lattice model for LDL binding)*. J Biol Chem 1991; 266: 19296-302.
- Chappey 1995a.** Chappey B, Myara I, Benoir MO, Maziere C, Maziere JC, Moatti N. *Characteristics of ten charge-differing subfractions isolated from human native low density lipoprotein (LDL). No evidence of peroxidative modifications*. Biochim Biophys Acta 1995; 1259: 261-70.
- Chappey 1995b.** Chappey B, Myara I, Giral P, Kerharo G, Plainfosse MC, Levenson J, Simon A, Moatti N. *Evaluation of the sialic acid content of LDL as a marker of coronary calcification and extracoronary atherosclerosis in asymptomatic hypercholesterolemic subjects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15: 334-9.
- Chappey 1998.** Chappey B, Beyssen B, Foos E, Ledru F, Guermonprez JL, Gaux JC, Myara I. *Sialic acid content of LDL in coronary artery disease: no evidence of desialylation in subjects with coronary stenosis and increased levels in subjects with extensive atherosclerosis and acute myocardial infarction. Relation between desialylation and in vitro peroxidation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998; 18: 876-83.
- Charles 1997.** Charles MA, Eschwege N, Thibault N, Claude JR, Warnet JM, Rosselin GE, Girard J, Balkau B. *The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study*. Diabetologia 1997; 40: 1101-6.
- Chautan 1993.** Chautan M, Latron Y, Anfosso F, Alessi MC, Lafont H, Juhan-Vague I, Nalbone G. *Phosphatidylinositol turnover during stimulation of plasminogen activator inhibitor-1 secretion induced by oxidized low density lipoproteins in human endothelial cells*. J Lipid Res 1993; 34: 101-10.
- Chen 1994.** Chen GC, Liu W, Duchateau P, Allaart J, Hamilton RL, Mendel CM, Lau K, Hardman DA, Frost PH, Malloy MJ. *Conformational differences in human apolipoprotein B-100 among subspecies of low density lipoproteins (LDL)*. J Biol Chem 1994; 269: 29121-8.

- Chen 1999.** Chen N, Sarabia SF, Malloy PJ, Zhao X, Feldman D, Reaven GM. *PPAR γ agonists enhance human vascular endothelial adhesiveness by increasing ICAM-1 expression.* Biochem Biophys Res Commun 1999; 263: 718-22.
- Cheng 1973.** Cheng YC, Prusoff WH. *Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction.* Biochem Pharmacol 1973; 22: 3099-108.
- Chung 1995.** Chung BH, Tallis GA, Cho BHS, Segrest JP, Henkin Y. *Lipolysis-induced partitioning of free fatty acids to lipoproteins: effect on the biological properties of free fatty acids.* J Lipid Res 1995; 36: 1956-70.
- Chung 1998.** Chung BH, Henning B, Cho BHS, Darnell BE. *Effect of the fat composition of a single meal on the composition and cytotoxic potencies of lipolytically-releasable free fatty acids in postprandial plasma.* Atherosclerosis 1998; 141: 321-32.
- Chuntharapai 1994.** Chuntharapai A, Lee J, Burnier J, Wood WI, Hebert C, Kim KJ. *Neutralizing monoclonal antibodies to human IL-8 receptor. A map to the NH₂-terminal region of the receptor.* J Immunol 1994; 152: 1783-9.
- Cistola 1991.** Cistola DP, Small DM. *Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation: a ¹³C nuclear magnetic resonance study.* J Clin Invest 1991; 87: 1431-41.
- Claise 1996.** Claise C, Edeas M, Chalas J, Cock A, Abella A, Capel L, Lindenbaum A. *Oxidized low-density lipoprotein induces the production of interleukin-8 by endothelial cells.* FEBS Lett 1996; 398: 223-7.
- Cominacini 1993.** Cominacini L, Garbin U, Pastorino AM, Davoli A, Campagnola M, De Santis A, Pasini C, Faccini GB, Trevisan MT, Bertozzo L. *Predisposition to LDL oxidation in patients with and without angiographically established coronary artery disease.* Atherosclerosis 1993; 99: 63-70.

- Cominacini 1997.** Cominacini L, Garbin U, Frata A, Paulon T, Davoli A, Campagnola M, Marchi E, Pastorino AM, Gaviraghi G, Lo Cascio V. *Lacipidine inhibits the activation of the transcription factor NF-kappaB and the expression of adhesion molecules induced by pro-oxidant signals on endothelial cells.* J Hypertens 1997; 15: 1633-40.
- Cominacini 1999.** Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, Davoli A, Campagnola M, Rigoni A, Tosetti L, Lo Cascio V. *The expression of adhesion molecules on endothelial cells is inhibited by troglitazone through its antioxidants activity.* Cell Adhes Commun 1999; 7: 223-31.
- Connor 1994.** Connor J, Pak CC, Schroit AJ. *Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells: relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells.* J Biol Chem 1994; 269: 2399-404.
- Córdoba-Porras 1996.** Córdoba-Porras A, Sánchez-Quesada JL, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos J, Blanco-Vaca F. *Susceptibility of plasma low- and high-density lipoproteins to oxidation in patients with severe hyperhomocysteinemia.* J Mol Med 1996; 74: 771-6.
- Cushing 1990.** Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. *Minimally modified LDL induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial and smooth muscle cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 5134-8.
- Cyrus 1999.** Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. *Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice.* J Clin Invest 1999; 103: 1597-604.
- Darley Usmar 1992.** Darley Usmar VM, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT, Moncada S. *The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidación in human low density lipoprotein.* Free Radic Res Commun 1992; 17: 9-20.
- Davis 1986.** Davis CG, Elhammer A, Russell DW, Schneider WJ, Kornfeld S, Brown MS, Goldstein JL. *Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts.* J Biol Chem 1986; 261: 2828-38.

- Davis 1987.** Davis CG, van Driel IR, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. *The low density lipoprotein receptor. Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis.* J Biol Chem 1987; 262: 4075-82.
- Dawber 1980.** Dawber TR. *The Framingham Study: the epidemiology of atherosclerotic disease.* Harvard University Press, Cambridge MA. 1980.
- Deescheemaker 1998.** Deescheemaker KA, Wyns S, Nelles L, Auwerx J, Ny T, Collen D. *Interaction of AP-1, AP-2, and SP1-like proteins with two distinct sites in the upstream regulatory region of the plasminogen activator inhibitor-1 gene mediates the phorbol 12-myristate 13-acetate response.* J Biol Chem 1992; 267: 15086-91.
- De Graaf 1991.** de Graaf J, Hak-Lemmers HLM, Hectors MPC, Demacker PNM, Hendriks JCM, Stalenhoef AFH. *Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects.* Arteriosclerosis 1991; 11: 298-306.
- De Rijke 1992.** de Rijke YB, Vogelesang CJM, van Berkel TJC, Princen HMG, Verwey HF, van der Laarse A, Bruschke AVG. *Susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in coronary bypass patients.* Lancet 1992; 340: 858-9.
- Dejager 1993.** Dejager S, Brucker E, Chapman MJ. *Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia.* J Lipid Res 1993; 34: 295-308.
- Demuth 1996.** Demuth K, Myara I, Chappey B, Védie B, Pech-Ansellem MA, Haberland ME, Moatti N. *A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 773-83.
- DiCorleto 1993.** Di Corleto PE, Soyombo AA. *The role of the endothelium in atherogenesis.* Curr Opin Lipidol 1993; 4: 364-72.
- Domschke 1993.** Domschke S, Malfertheiner P, Uhl W, Buchler M, Domschke W. *Free fatty acids in serums of patients with acute necrotizing or edematous pancreatitis.* Int J Pancreatol 1993; 13: 105-10.
- Drake 1991.** Drake TA, Hannani K, Fei H, Lavi S, Berliner JA. *Minimally oxidized low density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells.* Am J Pathol 1991; 138: 601-7.

- Elinder 1992.** Elinder LS, Walldius G. *Simultaneous measurement of serum probucol and lipid-soluble antioxidants.* J Lipid Res 1992; 33: 131-7.
- Endemann 1993.** Endemann G, Staton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein.* J Biol Chem. 1993; 268: 11811-6.
- Enstrom 1992.** Enstrom JE, Kanim LE, Klein MA. *Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population.* Epidemiology 1992; 3: 194-202.
- Esterbauer 1987.** Esterbauer H, Jürgens G, Quehenberger O, Koller E. *Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes.* J Lipid Res 1987; 28: 495-509.
- Esterbauer 1989.** Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. *Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein.* Free Rad Res Commun 1989; 6: 67-75.
- Esterbauer 1991.** Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg, G. *Role of vitamin E in preventing the oxidation of low density lipoprotein.* Am J Clin Nutr 1991; 53: 314S-21S.
- Esterbauer 1993.** Esterbauer H, Jürgens G. *Mechanistic and genetic aspects of susceptibility of LDL to oxidation.* Curr Opin Lipidol 1993; 4: 114-24.
- Evangelou 1994.** Evangelou AM. *Platelet-activating factor (PAF): Implications for coronary heart and vascular diseases.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1994; 50: 1-28.
- Fass 1997.** Fass D, Blacklow S, Kim PS, Berger JM. *Molecular basis of familial hypercholesterolemia from structure of LDL receptor modulation.* Nature 1997; 388: 691-3.
- Febbraio 2000.** Febbraio M, Podrez EA, Smith JD. *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice.* J Clin Invest 2000; 105: 1049-56.

- Fless 1986.** Fless GM, Zummalen ME, Scanu AM. *Physicochemical properties of apolipoprotein(a) and lipoprotein(a-) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein(a)*. J Biol Chem 1986; 261: 8712-8.
- Fong 1987.** Fong LG, Parthasarathy S, Witztum JL, Steinberg D. *Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds of apoprotein B100*. J Lipid Res 1987; 28: 1466-77.
- Forman 1997.** Forman BM, Chen J, Evans RM. *Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta*. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 4312-17.
- Foucher 1996.** Foucher C, Lagrost L, Maupoil V, le Meste M, Rochette L, Gambert P. *Alterations of lipoprotein fluidity by non-esterified fatty acids known to affect cholesteryl ester transfer protein activity. An electron spin resonance study*. Eur J Biochem 1996; 236: 436-42.
- Frayn 1996.** Frayn KN, Williams CM, Arner P. *Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic diseases?* Clinical Sci 1996; 90: 243-53.
- Fraze 1985.** Frazee E, Donner CC, Swislocki AL, Chiou YA, Chen YD, Reaven GM. *Ambient plasma free fatty acids concentrations in noninsulin-dependent diabetes mellitus and evidence for insulin resistance*. J Clin Endocrinol Metab 1985; 61: 807-11.
- Fredrickson 1967.** Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. *Fat transport in lipoproteins-an integrated approach to mechanisms and disorders*. N Engl J Med 1967; 76: 32-44, 94-103, 148-56, 215-26, 273-81.
- Frostegard 1997.** Frostegard J, Huang YH, Ronnelid J, Schafer-Elinder L. *Platelet-activating factor and oxidized LDL induce immune activation by a common mechanism*. Art Thromb Vasc Biol 1997; 17: 963-8.

