

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI

Varis autors han descrit la presència a circulació d'una subfracció minoritària d'LDL amb major càrrega negativa, anomenada LDL electronegativa. L'LDL està considerada com a una partícula aterogènica, però en principi no ho és quan es troba en estat natiu, sinó quan pateix un procés de modificació com glicació, acetilació o oxidació, que tenen en comú un augment en la càrrega elèctrica de l'LDL. Per tant, es pot considerar que l'LDL electronegativa és una forma modificada que pot presentar característiques aterogèniques.

Tanmateix, entre els autors existeixen discordàncies sobre l'origen i propietats de l'LDL electronegativa, sobretot hi ha controvèrsia en discernir si els processos lipoperoxidatius són responsables de la generació de l'LDL(-) o si hi han altres tipus de modificacions responsables del seu increment en càrrega negativa. En aquest aspecte, és de gran importància determinar les seves característiques fisico-químiques d'aquesta partícula, ja que condicionaran l'aclariment plasmàtic de l'LDL electronegativa juntament amb el seu efecte sobre l'endoteli, i, a la seva vegada, aquest comportament determinarà el risc aterogènic de la partícula. D'altra banda, està descrit que l'LDL electronegativa es troba augmentada en patologies com la hipercolesterolèmia familiar, situació que està associada a un alt risc aterogènic.

OBJECTIUS

OBJECTIU GENERAL

L'objectiu general de la present tesi doctoral ha estat l'estudi de l'LDL(-) en dues situacions, els individus normolipèmics (NL) i una patologia en la qual es troba incrementada, la hipercolesterolèmia familiar (HF). Per assolir aquest objectiu es va

considerar de gran relevància establir les característiques de la partícula en ambdós tipus de subjectes, tant a nivell físico-químic com del seu comportament biològic, en l'aspecte de la interacció amb els receptors cel·lular i l'efecte sobre la funció endotelial. D'aquesta manera, s'intenta determinar l'origen, bé oxidatiu o causat per altres modificacions, i el paper aterogènic de l'LDL electronegativa tant procedent de NL com d'HF, comparant les seves característiques en els dos casos.

OBJECTIUS ESPECÍFICS

- A) Analitzar les característiques físico-químiques de l'LDL electronegativa, incloent percentatge, densitat, composició lipídica i apoproteïca, contingut en àcid siàlic, caracterització electroforètica, paràmetres oxidatius i susceptibilitat a l'agregació.
- B) Estudiar la interacció de l'LDL(-) amb els receptors que determinaran la seva metabolització: el receptor d'LDL, via normal d'aclariment de la partícula, i el receptor scavenger, via aterogènica que comporta l'acumulació intracel·lular de colesterol esterificat i consegüent formació de cèl·lules espumoses.
- C) Realitzar estudis de càrrega "in vitro" d'LDL amb àcids grassos no esterificats (NEFA), els quals es van trobar considerablement augmentats en l'LDL(-), amb l'objectiu de comprovar si aquesta LDL-NEFA reproduïx, totalment o en part, les propietats de la fracció electronegativa.
- D) Determinar el seu paper aterogènic avaluant l'efecte sobre les cèl·lules endotelials a nivell de citotoxicitat i de producció d'alguns factors implicats en l'origen i evolució de la lesió ateroscleròtica: les quimioquines IL-8 i MCP-1, la molècula d'adhesió VCAM i l'agent antifibrinolític PAI-1.

MATERIAL I MÈTODES

1 AÏLLAMENT DE L'LDL TOTAL I LDL ELECTRONEGATIVA

1.1 PREPARACIÓ DELS POOLS DE PLASMA

Es van realitzar pools a partir de plasma, recollit en tubs Vacutainer amb EDTA, procedent de sobrants d'extraccions realitzades en exàmens de salut, d'individus normolipèmics per una banda i de subjectes hipercolesterolèmics familiars (HF) per una altra. En tots els casos es va obtenir el consentiment dels subjectes per a l'ús amb propòsit científic de les seves mostres. Per identificar els individus afectes d'HF es van seguir els criteris del MEDPED (Williams 1999) que inclou història familiar, identificació de signes clínics d'hipercolesterolèmia severa (arc corneal prematur, xantomes tuberossos) i els criteris bioquímics que s'indicaran a continuació, a més de discriminar els de valor elevat de triglicèrids per tal de no incloure malalts d'hiperlipèmia familiar combinada. Es van triar com a NL els individus en què s'havia descartat una dislipèmia, considerant que després de la preparació del pool els valors de colesterol (CT), apolipoproteïna B (apoB) i triglicèrids (TG) no van excedir els límits que s'indiquen. En ambdos tipus de subjectes també es van descartar individus diagnosticats com a diabètics i/o hipertensos.