- Galeano 1994.** Galeano NF, Milne R, Marcel YL, Walsh MT, Levy E, Ngun'yen TD, Gleeson A, Arad Y, Witte L, Al-Haideri M, Rumsey SC, Deckelbaum RJ. *Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL) is modified in small LDL but not in triglyceride-rich LDL of normal size.* J Biol Chem 1994; 269: 511-9.
- Galis 1994.** Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques.* J Clin Invest 1994; 94: 2493-503.
- Geng 1992.** Geng YJ, Hansson GK. *Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages.* J Clin Invest 1992; 89: 1322-3.
- Gerszten 1999.** Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Luster AD, Lusinskas FW, Rosenzweig A. *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.* Nature 1999; 398: 718-23.
- Gey 1989.** Gey KF, Puska P. *Plasma vitamins E and A inversely correlated with mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology.* Ann NY Acad Sci 1989; 570: 268-82.
- Ginsberg 1986.** Ginsberg HN, Ngoc-Anh L, Goldberg IJ, Brown WV. *Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI.* J Clin Invest 1986; 78: 1287-95.
- Ginsberg 1991.** Ginsberg HN. *Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis.* Diabetes Care 1991; 130: 133-6.
- Goldstein 1979.** Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.* Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 333-7.
- Goldstein 1983a.** Goldstein JL, Brown MS. *Familial hypercholesterolemia.* In: Stanbury JB, Wyngaarden, Fredrikson DS, Goldstein JL, Brown MS. eds. The metabolic basis of Inherited disease, 5th ed. McGraw-Hill: New York 1983: 672-712.

- Goldstein 1983b.** Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. *Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein in cultured cells.* Methods Enzymol 1983; 98: 241-60.1983.
- Goldstein 1985.** Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. *Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system.* Ann Rev Cell Biol 1985; 1:1-39.
- Greilberger 1999.** Greilberger J, Wang X, Ledinski G, Chen Q, Jürgens G. *Presence of aldehydic epitopes on a minor low-density lipoprotein fraction.* Free Radic Biol Med 1999; 26: 1489-94.
- Griffin 1990.** Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. *Rapid isolation of low density lipoprotein subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation.* Atherosclerosis 1990; 83: 59-67.
- Haberland 1988.** Haberland ME, Fong D, Chen L. *Malondialdehyde-altered lipoprotein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.* Science 1988; 241: 215-8.
- Haberland 1992.** Haberland ME, Steinbrecher UP. *Modified low density lipoproteins: Diversity and biological relevance in atherogenesis.* In: Molecular genetics of coronary artery disease. Candidate genes and processes in atherosclerosis. Eds. Lusis AJ, Rotter JI, Sparks RS. Monogr Hum Genet 1992; 14: 36-61.
- Hakala 1999.** Hakala JK, Öörni K, Ala-Korpela M, Kovanen PT. *Lipolytic modification of LDL by phospholipase A2 induces particle aggregation in the absence and fusion in the presence of heparin.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 1276-83.
- Hamilton 1990.** Hamilton TA, Ma Q, Chisolm GM. *Oxidized low density lipoprotein supresses the expression of tumor necrosis factor- α mRNA in stimulated murine peritoneal macrophages.* J Immunol 1990; 144: 2343-50.
- Hamsten 1985.** Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blomback M. *Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction.* N Engl J Med 1985; 313: 1557-63.

- Han 1998.** Han KH, Tangirala RK, Green SR, Quehenberger O. *Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes: a regulatory role for plasma LDL.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1983-91.
- Han 1999.** Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O. *Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia: differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function.* J Lipid Res 1999; 40: 1053-63.
- Harats 2000.** Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, Sigal E. *Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice.* Art Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2100-5.
- Harduin 1993.** Harduin P, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C. *Modulation of the expression of human LDL-apoB100 epitopes by lipids and apolipoproteins.* Arterioscler Thromb 1993; 13: 529:35.
- Haust 1971.** Haust MD. *The morphogenesis and fate of potential and early and atherosclerotic lesion in man.* Hum Pathol 1971; 2: 1-29.
- Havekes 1985.** Havekes L, Mommaas AM, Schouten D, De Wit E, Scheffer M, van Hinsberg VW. *High-affinity uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by confluent human vascular endothelial cells.* Atherosclerosis 1985; 56: 81-92.
- Havel 1955.** Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.* J Clin Invest 1955; 34:1345-53.
- Hayashi 1987.** Hayashi H, Naito C, Ito H, Kawamura M, Miyazaki S, Kumai M. *Enhanced degradation of low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages associated with an increase in its free fatty acid content.* Atherosclerosis 1987; 66: 139-44.
- Hayes 1998.** Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, Smith G, Paterson JR, Earnshaw JJ, Roach AG, Westwick J, Williams RJ. *Human vascular smooth cells express*

receptors for CC chemokines. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 397-403.

Hazell 1993: Hazell LJ, Stocker R. *Oxidation of low density lipoprotein causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. Biochem J* 1993; 290: 165-72.

Heinecke 1986. Heinecke JW, Baker L, Rosen H, Chait A. *Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. J Clin Invest* 1986 ;77: 757-61.

Heinecke 1987. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. *The role of sulfur-containing aminoacids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. J Biol Chem* 1987; 262: 10098-103.

Heinecke 1993. Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki LA, Chait A. *Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and independent mechanisms. J Lipid Res* 1993; 34: 2051-61.

Heinecke 1994. Heinecke JW, Li W, Mueller DM, Bohrer A, Turk J. *Cholesterolchlorohydrin synthesis by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system: potential markers for lipoprotein oxidatively damaged by phagocytes. Biochemistry* 1994; 33: 10127-36.

Henning 1985. Henning B, Shasby DM, Spector AA. *Exposure to fatty acid increases human low density lipoprotein transfer across cultured endothelial monolayers. Circ Res* 1985; 57: 776-80.

Henning 1996. Henning B, Toborek M, Joshi-Barve S, Barger SW, Barve S, Mattson MP, McClain CJ. *Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kappaB (NF-kB) and induces NF-kappaB-dependent transcription in cultured endothelial cells. Am J Clin Nutr* 1996; 63: 322-8.

Henriksen 1981. Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. *Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptor for acetylated low density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6499-503.

- Henriksen 1983.** Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. *Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein.* Arteriosclerosis 1983; 3: 149-59.
- Herbst 1955.** Herbst FSM, Lever WF, Lyons ME, Hurley NA. *Effect of heparin on the lipoproteins in hyperlipemia. An electrophoretic study of the serum alpha and beta lipoproteins after their separation by fractionation of plasma proteins or ultracentrifugal flotation.* J Clin Invest 1955; 34: 581-7.
- Hermann 1992.** Hermann M, Gmeiner B. *Altered susceptibility to in vitro oxidation of LDL in LDL complexes and LDL aggregates.* Arterioscler Thromb 1992; 12: 1503-6.
- Hessler 1983.** Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM. *Lipoprotein oxidation and lipoprotein induced cytotoxicity.* Arteriosclerosis 1983; 3: 215-22.
- Hevonoja 2000.** Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. *Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL.* Biochim Biophys Acta 2000; 1488: 189-210.
- Hobbs 1986.** Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. *Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of LDL receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia.* J Biol Chem 1986; 261: 13114-20.
- Hobbs 1992.** Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. *Molecular genetics of the low density lipoprotein receptor in familial hypercholesterolemia.* Hum Mut 1992; 1: 445-66.
- Hoch 1996.** Hoch RC, Schraufstatter IU, Cochrane CG. *In vivo, in vitro, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors.* J Lab Clin Med 1996; 128: 134-45.
- Hodis 1994.** Hodis HN, Krams DM, Avogaro P, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hwang J, Peterson H, Sevanian A. *Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-).* J Lipid Res 1994; 35: 669-77.

- Hogg 1993.** Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J. *Inhibition of low density lipoprotein oxidation by nitric oxide.* FEBS Lett 1993; 334:170-4.
- Holman 1995.** Holman RT, Adams CE, Nelson RA, Grater SJ, Jaskiewicz JA, Johnson SB, Erdman JW. *Patients with anorexia nervosa demonstrate deficiencies of selected essential fatty acids, compensatory changes in nonessential fatty acids and decreased fluidity of plasma lipids.* J Nutr 1995; 125: 901-7.
- Holvoet 1995.** Holvoet P, Perez G, Zhao Z, Brouwers E, Bernar H, Collen D. *Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease.* J Clin Invest 1995; 95: 2611-19.
- Hoogewerf 1997.** Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, Borlat F, Clark I, Power CA, Wells TN. *Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines.* Biochemistry 1997; 36: 13570-8.
- Hostmark 1995.** Hostmark AT. *Serum fatty acid/albumin molar ratio and the risk of diseases.* Med Hypotheses 1995, 44: 539-41.
- Huang 1992.** Huang JM, Xian H, Bacaner M. *Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes.* Proc Natl Acad Sci 1992; 89: 6452-6.
- Hub 1998.** Hub E, Rot A. *Binding of RANTES, MCP-1, MCP-3, and MIP-1 alpha to cells in human skin.* Am J Pathol 1998; 152: 749-57.
- Hunt 1990.** Hunt JV, Smith CCT, Wolff SP. *Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose.* Diabetes 1990; 39: 1420-4.
- Hurt 1987.** Hurt E, Camejo G. *Effect of arterial proteoglycans on the interaction of LDL with human monocyte-derived macrophages.* Atherosclerosis 1987; 67: 115-26.
- Hurt-Camejo 1997.** Hurt-Camejo E, Andersen S, Standal R, Rosengren B, Sartip P, Stadberg E, Johansen B. *Localization of nonpancreatic secretory*

phospholipase A2 in normal and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 300-9.

Hurt-Camejo 2000. Hurt-Camejo E, Camejo G, Sartipy P. *Phospholipase A2 and small, dense low-density lipoprotein*. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 465-71.