<u>HF</u>
CT > 8 mM
TG < 2 mM
cLDL > 5.5 mM

<u>NL</u>
CT < 5 mM
TG < 1.3 mM
apoB < 1 g/L

A partir dels pools de plasma es va realitzar l'aïllament seqüencial de les lipoproteïnes tal i com s'indica al següent apartat.

1.2 SEPARACIÓ DE L'LDL I ALTRES LIPOPROTEÏNES

Com s'ha descrit a la introducció, les partícules lipoproteïques es classifiquen en funció de la seva densitat en:

quilomicrons	< 0.96 kg/L
VLDL	0.96 - 1.006 kg/L
IDL	1.006 - 1.019 kg/L
LDL	1.019 - 1.063 kg/L
Lp(a)	1.050 - 1.100 kg/L
HDL	1.063 - 1.210 kg/L

En conseqüència, es poden separar les diferents lipoproteïnes segons la seva densitat realitzant un aïllament seqüencial mitjançant ultracentrifugació de flotació (Havel 1955). Si es parteix d'un pool de plasmes humans s'ha de considerar que es troba inicialment a una densitat de 1.006 kg/L i per portar a la densitat desitjada s'ha d'afegir la quantitat de KBr adequada, que es pot calcular fent ús de la fórmula:

$$\text{grams de KBr} = \frac{\text{volum (ml)} \times (\text{densitat final} - \text{densitat inicial})}{1 - (0.312 \times \text{densitat final})}$$

Un cop el plasma s'ha portat a la densitat adient, el procediment es repartir el volum en tubs d'ultracentrifugació i superposar un volum de la solució de densitat que es vol assolir, fins arribar al volum màxim dels tubs utilitzats. Generalment es van fer servir tubs de policarbonat de paret rígida de 20 ml. Les solucions de densitat es van preparar a partir de la solució de densitat 1.006 kg/L afegint la quantitat adient de KBr. La composició de la solució de densitat 1.006 kg/L és la següent:

Solució 1.006
Cloranfenicol 0.15 mM
NaCl 150 mM
EDTA 1 mM
Gentamicina 80 mg/L
pH 7.4

En aquesta solució de 1.006 kg/L el cloranfenicol i la gentamicina són antibiòtics, i l'EDTA impedeix l'oxidació i és inhibidor de les metaloproteases.

Després de superposar la solució de densitat es va procedir a realitzar l'ultracentrifugació a 100000g (36000 rpm als rotors d'angle fix TFT 70.38 i TFT 55.38 de Kontron) i a una temperatura de 4°C durant aproximadament 20 hores. Les lipoproteïnes de densitat inferior a la que es porta amb el KBr van surar després de l'ultracentrifugació. Aquest procés es mostra esquemàticament a la Figura 1 i es detalla a continuació.

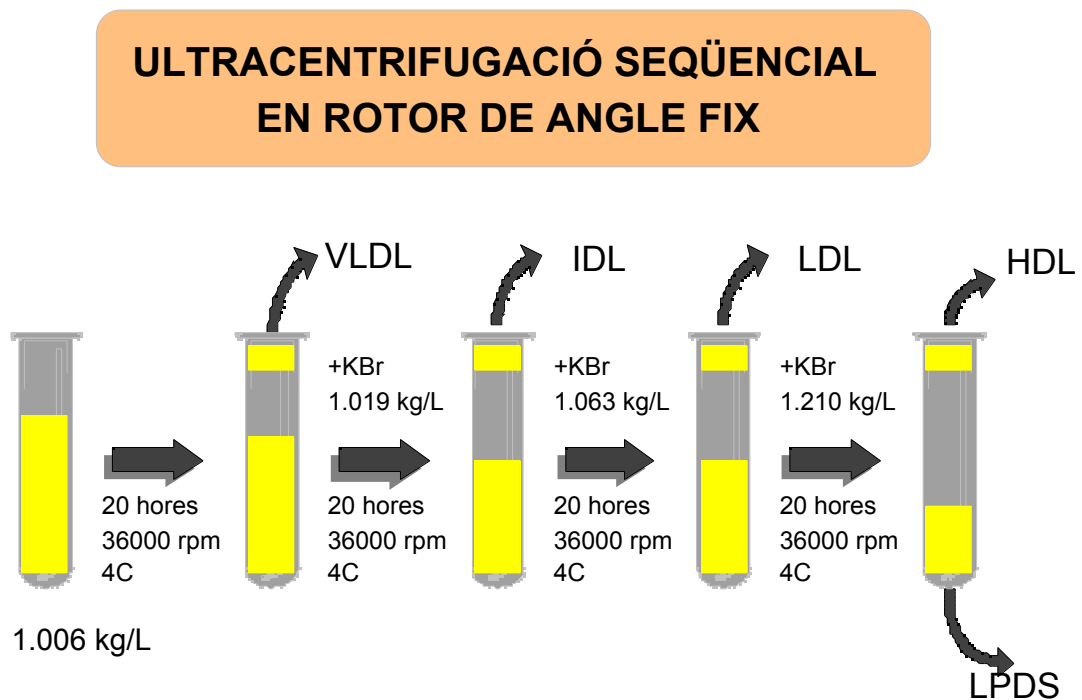


Figura 1. Ultracentrifugació seqüencial en rotor d'angle fixe.