Hurt-Camejo 2001. Hurt-Camejo E, Camejo G, Peilot H, Oorni K, Kovanen P. *Phospholipase A2 in vascular disease*. *Circ Res* 2001; 89: 298-304.

Hussain 2001. Hussain MM. *Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family*. *Front in biosci* 2001; 6: 417-28.

Innerarity 1986. Innerarity TL, Pitas RE, Mahley RW, 1986. *Lipoproteins-receptor interactions in plasma lipoproteins*. *Methods in Enzymology, part B*. Vol. 129; 542-66.

Innerarity 1987. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM. *Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 6919-23.

Innerarity 1990. Innerarity TL. *Familial Hypobetalipoproteinemia and familial defective apoB100: genetic disorders associated with apolipoproteinB*. *Curr Opin Lipidol* 1990; 1: 104.

Inoue 1997. Inoue I, Satoru N, Shen M, Takahashi K, Katayama S. *The peroxisome proliferator-activated receptor α regulates the plasma thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) level*. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 237: 606-10.

Inoue 2001. Inoue M, Itoh H, Tanaka T, Chun TH, Doi K, Fukunaga Y, Sawada N, Yamshita J, Masatsugu K, Saito T, Sakaguchi S, Sone M, Yamahara K, Yurugi T, Nakao K. *Oxidized LDL regulates vascular endothelial growth factor expression in human macrophages and endothelial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ* . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 560-6.

- Ismail 1994.** Ismail NA, Alavi MZ, Moore S. *Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells.* *Atherosclerosis* 1994; 105: 79-87.
- Ito 1989.** Ito Y, Breslow JL, Chait BT. *Apolipoprotein C-III lacks carbohydrate residues: use of mass spectrometry to study apolipoprotein structure.* *J Lipid Res* 1989; 30: 1781-7.
- Jaakkola 1989.** Jaakkola o, Solakivi T, Yla-Herttuala S, Nikkari T. *Receptor-mediated binding and degradation of subfractions of human plasma low-density lipoprotein by cultured fibroblasts.* *Biochim Biophys Acta* 1989; 1005: 118-22.
- James 1989.** James RW, Martin B, Pometta D, Fruchart JC, Duriez P, Puchois P, Farriaux JP, Tacquet A, Demant T, Clegg RJ, Munro A, Oliver MF, Packard CJ, Shepherd J. *Apolipoprotein B metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia.* *J Lipid Res* 1989; 30: 159-69.
- Janabi 2000.** Janabi M, Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Hiraoka H, Matsumoto K, Zhang Z, Nozaki S, Matsuzawa Y. *Oxidized LDL-induced NF- κ B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1953-60.
- Jessup 1992.** Jessup W, Mander EL, Dean RT. *The intracellular storage and turnover of apolipoprotein B of oxidized LDL in macrophages.* *Biochim Biophys Acta* 1992; 1126: 167-77.
- Ji 1997.** Ji Y, Wang N, Sun Y, Moya ML, Philips MC, Rothblat GH, Swaney JA, Tall AR. *Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux.* *JBiol Chem* 1997; 272: 20982-5.
- Jonasson 1986.** Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.* *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-8.
- Jones 1980.** Jones NL, Heigenhauser GJF, Kuksis A, Matsos CG, Sutton JR, Toews CJ. *Fat metabolism in heavy exercise.* *Clin Sci* 1980; 59: 469-78.

- Joven 1990.** Joven J, Villabona CV, Vilella E, Masana L, Alberti R, Valles M. *Abnormalities of lipoprotein metabolism in patients with the nephrotic syndrome.* N Engl J Med 1990; 323: 579-84.
- Kaltsmidt 1996.** Kaltsmidt C, Bauerle PA, Neumeier D. *Activated transcription factor NF- κ B is present in the atherosclerotic lesion.* J Clin Invest 1996; 97: 1715-22.
- Kaneko 1994.** Kaneko T, Wada H, Wakita Y, Minamikawa K, Nakase T, Mori Y, Deguchi K, Shirakawa S. *Enhanced tissue factor activity and plasminogen activator inhibitor-1 antigen in human umbilical vein endothelial cells incubated with lipoproteins.* Blood Coagul Fibrinolysis 1994; 5: 385-92.
- Kenagy 1984.** Kenagy R, Bierman EL, Schwartz S, Albers JJ. *Metabolism of low density lipoprotein by bovine endothelial cells as a function of cell density.* Arterioscler 1984; 4: 365-71.
- Kerhoff 2001.** Kerhoff C, Sorg C, Tandon N, Nacken W. *Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells.* Biochemistry 2001; 40: 241-8.
- Kershbaum 1968.** Kershbaum A. *A comparative study of cigarette, cigar and pipe smoking effects on blood lipids, catecholamine excretion and nicotine content of the urine.* Acta Cardiol 1968; 23: 317-29.
- Khoo 1988.** Khoo J, Miller E, McLaughlin P, Steinberg D. *Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation.* Arteriosclerosis 1988; 8: 348-58.
- Kim 1994.** Kim JA, Territo MC, Wayner E, Carlos TM, Parhami F, Smith CW, Haberland ME, Fogelman AM, Berliner JA. *Partial characterization of leukocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally oxidized LDL.* Arterioscler Thromb 1994; 14: 427-33.

- Kimura 1997.** Kimura M, Kurose I, Russell J, Granger DN. *Effects of fluvastatin on leukocyte-endothelial cell adhesion in hypercholesterolemic rats.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 1521-6.
- Kinoshita 1990.** Kinoshita M, Krul ES, Schonfeld G. *Modification of the core lipids of low density lipoproteins produces selective alterations in the expression of apoB-100 epitopes.* J Lipid Res 1990; 31: 701-8.
- Kintscher 2000.** Kintscher U, Goetze S, Wakino S, Kim S, Nagpal S, Chandraratna R, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. *Peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor ligands inhibit monocyte chemotactic protein-1- directed migration of monocytes.* Eur J Pharmacol 2000; 11: 259-70.
- Kita 1981.** Kita T, Brown MS, Watanabe Y, Goldstein JL. *Deficiency of low density lipoprotein receptors of the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia.* Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 2268-72.
- Kita 1982.** Kita T, Brown MS, Bilheimer DW, Goldstein JL. *Delayed clearance of very low density and intermediate density lipoproteins with enhanced conversion to low density lipoproteins in WHHL rabbits.* Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 5693-7.
- Kita 1987.** Kita T, Nagano Y, Yokode M, Ishii K, Kume N, Ooshima A, Yoshida H, Kawai C. *Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits: an animal model for familial hypercholesterolemia.* Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 5928-31.
- Klein 1995.** Klein RL, Laimins M, Lopes-Virella MF. *Isolation, characterization, and metabolism of the glycosylated and non glycosylated subfractions of low-density lipoproteins isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects.* Diabetes 1995; 44: 1093-8.
- Kleinman 1987.** Kleinman Y, Schonfeld G, Gavish D, Oschry Y, Eisenberg S. *Hypolipidemic therapy modulates expression of apolipoprotein B epitopes on low density lipoproteins. Studies in mild to moderate hypertriglyceridemic patients.* J Lipid Res 1987; 28: 540-8.
- Kleinman 1988.** Kleinman Y, Krul ES, Burnes M, Aronson W, Pflieger B, Schonfeld G. *Lipolysis of LDL with phospholipase A2 alters the expression of selected*

apoB-100 epitopes and the interaction of LDL with cells. J Lipid Res 1988; 29: 729-43.

Kleinveld 1993. Kleinveld HA, Naber AHJ, Stalenhoef AFH, Demacker PNM. *Oxidative resistance, oxidation rate, and extent of oxidation of human low density lipoprotein depend on the ratio of oleic acid to linoleic acid content: studies in vitamin E deficient subjects.* Free Rad Biol Med 1993; 15: 273-80.

Klouché 1998. Klouché M, Gottschling S, Gerl V, Hell W, Husmann M, Dorweiler B, Messner M, Bhakdi S. *Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL. Selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1376-85.

Klouché 1999. Klouché M, May AE, Hemmes M, Messner M, Kanse SM, Preissner KT, Bhakdi S. *Enzymatically modified, nonoxidized LDL induces selective adhesion and transmigration of monocytes and T-lymphocytes through human endothelial cell monolayers.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 784-93.

Knight 1986. Knight BL, Thompsom GR, Soutar AK. *Binding and degradation of heavy and light subfractions of human plasma low-density lipoprotein by cultured fibroblasts and macrophages.* Atherosclerosis 1986; 59: 301-6.

Koch 1992. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis.* Science 1992; 258: 1798-801.

Kodama 1988. Kodama T, Reddy P, Kishimoto C, Krieger M. *Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor.* Proc Natl Acad Sci. 1988; 85: 9238-42.

Kodama 1990. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. *Type I macrophage scavenger receptor contains α -helical and collagen-like coiled coils.* Nature 1990; 343: 531-5.

Koren 1975. Koren HS, Handwerger BS, Wunderlich JR. *Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line.* Journal of Immunology 1975; 114: 894-7.

- Korth 1994.** Korth R, Zimmermann K, Richter WO. *Lipoprotein-associated paf (LA-paf) was found in washed human platelets and monocyte-macrophage like U937 cells.* Chem Phys Lipids 1994; 70: 109-19.
- Kozarsky 1997.** Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. *Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels.* Nature 1997; 387: 414-7.
- Krauss 1982.** Krauss RM, Burke DJ. *Identification of multiple LDL subclasses of plasma lipoproteins in normal humans.* J Lipid Res 1982; 23: 97-103.
- Krauss 1987.** Krauss RM. *Relationship of intermediate and low-density lipoprotein subspecies to risk of coronary artery disease.* Am Heart J 1987; 113: 578-82.
- Ku 1992.** Ku G, Thomas CA, Akeson AL, Jackson RL. *Induction of interleukin 1 expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-hydroxioctadecadienoic acid.* J Biol Chem 1992; 267: 14183-8.
- Kume 1992.** Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA. *Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells.* J Clin Invest 1992; 90: 1138-44.
- Kume 1994.** Kume N, Gimbrone MA. *Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells.* J Clin Invest 1994; 93: 907-11.
- Kume 1998.** Kume N, Murase T, Moriwaki H, Aoyama T, Sawamura T, Masaki T, Kita T. *Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells.* Circ Res 1998; 83: 322-7.
- Kunitake 1990.** Kunitake ST, Young SG, Chen GC, Pullinger CR, Zhu S, Pease RJ, Scott J, Hass P, Schilling J, Kane JP. *Conformation of apolipoprotein B-100 in the low density lipoproteins of tangier disease. Identification of localized conformational response to triglyceride content.* J Biol Chem 1990; 265: 20739-46.

- Kuschert 1999.** Kuschert GS, Coulin F, Power CA, Proudfoot AE, Hubbard RE, Hoogewerf AJ, Wells TN. *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses.* Biochemistry 1999; 38: 12959-68.
- Kuziel 1997.** Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N. *Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2.* Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 12053-8.
- LaBelle 1997.** LaBelle M, Blanche PJ, Krauss RM. *Charge properties of low density lipoprotein subclasses.* J Lipid Res 1997; 38: 690-700.
- Landry 1997.** Landry DB, Couper LL, Bryant SR, Lindner V. *Activation of the NF- κ B and I kappa B in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1.* Am J Pathol 1997; 15: 1085-95.
- Larsen 1989.** Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. *The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T-lymphocytes.* Science 1989; 68: 31-6.
- Latron 1991.** Latron Y, Chautan M, Anfosso F, Alessi MC, Nalbone G, Lafont H, Juhan-Vague I. *Stimulating effect of oxidized low density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells.* Arterioscler Thromb. 1991;11:1821-9.
- Laughton 1988.** Laughton CW, Ruddle DL, Bedford CJ, Alderman EL. *Sera containing elevated non-esterified fatty acids from patients with angiographically documented coronary atherosclerosis cause marked lipid accumulation in cultured human arterial smooth muscle-derived cells.* Atherosclerosis 1988; 70: 233-46.
- Lavy 1991.** Lavy A, Brook GJ, Dankner G, Amotz AM, Aviram M. *Enhanced in-vitro oxidation of plasma lipoprotein derived from hypercholesterolemic patients.* Metabolism 1991; 40: 794-9.

- Lee 1999.** Lee C, Segrado T, Horkko S, Hama S, Subbaiah PV, Miwa M, Navab M, Witztum JL, Reaven PD. *All apo-B containing lipoproteins induce monocyte chemotaxis and adhesion when minimally modified.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1437-46.
- Lee 2000.** Lee H, Shi W, Tontonoz P, Wang S, Subbanagounder, Hedrick CC, Hama S, Borromeo C, Evans RM, Berliner JA, Nagy L. *Role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in oxidized phospholipid-induced synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells.* *Circ Res* 2000; 87: 516-21.
- Lehr 1993.** Lehr AH, Seemuller J, Hubner C, Menger MD, Messner K. *Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium interaction in vivo involves the receptor for platelet activating factor.* *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 1013-18.
- Lehrman 1985.** Lehrman MA, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW, Schneider WJ. *Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain.* *Cell* 1985; 41: 735-43.
- Leitinger 1999.** Leitinger N, Tyner TR, Oslund L, Rizza C, Subbanagounder G, Lee H, Shih PT, Mackman N, Tigy G, Territo MC, Berliner JA, Vora DK. *Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12010-5.
- Li 1992a.** Li QT, Sawyer WH. *Effect of unesterified cholesterol on the compartmentation of a fluorescent cholesteryl ester in a lipoprotein-like lipid microemulsion.* *J Lipid Res* 1992; 33: 503-12.
- Li 1992b.** Li K. *Determination of sialic acids in human serum by reversed-phase liquid chromatography with fluorimetric detection.* *J Chromatogr* 1992; 579: 209-13.
- Li 1993.** Li YS, Shyy YJ, Wright JG, Valente AJ, Cornhill JF, Kolattukudy PE. *The expression of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in human vascular endothelium in vitro and in vivo.* *Mol Cell Biochem* 1993; 126: 61-8.
- Li 1999.** Li N, Karin M. *Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?* *FASEB J* 1999; 13: 1137-43.

- Liao 1991.** Liao F, Berliner AJ, Mehrabian M, Navab M, Demer LL, Lusis AJ, Fogelman AL. *Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice.* J Clin Invest 1991; 87: 2253-7.
- Lin 1996.** Lin JHC, Zhu Y, Liao HL, Kobari Y, Groszek L, Stemerman MB. *Induction of vascular cell adhesion molecular-1 by low density lipoprotein.* Atherosclerosis 1996; 127: 185-99.
- Linden 1989.** Linden T, Bondjers G, Camejo G, Bergstrand R, Wilhelmsen L, Wiklund O. *Affinity of LDL to a human arterial proteoglycan among male survivors of myocardial infarction.* Eur J Clin Invest 1989; 19: 38-44.
- Liu 1997.** Liu Y, Hultén LM, Wiklund O. *Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 317-23.
- Lopes-Virella 1988.** Lopes-Virella MF, Klein RL, Lyons TJ, Stevenson HC, Witztum JL. *Glycosylation of low density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte derived macrophages.* Diabetes 1988; 37: 550-7.
- López 1993.** López S, Vila L, Breviario F, de Castellarnau C. *Interleukin-1 increases 15-hydroxyeicosatetraenoic acid formation in cultured human endothelial cells.* Biochim Biophys Acta 1993; 1170: 17-24.
- Lougheed 1991.** Lougheed M, Zhang HF, Steinbrecher UP. *Oxidized low density lipoprotein is resistant to cathepsins and accumulates within macrophages.* J Biol Chem 1991; 266: 14519-25.
- Lukacs 1995.** Lukacs NW, Strieter RM, Elnor V, Evanoff HL, Burdick MD, Kunkel SL. *Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte:endothelial cell interactions.* Blood 1995; 86: 2767-73.
- Lund 1999.** Lund EK, Harvey LJ, Ladha S, Clark DC, Johnson IT. *Effects of dietary fish oil supplementation on the phospholipid composition and fluidity of cell membranes from human volunteers.* Ann Nutr Metab 1999; 43: 290-300.

- Lund-Katz 1998.** Lund-Katz S, Laplaud PM, Philips MC, Chapman MJ. *Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies implication for LDL receptor interaction.* Biochemistry 1998; 37: 12867-74.
- Lyons 1991.** Lyons TJ. *Oxidized low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes?* Diabetes Care 1991; 8: 411-9.
- Maggi 1994.** Maggi E, Chiesa R, Melissano G, Castellano R, Astore D, Grossi A, Finardi G, Bellomo G. *LDL oxidation in patients with severe atherosclerosis. A study of in-vitro and in-vivo markers.* Arteriscler Thromb 1994; 14: 1892-9.
- Mahley 1979.** Mahley RW, Innerarity TL, Weisgraber KH, Oh SY. *Altered metabolism (in vitro and in vivo) of plasma lipoproteins after selective chemical modification of lysine residues of apolipoproteins.* J Clin Invest 1979; 64: 743-50.
- Malik 1996.** Malik AB, Lo SK. *Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation.* Pharmacol Rev 1996; 48: 213-29.
- Mangin 1993.** Mangin EL, Kugiyama K, Nguy JH, Kerns SA, Henry PD. *Effects of lysolipids and oxidatively modified low density lipoprotein on endothelium-dependent relaxation aorta.* Circ Res 1993; 72:161-6.
- Manson 1991.** Manson JE, Stampfer MJ, Willet WC. *A prospective study of antioxidants vitamins and incidence of coronary heart disease in women.* Circulation 1991; 84: 546.
- Mantovani 1992.** Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. *Cytokine regulation of endothelial function.* FASEB J 1992; 6: 2591-9.
- Maor 1999.** Maor I, Aviram M. *Macrophage released proteoglycans are involved in cell-mediated aggregation of LDL.* Atheroscler 1999; 142; 57-66.
- Maor 2000.** Maor I, Hayek T, Hirsh M, Ianeu TC, Aviram M. *Macrophage-released proteoglycans enhance LDL aggregation: studies in aorta from apolipoprotein E-deficient mouse.* Atherosclerosis 2000; 150: 91-101.

- Marcel 1987.** Marcel YL, Innerarity TL, Spilman C, Mahley RW, Protter AA, Milne RW. *Mapping of human apolipoprotein B antigenic determinants.* Arteriosclerosis 1987; 7: 166-75.
- Marchand 1904.** Marchand F. Über arteriosklerose. Vehr Kongr Innere Med 1904; 21: 23-59.
- Martin 1997.** Martin T, Cardarelli PM, Parry GC, Felts KA, Cobb RR. *Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kB and AP-1.* Eur J Immunol 1997; 27: 1091-7.
- Marumo 1997.** Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R. *Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells.* Circulation 1997; 96: 2361-7.
- Marx 1999.** Marx N, Bourcier T, Sukhova GK. *PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potencial mediator in vascular disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 546-51.
- Marx 2000.** Marx N, Mach F, Sauty A. *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells.* J Immunol 2000; 164: 6503-8.
- Matsumoto 2000.** Matsumoto K, Hirano K, Nozaki S. *Expression of macrophage scavenger receptor CD36 in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma and its implication in atherogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 1027-32.
- McKeone 1993.** McKeone BJ, Patsch JR, Pownall HJ. *Plasma triglycerides determine low density lipoprotein composition, physical properties, and cell-specific binding in cultured cells.* J Clin Invest 1993; 91: 1926-33.

- McNamara 1996.** McNamara JR, Small DM, Li Z, Schaefer EJ. *Differences in LDL subspecies involve alterations in lipid composition and conformational changes in apolipoprotein B.* J Lipid Res 1996; 37: 1924-35.
- Mitropoulos 1992.** Mitropoulos KA, Miller GJ, Watts GF, Durrington PN. *Lipolysis of triglycerides-rich lipoproteins activates coagulant factor XII: a study in familial lipoprotein-lipase deficiency.* Atherosclerosis 1992; 95: 119-25.
- Miyazawa 1990.** Miyazawa T, Fujimoto K, Oikawa S. *Determination of lipid hydroperoxides in low density lipoprotein from human plasma using high performance chromatography with chemiluminescence detection.* Biomed Chromatogr 1990; 4: 131-4.
- Morel 1984.** Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. *Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation.* Arteriosclerosis 1984; 4: 357-64.
- Moriwaki 1998.** Moriwaki H, Kume N, Sawamura T, Aoyama T, Hoshikawa H, Ochi H, Nishi E, Masaki T, Kita T. *Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1541-7.
- Moro 1998.** Moro E, Zambon C, Pianetti S, Cazzolato G, Pais M, Bittolo Bon G. *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 1998; 35: 161-4.
- Moro 1999.** Moro E, Alessandrini P, Zambon C, Pianetti S, Pais M, Cazzolato G, Bittolo Bon G. *Is glycation of low density lipoproteins in patients with type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition?* Diabet Med 1999; 16: 663-9.
- Movat 1959.** Movat H, Haust MD, More RH. *The pathological elements of the early lesion of atherosclerosis.* Am J Pathol 1959; 35: 93-101
- Muller 1938.** Muller C. *Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris.* Acta Med Scand 1938; 89 (suppl): 75-84.

- Muñoz 1996.** Muñoz C, Pascual D, Castellanos MC, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, Redondo JM, de Landazuri MO. *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- κ B and AP-1 transcription factor activity.* Blood 1996; 88: 3482-90.
- Murakami 1997.** Murakami M, Nakatani Y, Atsumi G, Inoue K, Kudo I. *Regulatory functions of phospholipase A2.* Crit Rev Immunol 1997; 17: 225-83.
- Murao 1999.** Murao K, Imachi H, Momoi A, Sayo Y, Hosokawa H, Sato M, Ishida T, Takahara J. *Thiazolidinedione inhibits the production of monocyte chemoattractant protein-1 in cytokine-treated human vascular endothelial cell.* FEBS Lett 1999; 254: 27-30
- Murugesan 1993.** Murugesan G, Chisolm GM, Fox PL. *Oxidized low density lipoprotein inhibits the migration of aortic endothelial cells in vitro .* J Biol Chem 1993; 268: 10111-9.
- Musliner 1987.** Musliner TA, McVicker KM, Iosefa JF, Krauss RM. *Lipolysis products promote the formation of complexes of very-low-density and low-density lipoproteins.* Biochim Biophys Acta 1987; 919: 97-110.
- Mussoni 1992.** Mussoni ML, Mannucci L, Sirtori M, Camera M, Maderna P, Sironi L, Tremolli E. *Hypertriglyceride and regulation of fibrinolytic activity.* Arterioscler Thromb 1992; 12: 19-27.
- Myant 1983.** Myant NB. *The metabolic basis of familial hypercholesterlaemia.* Klin Wochenschr 1983; 61: 383-401.
- Nagy 1998.** Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. *Oxidized LDL regulatea macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ .* Cell 1998; 93: 229-40.
- Nakata 1999.** Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M et al. *CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 1333-9.

- Napoli 1995.** Napoli C, Postiglione A, Triggiani M, Corso G, Palumbo G, Carbone V, Ruocco A, Ambrosio G, Montefusco S, Malorni A, Condorelli M, Chiariello M. *Oxidative structural modifications of low density lipoprotein in homozygous familial hypercholesterolemia.* *Atherosclerosis* 118: 259-73.
- Navab 1991.** Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough GP, Ross LA, Bork RW, Valente AJ, Berliner JA, Drinkwater DC, Laks H, Fogelman AM. *Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein.* *J Clin Invest* 1991; 88: 2039-46.
- Navab 1996.** Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusisi AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. *The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 831-42.
- Navab 2000a.** Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3.* *J Lipid Res* 2000; 41: 1481-94.
- Navab 2000b.** Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM. *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3.* *J Lipid Res* 2000; 41: 1495-508.
- Nichols 1986.** Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. *Non-denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis.* *Methods Enzymol* 1986; 128: 417-31.
- Nielsen 1992.** Nielsen LB, Nordestgaard BG, Stender S, Kjeldsen K. *Aortic permeability to LDL as a predictor of aortic cholesterol accumulation in cholesterol-fed rabbits.* *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1402-9.
- Nivelstein 1991.** Nivelstein PF, Fogelman AM, Mottino G, Frank JS. *Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after infusion of low density*

lipoprotein: a deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. Arterios Thromb 1991; 11: 1795-805.

Nigon 1991. Nigon F, Lesnik P, Pouis M, Chapman J. *Discrete subspecies of human low density lipoprotein are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor.* J Lipid Res 1991; 32: 1741-53.

Nikari 1995. Nikari T, Malo-Ranta U, Hiltunen T, Jaakola O, Yla-Herttuala S. *Monitoring of lipoprotein oxidation by gas chromatographic analysis of hydroxy fatty acids.* J Lipid Res 1995; 36: 200-7.

Nordestgaard 1994. Nordestgaard BG, Nielsen LB. *Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins.* Curr Opin Lipidol 1994; 5: 252-7.

Nyyssönen 1996. Nyyssönen K, Kaikkonen J, Salonen JT. *Characterization and determinants of an electronegatively charged low-density lipoprotein in human plasma.* Scand J Clin Lab Invest 1996; 56: 681-9.

Okada 1998. Okada M, Matsumori A, Ono K, Furukawa Y, Shioi T, Iwasaki A, Matsushima K, Sasayama S. *Cyclic stretch upregulates production of interleukin-8 and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 894-901.

Oliver 1994. Oliver MF, Opie LH. *Effects of glucose and fatty acids on myocardial ischaemia and arrhythmias.* Lancet 1994; 343: 155-8.

Öörni K. Öörni K, Pentikainen O, Ala-Koperla, Kovanen P.T. *Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions.* J Lipid Res 2000; 41: 1703-14.

Orehov 1991. Orehov AN, Tertov VV, Mukhin DN. *Desialylated low density lipoprotein-naturally occurring lipoprotein with atherogenic potency.* Atherosclerosis 1991; 86: 153-8.

- Osborne 1985.** Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. *5' end of HMG-CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol mediated inhibition of transcription.* Cell 1985; 42: 203-12.
- Osborn 1989.** Osborn L, Hession C, Tizard T, Vassallo C, Luhowsky S, Chi-Rosso G, Lobb RR. *Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced protein that binds to lymphocytes.* Cell 1989; 59: 1203-11.
- Palinski 1989.** Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SA, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D. *Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo.* Proc Natl Acad Sci USA 1989; 87: 1372-6.
- Paolisso 1995.** Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV, Ravussin E. *A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM.* Diabetologia 1995; 38: 1213-7.
- Parasassi 2001.** Parasassi T, Bittolo-Bon G, Brunelli R, Cazzolato G, Krasnowska EK, Mei G, Sevanian A, Ursini F. *Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroxide rich, electronegative LDL(-).* Free Radic Biol Med 2001; 31: 82-9.
- Parthasarathy 1990a.** Parthasarathy S, Fong LG, Quinn MT, Steinberg D. *Oxidative modification of LDL: comparison between cell-mediated and copper-mediated modification.* Eur Heart J 1990; 11(suppl E): 83-7.
- Parthasarathy 1990b.** Parthasarathy S, Barnett J. *Phospholipase A2 activity of LDL: evidence for an intrinsic phospholipase A2 activity of apoB-100.* Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 9741-5.
- Parthasarathy 1992.** Parthasarathy S, Steinberg D. *Cell-induced oxidation of LDL.* Curr Opin Lipidol 1992; 3 313-7.
- Parthasarathy 1994.** Parthasarathy S, Santanam N. *Mechanisms of oxidation, antioxidants, and atherosclerosis.* Curr Opin Lipidol 1994; 5: 371-5.
- Patsch 1982.** Patsch W, Ostlund R, Kuisk I, Levy R, Schonfeld G. *Characterization of lipoprotein in a kindred with familial hypercholesterolemia.* J Lipid Res 1982; 23: 1196-205.

- Pedreño 1994.** Pedreño J, de Castellarnau C, Cullaré C, Ortín R, Sánchez JL, Llopart R, González-Sastre F. *Platelet LDL receptor binds with the same apparent affinity both oxidized and native LDL. Evidence that receptor ligand complexes are not internalized.* Arterioscler Thromb 1994;14: 401-8.
- Peng 1985.** Peng SK, Taylor CB, Hill JC, Morin RJ. *Cholesterol oxidation derivatives and arterial endothelial damage.* Atherosclerosis 1985; 54: 121-5.
- Pentikainen 2000.** Pentikainen MO, Oorni K, Ala-Koperla M, Kovanen PT. *Modified LDL-trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima.* J Intern Med 2000; 247: 359-70.
- Pettersen 1991.** Pettersen KS, Boberg KM, Stabursvik A, Prydz H. *Toxicity of oxygenated cholesterol derivatives toward cultured human umbilical vein endothelial cells.* Arterioscler Thromb 1991; 11: 423-8.
- Pickard 1983.** Pickard L. *Increased ratio of plasma free fatty acids to albumin during normal aging and in patients with coronary heart disease.* Atherosclerosis 1983; 46: 21-8.
- Pitas 1992.** Pitas R.E, Frieria A, McGuire J, Dejager S. *Further characterization of the acetyl LDL (scavenger) receptor expressed by rabbit smooth muscle cells and fibroblasts.* Arterioscler and Thromb 1992; 12: 1235-44.
- Poddar 2001.** Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. *Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implication for vascular disease.* Circulation 2001; 103: 2717-23.
- Podrez 2000.** Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N et al. *Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species.* J Clin Invest 2000; 105: 1095-108.
- Prescott 1990.** Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. *Platelet-activating factor.* J Biol Chem 1990; 265: 17381-4.
- Price 1989.** Price P, McMillan TJ. *Use of tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cell to ionizing radiations.* Cancer Res 1989; 50:

1392-6.

- Price 1999.** Price DT, Loscalzo J. *Cellular adhesion molecules and atherogenesis.* Am J Med 1999; 107: 85-97.
- Pullinger 1995.** Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, Frost PH, Malloy MJ, Schumaker VN, Kane JP. *Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity.* J Clin Invest 1995; 95: 1225-34.
- Pyörälä 1987.** Pyörälä K, Laakso M, Uusitupa M. *Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view.* Diabetes Metab Rev 1987; 3: 463-524.
- Quinn 1988.** Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D. *Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role on atherogenesis.* Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 20805-9.
- Raal 1995.** Raal FJ, Areias AJ, Waisberg R, von Arb M. *Susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in familial hypercholesterolemia.* Atherosclerosis 1995; 115: 9-15.
- Raal 1999.** Raal FJ, Pilcher G, Waisberg R, Buthlezi EP, Veller MG, Joffe BI. *Low-density lipoprotein cholesterol bulk is the pivotal determinant of atherosclerosis in familial hypercholesterolemia.* Am J Cardiol 1999; 83: 1330-3.
- Rajavashitth 1990.** Rajavashitth TB, Andalibi A, Territo NC, Berliner JA, Navab M, Fogelman Am, Lusis AJ. *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating growth factors by modified low density lipoprotein.* Nature 1990; 344: 254-7.
- Rajavashitth 1995.** Rajavashitth TB, Yamada H, Mishra NK. *Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factor-kB.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15: 1591-8.
- Ramos 1998.** Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T, Miura S, Satake S, Asai T, Kanda S, Hayashi T, Iguchi A. *Induction of macrophage VEGF in response to oxidize LDL and VEGF accumulation in atherosclerotic lesions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 1188-96.

- Ramprasad 1995.** Ramprasad MP, Fischer W, Witzum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D. *The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein recognizes oxidized LDL and phosphatidylserine-rich liposomes and is identical to macrosialina, the mouse homologue of human CD68.* Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92: 9580-4.
- Ramprasad 1996.** Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O, Steinberg D. *Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein.* Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 14833-38.
- Rao 1995.** Rao GN, Alexander RW, Renge MS. *Linoleic acid and its metabolites 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 1995; 96: 842-7.
- Reape 1999.** Reape TJ, Groot PH. *Chemokines and atherosclerosis.* Atherosclerosis 1999; 147: 213-25.
- Reaven 1988.** Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen Y. *Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 hours in patients with NIDDM.* Diabetes 1988; 37: 1020-4.
- Reinila 1980.** Reinila A, Akerblom HK, Scow RO. *Accumulation of lipid in muscular arteries of short-term diabetic rats. An electro microscopy study.* Diabetologia 1980; 19: 529-34.
- Reinila 1981.** Reinila A. *Long-term effects of untreated diabetes on the arterial wall in rat. An ultrastructural study.* Diabetologia 1981; 20: 205-12.
- Richieri 1990.** Richieri GV, Mescher MF, Kleinfeld AM. *Short term exposure of cytotoxic T-lymphocytes to cis unsaturated free fatty acids inhibits degranulation of cytotoxic T lymphocytes.* J Immunol 1990; 144: 671-7.
- Roebuck 1999.** Roebuck KA. *Oxidant stress regulation of IL8 and ICAM1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB.* Int J Mol Med 1999; 4: 223-30.

- Rohrer 1990.** Rohrer L, Freeman M, Kodama T, Penman M, Krieger M. *Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II.* Nature 1990; 343: 570-2.
- Romano 1998.** Romano M, Romano E, Bjorkerud S, Hurt-Camejo E. *Ultrastructural localization of secretory type II phospholipase A2 in atherosclerotic and nonatherosclerotic regions of human arteries.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 519-25.
- Rosa 1996.** Rosa R, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C. *Cytotoxicity of hexachlorocyclohexane isomers and cyclodienes in primary cultures of cerebellar granule cells.* J Pharmacol Exp Ther 1996; 11: 423-8.
- Ross 1976.** Ross R, Glomset JA. *The pathogenesis of atherosclerosis.* N Engl J Med 1976; 259: 367-77.
- Ross 1986.** Ross R, Glomset JA. *The pathogenesis of atherosclerosis: an update.* N Engl J Med 1986; 314: 488-500.
- Ross 1990.** Ross R, Masuda J, Raines EW. *Cellular interactions, growth factors, and smooth muscle proliferation in atherogenesis.* Ann NY Acad Sci 1990; 598: 102-12.
- Ross 1993.** Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature 1993; 362: 801-9.
- Ross 1999.** Ross R. *Atherosclerosis - an inflammatory disease.* N Engl J Med 1999; 340:115-126.
- Rudel 1985.** Rudel LL, Bond MG, Bullock BC. *LDL heterogeneity and atherosclerosis in non-human primates.* Ann NY Acad Sci 1985; 454: 248-53.
- Rudel 1986.** Rudel LL, Parks JS, Johnson FL, Babiak J. *Low density lipoproteins in atherosclerosis.* J Lipid Res 1986; 27: 465-74.
- Ruelland 1993.** Ruelland A, Gallou G, Legras B, Paillard F, Cloarec L. *LDL sialic acid content in patients with coronary artery disease.* Clin Chim Acta 1993; 221: 127-33.

- Rumsey 1995.** Rumsey SC, Galeano NF, Lipschitz B, Deckelbaum RJ. *Oleate and other long chain fatty acids stimulate low density lipoprotein receptor activity by enhancing acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase activity and altering intracellular regulatory cholesterol pools in cultured cells.* J Biol Chem 1995; 270: 10008-16.
- Russell 1987.** Russell DW, Lehrman MA, Südhof TC, Brown MS, Goldstein JL. *The LDL receptor in familial hypercholesterolemia: Use of human mutations to dissect a membrane protein.* Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1987; 51: 811-9.
- Russell 1989.** Russell DW, Esser V, Hobbs HH. *Molecular basis of familial hypercholesterolemia.* Arteriosclerosis suppl; 9: I-8 I-13.
- Saito 1996.** Saito H, Minamida T, Arimoto I, Handa T, Miyajima K. *Physical states of surface and core lipids in lipid emulsions and apolipoproteins binding to the emulsion surface.* J Biol Chem 1996; 271: 15515-20.
- Salonen 1992.** Salonen JT, Ylä-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyyssonen K, Palinski W, Witztum JL. *Autoantibodies against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis.* Lancet 1992; 339: 883-7.
- Sambrano 1995.** Sambrano GR, Steinberg D. *Recognition of oxidatively damaged and apoptotic cells by an oxidized low density lipoprotein receptor on mouse peritoneal macrophages: role of membrane phosphatidylserine.* Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 1396-400.
- Sánchez-Quesada 1995.** Sánchez-Quesada JL, Homs-Serradesanferm R, Serrat-Serrat J, Serra-Grima JR, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos. *Increased of LDL to susceptibility to oxidation occurring after intense, long duration aerobic exercise.* Atherosclerosis 1995; 118: 297-305.
- Sánchez-Quesada 1996.** Sánchez-Quesada JL, Pérez A, Caixàs A, Ordóñez-Llanos J, Carreras G, Payés A, González-Sastre F, de Leiva A. *Electronegative low density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and is closely related to glycaemic control.* Diabetologia 1996; 39: 1469-76.

- Sánchez-Quesada 1997.** Sánchez-Quesada JL, Ortega H, Payés-Romero A, Serrat-Serrat J, González-Sastre F, Lasunción MA, Ordóñez-Llanos J. *LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects.* *Atherosclerosis* 1997; 132: 207-13.
- Sánchez-Quesada 1998.** Sánchez-Quesada JL, Jorba O, Payés A, Otal C, Serra-Grima JR, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos. *Ascorbic acid inhibits the increase in low-density lipoprotein (LDL) susceptibility to oxidation and the proportion of electronegative LDL induced by intense aerobic exercise.* *Coronary Artery Dis* 1998; 9: 249-55.
- Sánchez-Quesada 1999.** Sánchez-Quesada JL, Otal-Entraigas C, Franco M, Jorba O, González-Sastre F, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J. *Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia.* *Am J Cardiol* 1999; 84: 655-9.
- Sánchez-Quesada 2001.** Sánchez-Quesada JL, Pérez A, Caixàs A, Rigla M, Payés A, Benítez S, Ordóñez-Llanos J. *Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: nonenzymatic glycosylation and oxidative modifications.* *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3243-9.
- Sanderson 1995.** Sanderson KJ, van Rij AM, Wade CR, Sutherland WHF. Lipid peroxidation of circulating low density lipoproteins with age, smoking and in peripheral vascular disease. *Atherosclerosis* 1995; 118: 45-51.
- Sawamura 1997.** Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T. *An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein.* *Nature* 1997; 386: 73-7.
- Scatchard 1949.** Scatchard G. *The attractions of proteins for small molecules and ions.* *Ann NY Acad Sci* 1949; 51: 660-72.
- Schechter 1997.** Schechter AD, Rollins BJ, Zhang YJ, Charo IF, Fallon JT, Rossikhina M, Giesen PL, Nemerson Y, Taubman MB. *Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells.* *J Biol Chem* 1997; 272: 28568-73.

- Schuh 1979.** Schuh J, Fairclough GF, Haschemeyer RH. *Oxygen-mediated heterogeneity of apo-low density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 75: 3173-7.
- Schwartz 1994.** Schwartz D, Andalibi A, Chaverri-Almada L, Berliner JA, Kirchgessner T, Fang ZT, Tekamp-Olson P, Lusis AJ, Gallegos C, Fogelman AM. *Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to MM-LDL-stimulated endothelium*. J Clin Invest 1994; 94: 1968-73.
- Schwenke 1989a.** Schwenke DC, Carew TE. *Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits I. Focal increases in arterial LDL concentrations precede development of fatty streak lesions*. Arteriosclerosis 1989; 9: 895-907.
- Schwenke 1989b.** Schwenke DC, Carew TE. *Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits II. Selective retention of LDL versus selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries*. Arteriosclerosis 1989; 9: 908-18.
- Serhan 1996.** Serhan CN, Haeggström JZ, Leslie CC. *Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines*. FASEB J 1996; 10: 1147-58.
- Sevanian 1995.** Sevanian A, Hodis HN, Hwang J, McLeod LL, Peterson H. *Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL*. J Lipid Res 1995; 36: 1971-86.
- Sevanian 1996.** Sevanian A, Hwang J, Hodis H, Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo-Bon G. *Contribution of an in vivo oxidized LDL to LDL oxidation and its association with dense LDL subpopulations*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 784-93.
- Sevanian 1997.** Sevanian A, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hodis H, Hwang J, Zamburlini A, Maiorino M, Ursini F. *LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein*. J Lipid Res 1997; 38: 419-28.
- Shattil 1997.** Shattil SJ, Ginsberg MH. *Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology*. J Clin Invest 1997; 100: 1-5.

- Shafir 1958.** Shafir E. *Partion of unesterified fatty acid in normal and nephrotic syndrome serum and its effect on serum electrophoresic pattern.* J Clin Invest 1958; 37: 1775-82.
- Shi 2000.** Shi W, Haberland ME, Jien ML, Shih M, Lusis AJ. *Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice.* Circulation 2000; 102: 75-81.
- Shimano 1991.** Shimano H, Yamada N, Ishibashi S, Mokuno H, Mori N, Gotoda T, Harada K, Akamura Y, Murasa T, Yazaki Y, Takaku F. *Oxidation-labile subfraction of human plasma low density lipoprotein isolated by ion-exchange chromatography.* J Lipid Res 1991; 32: 763-73.
- Shukla 1992.** Shukla SD. *Platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanisms.* FASEB J 1992; 6: 2296-301.
- Siebenlist 1994.** Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. *Structure, regulation and function of NF-kB.* Annu Rev Cell Biol 1994; 10: 405-55.
- Sigal 1994.** Sigal E, Laughton CW, Mulkins MA. *Oxidation, lipoxigenase and aterogenesis.* Ann NY Acad Sci 1994; 714: 211-4.
- Skowronski 1991.** Skowronski R, Hollenbeck CB, Varasteh BB, Chen Y, Reaven GM. *Regulation of non-esterified fatty acid and glycerol concentration by insulin in normal individuals and patients with type 2 diabetes.* Diabetic Med 1991; 8: 330-3.
- Smith 1991.** Smith LL. *Another cholesterol hypothesis: cholesterol as an antioxidant.* Free Radi Biol Med 1991; 11: 47-61.
- Sobenin 1993.** Sobenin IA, Tertov VV, Koschinsky T, Bünting CE, Slavina ES, Dedov I, Orekhov AN. *Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells.* Atherosclerosis 1993; 100: 41-54.
- Sparrow 1989.** Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. *A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein.* J Biol Chem 1989; 264: 2599-604.

- Sparrow 1993.** Sparrow CP, Olszewski J. *Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions.* J Lipid Res 1993; 34:1219-28.
- Springer 1994.** Springer TA. *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.* Cell 1994; 76: 301-14.
- Srinivasan 1986.** Srinivasan SR, Vijayagopal P, Dalferes ER, Abbate B, Radhakrishnamurthy B, Berenson GS. *Low density lipoprotein retention by aortic tissue. Contribution of extracellular matrix.* Atherosclerosis 1986; 62: 201-8.
- Stafforini 1999a.** Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME, Prescott SM. *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor.* J Biol Chem 1987; 262: 4215-22.
- Stafforini 1999b.** Stafforini DM, Tjoelker LW, McCormick SPA, Vaitkus D, McIntyre TM, Gray PW, Young SG, Prescott SM. *Molecular basis of the interaction between plasma platelet-activating factor acetylhydrolase and low density lipoprotein.* J Biol Chem 1999; 274: 7018-24.
- Stalenhoef 1994.** Stalenhoef AFH, Defesche JC, Kleinveld HA, Demacker PNM, Kastelein JJP. *Decreased resistance against in vitro oxidation of LDL from patients with familial defective apolipoprotein B-100.* Arterioscler Thromb 1994; 14: 489-93.
- Steinberg 1983.** Steinberg D. *Lipoproteins and atherosclerosis: a look back and a look ahead.* Arteriosclerosis 1983; 3: 283-301.
- Steinberg 1989.** Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. *Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoproteins that increases its atherogenicity.* N Engl J Med 1989; 320: 915-24.
- Steinberg 1993.** Steinberg D. *Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis.* J Internal Med 1993; 233: 227-32.

- Steinberg 1983.** Steinberg D. *Lipoproteins and atherosclerosis: a look back and a look ahead.* Arteriosclerosis 1983; 283-301.
- Steinberg 1997.** Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, Bayazeed B, Baron AD. *Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation.* J Clin Invest 1997; 100: 1230-9.
- Steinberg 1999.** Steinberg D. *At last, direct evidence that lipoxygenases play a role in atherogenesis.* J Clin Invest 1999; 103: 1487-8.
- Steinbrecher 1984.** Steinbrecher UP, Witztum JL. *Glucosylation of low density lipoprotein to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism.* Diabetes 1984; 33: 130-4.
- Steinbrecher 1986.** Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. *Modification of low density lipoprotein involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids.* Proc Natl Acad Sci USA 1984; 83: 3883-7.
- Steinbrecher 1987.** Steinbrecher UP. *Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid decomposition products.* J Biol Chem 1987; 262: 3603-8.
- Steinbrecher 1988.** Steinbrecher UP. *Role of superoxide in endothelial cell modification of low density lipoprotein.* Biochim Biophys Acta 1988; 959: 20-30.
- Steinbrecher 1989.** Steinbrecher UP, Pritchard PH. *Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase.* J Lipid Res 1989; 30: 305-35.
- Stephan 1993.** Stephan ZF, Yurachek EC. *Rapid fluorimetric assay of LDL receptor activity by Dil-labeled LDL.* J Lipid Res. 1993; 34: 325-30.
- Stiko-Rahm 1990.** Stiko-Rahm A, Wilman B, Hamsten A, Nilsson J. *Secretion of plasminogen activator inhibitor 1 from cultured human umbilical vein endothelial cells is induced by very low density lipoprotein.* Arteriosclerosis 1990; 10: 1067-73.

- Stokes 1988.** Stokes III J. *Dyslipemia as cardiovascular risk and precocious death: the Framingham Study*. Eds Stokes III J, Mancini M. 1988. 59-67.
- Subbanagounder 2000.** Subbanagounder G, Leitinger N, Schwenke DC, Wong JW, LeeH, Rizza C, Watson AD, Faull KF, Fogelman AM, Berliner JA. *Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acyl groups at the sn-2 position*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2248-54.
- Swinkels 1988.** Swinkels DW, Demacker PNM, Hak-Lemmers HLM, Mol MJTM, Yap SH, van't Laar A. *Some metabolic characteristics of low density lipoprotein subfractions, LDL-1 and LDL-2: in vitro and in vivo studies*. *Biochim Biophys Acta* 1988; 960: 1-9.
- Swinkels 1990.** Swinkels DW, Hendricks JCM, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. *Differences in metabolism of three low density lipoprotein subfractions in Hep G2 cells*. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1047: 212-22.
- Tanaka 2000.** Tanaka Y. *Integrin activation by chemokines: relevance to inflammatory adhesion cascade during T cell migration*. *Histol Histopathol* 2000; 15: 1169-76.
- Teng 1985.** Teng B, Sniderman A, Krauss RM, Kwiterovich PO, Milne JBW, Marcell YL. *Modulation of apolipoprotein B antigenic determinants in human low density lipoprotein subclasses*. *J Biol Chem* 1985; 260: 5067-72.
- Terkeltaub 1994.** Terkeltaub R, Banka CL, Solan J, Santoro D, Brand K, Curtiss LK. *Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity*. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 47-53.
- Terkeltaub 1998.** Terkeltaub R, Boisvert WA, Curtiss LK. *Chemokines and atherosclerosis*. *Curr Opin Lipidol*. 1998; 9: 397-05.
- Terpstra 2000.** Terpstra V, van Amersfoort ES, van Velzen AG, Kuiper J, van Berkel TJC. *Hepatic and extrahepatic scavenger receptors. Functions in relation to disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1860-72.
- Tertov 1993.** Tertov VV, Orekhov AN, Sobenin IA, Morrisett JD, Gotto AM, Guevara JG. *Carbohydrate composition of protein and lipid components in sialic-rich*

and -poor low density lipoproteins from subjects with and without coronary artery disease. *J Lipid Res* 1993; 34: 365-75.

Tertov 1995. Tertov VV, Bittolo-Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN, Avogaro P. *Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: more electronegative and desialylated lipoprotein subfractions.* *Exp Mol Pathol* 1995; 62: 166-72.

Thomas 1994. Thomas MJ, Thornburg T, Manning J, Hooper K, Rudel LL. *Fatty acid composition of low density lipoprotein influences its susceptibility to autoxidation.* *Biochemistry* 1994; 33: 1828-34.

Thurberg 1998. Thurberg BL, Collins T. *The nuclear factor-kappaB/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis.* *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 387-96.

Tilly-Kiesi 1991. Tilly-Kiesi MK, Tikkanen MJ. *Differential low density lipoprotein hydrated density distribution in female and male patients with familial hypercholesterolemia.* *Clinica Chimica Acta* 1991; 201: 65-74.

Tokumora 2000. Tokumora A, Sumida T, Toujima M, Kogure K, Fukuzawa K. *Platelet-activating factor (PAF)-like oxidized phospholipids: relevance to atherosclerosis.* *Biofactors* 2000; 13: 29-33.

Tontonoz 1998. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. *PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.* *Cell* 1998; 93: 241-52.

Toyota 1999. Toyota Y, Yamamura T, Miyake Y, Yamamoto A. *Low density lipoprotein (LDL) binding affinity for the LDL receptor in hyperlipoproteinemia.* *Atheroscler* 1999; 147: 77-86.

Tremolli 1993. Tremolli E, Camera M, Maderna P, Sironi L, Prati L, Colli S, Piovella F, Bernini F, Corsini A, Mussoni L. *Increased synthesis of plasminogen activator inhibitor-1 by cultured human endothelial cells exposed to native and modified LDLs: an receptor-independent phenomenon.* *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 338-46.

- Tribble 1992.** Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM. *Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size.* Atherosclerosis 1992; 93:189-99.
- Tribble 1994.** Tribble DL, van den Berg JJM, Motchnik P, Ames BN, Lewis D, Chait A, Krauss RM. *Oxidative susceptibility to low density lipoprotein subfractions is related to their ubiquinol-10 and alpha-tocopherol content.* Proc Natl Acad Sci USA 1994; 94: 1183-7.
- Tribble 1995.** Tribble DL. *Lipoprotein oxidation in dyslipemia: insights into general mechanisms affecting lipoprotein oxidative behavior.* Curr Opin Lipidol 1995; 6: 196-208.
- Ursini 1998.** Ursini F, Zamburlini A, Cazzolato G, Maiorino M, Bon GB, Sevanian A. *Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis.* Free Radic Biol Med 1998; 25: 250-2.
- Van Berkel 1991.** van Berkel TJC, De Rijke YB, Kruijt JK. *Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells.* J Biol Chem 1991; 266: 2282-9.
- Van den Berg 1993.** van den Berg JJM, Winterbourn CC, Kuypers FA. *Hypochlorous acid-mediated modification of cholesterol and phospholipid: analysis of reaction products by gas chromatography-mass spectrometry.* J Lipid Res 1993; 34: 2005-10.
- Van der Kooij 1997.** Van der Kooij MA, Von der Mark EM, Kruijt JK, Van Velzen AG, Van Berkel TJC. *Human monocyte-derived macrophages express an approximately 120-kD ox-LDL binding protein with strong identity to CD68.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 3107-16.
- Van Driel 1987.** Van Driel IR, Goldstein JL, Sudhof TC, Brown MS. *First cysteine-rich repeat in ligand-binding domain of LDL receptor binds Ca^{+2} and monoclonal antibodies, but not lipoproteins.* J Biol Chem 1987; 262: 17443-9.

- Van Hinsbergh 1986.** Van Hinsbergh VW, Scheffer M, Havekes L, Kempen HJ. *Role of endothelial cells and their products in the modification of low density lipoproteins.* Biochim Biophys Acta 1986; 878: 49-64.
- Van Venzel 1997.** Van Venzel AG, Da Silva RP, Gordon S, Van Berkel TJC. *Characterization of a receptor for oxidized low-density lipoproteins on rat Kupffer cells: similarity to macrosialin.* Biochem J 1997; 322: 411-5.
- Vedie 1991.** Vedie B, Myara I, Pech MA, Maziere JC, Maziere C, Caprani A, Moatti N. *Fractionation of charge-modified low density lipoprotein by fast protein liquid chromatography.* J Lipid Res 1991; 32: 1359-69.
- Vedie 1998.** Vedie B, Jeunemaitre X, Mégnien JL, Myara I, Trébeden H, Simon A, Moatti N. *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 1998; 18: 1780-89.
- Via 1985.** Via D.P, Dressel H.A, Cheng S, Gotto A.M. *Murine macrophage tumors are a source of a 260.000-Dalton acetyl-low density lipoprotein receptor.* J Biol Chem 1985; 260: 7379-86.
- Via 1986.** Via DP, Smith LC. *Fluorescent labeling of lipoproteins.* Methods in Enzymology 1986; 129:848-54.
- Via 1989.** Via DP, Pons L, Dennison DK, Fanslow AE, Bernini F. *Induction of acetyl-LDL receptor activity by phorbol ester in human monocyte cell line THP-1.* J Lipid Res 1989; 30: 1515-24.
- Viens 1996.** Viens L, Athias A, Lizard G, Simard G, Gueldry S, Braschi S, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L. *Effect of lipid transfer activity and lipolysis on low density lipoprotein (LDL) oxidizability: evidence for lipolysis-generated non-esterified fatty acids as inhibitors of LDL oxidation.* J Lipid Res 1996; 37: 2179-92.
- Virchow 1856.** Virchow R. in *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin* 458-463 (Meidinger Sohn, Berlin, 1856).
- Vogel 1997.** Vogel RA. *Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review.* Clin Cardiol 1997; 20: 426-32.

- Volf 2000.** Volf I, Bielek E, Moeslinger T, Koller E, Koller F. *Modification of protein moiety of human low density lipoprotein by hypochlorite generates strong platelet agonist.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 2011-8.
- Wang 1996.** Wang N, Tabas I, Winchester R, Ravalli S, Rabbani LE, Tall A. *Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma.* J Biol Chem 1996; 271: 8837-42.
- Wang 1999.** Wang N, Verna L, Hardy S, Forsayeth J, Zhu Y, Stemerman MB. *Adenovirus-mediated overexpression of c-jun and c-fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2078-84.
- Watson 1997a.** Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Horkko S, Witztum JL, Palinski W, Schwenke D, Salomon RG, Sha W, Subbanagounder G, Fogelman AM, Berliner AJ. *Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo.* J Biol Chem 1997; 272: 13597-07.
- Watson 1997b.** Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott AM, Stafforini DM, McIntyre TM, La Du BN, Fogelman AM, Berliner AJ. *Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein.* J Clin Invest 1995; 95: 774-82.
- Webb 1998.** Webb NR, Connell PM, Graf GA, Smart EJ, De Villiers WJS, de Beer FC, Van der Westhuyzen DR. *SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells.* J Biol Chem 1998; 273: 15241-48.
- Weber 1996a.** Weber C, Katayama J, Springer TA. *Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils.* Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 10939-44.

- Weber 1996a.** Weber C, Alon R, Moser B, Springer TA. *Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis.* J Cell Biol 1996; 134: 1063-73.
- Weber 1997.** Weber C, Erl W, Weber KS, Weber PC. *HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia.* J Am Coll Cardiol 1997; 30: 1212-7.
- Weber 1998.** Weber EW, Weber C. *Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoproteins mediated by distinct endothelial ligands.* Atherosclerosis 1998; 136: 297-303.
- Weber 1999.** Weber KS, Nelson PJ, Grone HJ, Weber C. *Expression of CCR2 by endothelial cells: implications for MCP-1 mediated wound in repair and in vivo inflammatory activation of endothelium.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2085-93.
- Weis 1991.** Weis JR, Pitas RE, Wilson BD, Rodgers GM. *Oxidized low-density lipoprotein increases cultured human endothelial cell tissue factor activity and reduces protein C activation.* FASEB J 1991; 5: 2459-65.
- Wenzel 1978.** Wenzel DC, Hale TW. *Toxicity of free fatty acids for cultured rat heart muscle and endothelioid cells. Saturated and unsaturated long-chain fatty acids.* Toxicology 1978; 11: 109-25.
- Whatley 1990.** Whatley RE, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. *Lipid metabolism and signal transduction in endothelial cells.* Prog Lipid Res 1990; 29: 45-63.
- Williams 1995.** Williams KJ, Tabas I. *The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15: 551-561.
- Williams 1998.** Williams KJ, Tabas I. *The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced.* Curr Opin Lipidol 1998; 9: 471-4.

- Witztum 1982.** Witztum JL, Mahoney EM, Branks MJ, Fisher J, Elam R, Steinberg D. *Nonenzymatic glycosylation of low density lipoprotein alters its biologic activity.* Diabetes 1982; 31: 283-91.
- Witztum 1993.** Witztum JL. *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis.* Br Heart J 1993; 69(suppl): S12-S18.
- Wolff 1988.** Wolff N. Morphological changes on atherosclerosis and effect of hyperlipidemia on the arterial wall. In: Hypercholesterolemia: clinical and therapeutical implications. Stokes III J, Mancini M eds. Raven Press:New York. 1988: 34-58.
- Wong 1997.** Wong LM, Myers SJ, Tsou CL, Gosling J, Arai H, Charo IF. *Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking.* J Biol Chem 1997; 272: 1038-45.
- Wright 1990.** Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathinson JC. *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.* Science 1990; 249: 1431-3.
- Wu 1999.** Wu D, Koga T, Martin KR, Meydani M. *Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell production of chemokines and adhesion to monocytes.* Atherosclerosis 1999; 147: 297-307.
- Xu 1995.** Xu L, Kelvin DJ, Ye GQ, Taub DD, Ben-Barauch A, Oppenheim JJ, Wang JM. *Modulation of IL-8 receptor expression on purified human T lymphocytes is associated with changed chemotactic responses to IL-8.* J Leukoc Biol 1995; 57: 335-42.
- Yagi 1987.** Yagi K. Lipid peroxides and human diseases. Chem Phys Lipids 1987;45:337-51.
- Yamaguchi 1998.** Yamaguchi Y, Kagota S, Kunitomo M, Haginaka J. *Evidence of modified lipoprotein in the plasma of Watanabe heritable hyperlipemic rabbits by anion-exchange high-performance liquid chromatographic assay.* Atherosclerosis 1998; 139: 323-31.

- Yamane 1996.** Yamane N, Kataoka S, Le NA, Paidi M, Howard WJ, Hannah JS, Howard BV. *Binding affinity and particle size of LDL in subjects with moderate hypercholesterolemia: relationship with in vivo LDL metabolism.* J Lipid Res 1996; 37: 1646-54.
- Yang 1994.** Yang X, Cai B, Sciacca RR, Cannon PJ. *Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low density lipoproteins.* Circ Res 1994; 74: 318-28.
- Yeh 2001.** Yeh M, Leitinger N, Martin R, Onai N, Matsushima K, Vora DK, Berliner JA, Reddy ST. *Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF- α and oxidized phospholipids.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21: 1585-91.
- Yla-Herttuala 1986.** Yla-Herttuala S, Jaakkola O, Solakivi T, Kuivaniemi H, Nikkari T. *The effect of proteoglycan, collagen and lysyl oxidase on the metabolism of low density lipoprotein by macrophages.* Atherosclerosis 1986; 62: 73-80.
- Yla-Herttuala 1989.** Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. *Evidence for the presence of oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions of rabbit and man.* J Clin Invest 1989, 84:1086-95.
- Yla-Herttuala 1991.** Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. *Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions.* Proc Natl Acad Sci 1991; 88: 5252-6.
- Yoshida 1998.** Yoshida H, Quehenberger O, Kondratenko N, Green S, Steinberg D. *Minimally oxidized low density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 794-802.
- Yu 1992.** Yu X, Dluz S, Graves DT, Zhang L, Antoniades HN, Hollander W, Prusty S, Valente AJ, Schwartz CJ, Sonenshein GE. *Elevated expression of*

monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 6953-7.

Yue 1994. Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu JL, Feuerstein GZ. *Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells.* Circ Res 1994; 75: 1-7.

Zannis 1984. Zannis VI, McPherson J, Goldberger G, Karathanasis SK, Breslow JL. *Synthesis, intracellular processing, and signal peptide of human apolipoprotein E.* J Biol Chem 1984; 259: 5495-9.

Zannis 1986. Zannis VI, vanderSpek J, Silverman D. *Intracellular modifications of human apolipoprotein E.* J Biol Chem 1986; 261: 13415-21.

Zavodnik 1997. Zavodnik IB, Zaborowski A, Niekurzak A, Bryszewska M. *Effect of free fatty acids on erythrocyte morphology and membrane fluidity.* Biochem Moll Biol Int 1997; 42: 123-33.

Zhu 1998a Zhu Y, Liao HL, Lin JH, Verna L, Stemerman MB. *Low-density lipoprotein augments interleukin-1-induced vascular adhesion molecule expression in human endothelial cell.* Atherosclerosis 1998; 144: 357-65.

Zhu 1998b. Zhu Y, Lin JH, Liao HL, Friedli OJ, Verna L, Marten NW, Straus DS, Stemerman MB. *LDL induces transcription factor activator protein-1 in human endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 473-80.

Zhu 1999. Zhu L, Bisgaier CL, Aviram M, Newton RS. *9-cis retinoic induces monocyte chemoattractant protein-1 secretion in human monocytic THP-1 cell.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2105-11.

Zilversmit 1973. Zilversmit DB. *A proposal linking atherogenesis to interaction of endothelial lipoprotein lipase with triglyceride-rich lipoproteins.* Circ Res 1973; 33: 633-8.

Zimmerman 1996. Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE, McIntyre TM, Prescott SM, Topham MK, Whatley RE. *Platelet-activating-factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions.* Adv Exp Med Biol 1996; 416: 297-304.

Ziouzenkova 1999. Ziouzenkova O, Asatryan L, Akmal M, Tetta C, Wratten ML, Loseto-Wich G, Jürgens G, Heinecke J, Sevanian A. *Oxidative cross-linking of apoB100 and hemoglin results in low density lipoprotein modifications in blood.* Journal Biol Chem 1999; 27: 18916-24.

Ziouzenkova 2000. Ziouzenkova O, Sevanian A. *Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) in HD patients: role in electronegative formation.* Blood Purif 2000; 18: 169-76.