Procediment d'aïllament de lipoproteïnes per ultracentrifugació seqüencial:

- Per aïllar en un sol pas VLDL i IDL s'ajusta el sèrum a una densitat de 1.019 kg/L. Com l'VLDL i la IDL presenten una densitat inferior queden al sobrenedant després d'ultracentrifugar i per tant es poden separar.
- Seguidament per aïllar l'LDL de forma general es porta a densitat 1.063 kg/L, però al nostre cas a 1.050 kg/L, de manera que es considera que l'LDL es la fracció aïllada en el rang de densitats 1.019-1.050 kg/L. Aquesta és la densitat triada per evitar contaminació en l'LDL(-) amb Lp(a), la qual presenta una densitat de entre 1.050-1.100 kg/L.
- En algunes ocasions es va aïllar el sèrum lliure de lipoproteïnes (LPDS) en un pas posterior, per assolir aquest objectiu es va fer surar l'HDL. Per aïllar l'HDL el tall de densitat és a 1.210 kg/L, quedant a l'infranedant l'LPDS. L'LPDS va ser utilitzat per preparar medi deficient en lipoproteïnes amb què incubar les cèl.lules en determinats experiments. Prèviament al seu ús, s'ha de dialitzar amb sèrum fisiològic i inactivar a 56°C durant 2 hores seguit d'ultracentrifugació a 15000 rpm durant 30 minuts a 15° amb l'objectiu d'eliminar la fibrina.

Per conservar les lipoproteïnes, un cop aïllades, és important dialitzar-les en front a un tampó per tal d'eliminar el KBr. Normalment, la diàlisi es va realitzar en l'anomenat tampó A, el qual al contenir EDTA preveu l'oxidació, o bé, per alguns assajos, en tampó fosfat salí (PBS). La diàlisi es va portar a terme per columnes de gel filtració PD-10 (Sephadex-25, Amersham Pharmacia, Suècia), o, en cas de tenir un volum de mostra gran, en sac de diàlisi. Un cop dialitzada la mostra es conserva a 4°C.

Tampó A

Tris-HCl 10 mM
EDTA 1 mM
pH 7.4

PBS

NaCl 14 mM
KCl 0.27 mM
Na₂HPO₄ 0.65 mM
KH₂PO₄ 0.15 mM
pH 7.4

1.3 OBTENCIÓ DE SUBFRACCIONS D'LDL

Es van obtenir 6 subfraccions d'LDL mitjançant ultracentrifugació en gradient de densitat a partir del sèrum dels individus NL/HF, seguint el següent procediment (Griffin 1990) modificat pel nostre grup (Sánchez-Quesada 1996, Caixàs 1997).

- Es porten 3 ml de sèrum a densitat 1.090 kg/L.
- En tubs especials per al rotor basculant SW40 es col.loquen 0.5 ml de solució de densitat 1.182 kg/L, seguidament es superposa el sèrum que estava a 1.090 kg/L, i a continuació s'han de superposar diferents solucions de densitat tal i com s'indica a la següent taula:

solució de densitat (kg/L)	volum (ml)
1.060	1
1.056	1
1.045	1
1.034	2
1.024	2
1.019	2

- S'equilibren els tubs i es posen a ultracentrifugar en rotor basculant durant 20 hores a 37000 rpm a una temperatura de 20°C. Un cop s'ha produït l'ultracentrifugació s'ha d'aturar sense fre, per tal de no desmuntar el gradient.
- Un cop tenim el tub s'ha de treure una primera alíquota de 3.4 ml, que seria la corresponent a la fracció VLDL+IDL, la qual serà descartada.
- A continuació es separen 6 alíquotes de 0.8 ml, que serien les corresponents a les diferents subfraccions de l'LDL, de manera que aquestes alíquotes anirien en ordre creixent de densitat. Es considera que les subfraccions 1-3 són les fraccions lleugeres i de la 4-6 són les fraccions denses de l'LDL.
- Aquestes diferents subfraccions van ser posteriorment cromatografiades per separar LDL electronegativa i avaluar el seu percentatge en funció de la densitat de l'LDL.

A la Figura 2 es mostra un esquema dels passos d'aquest procés.

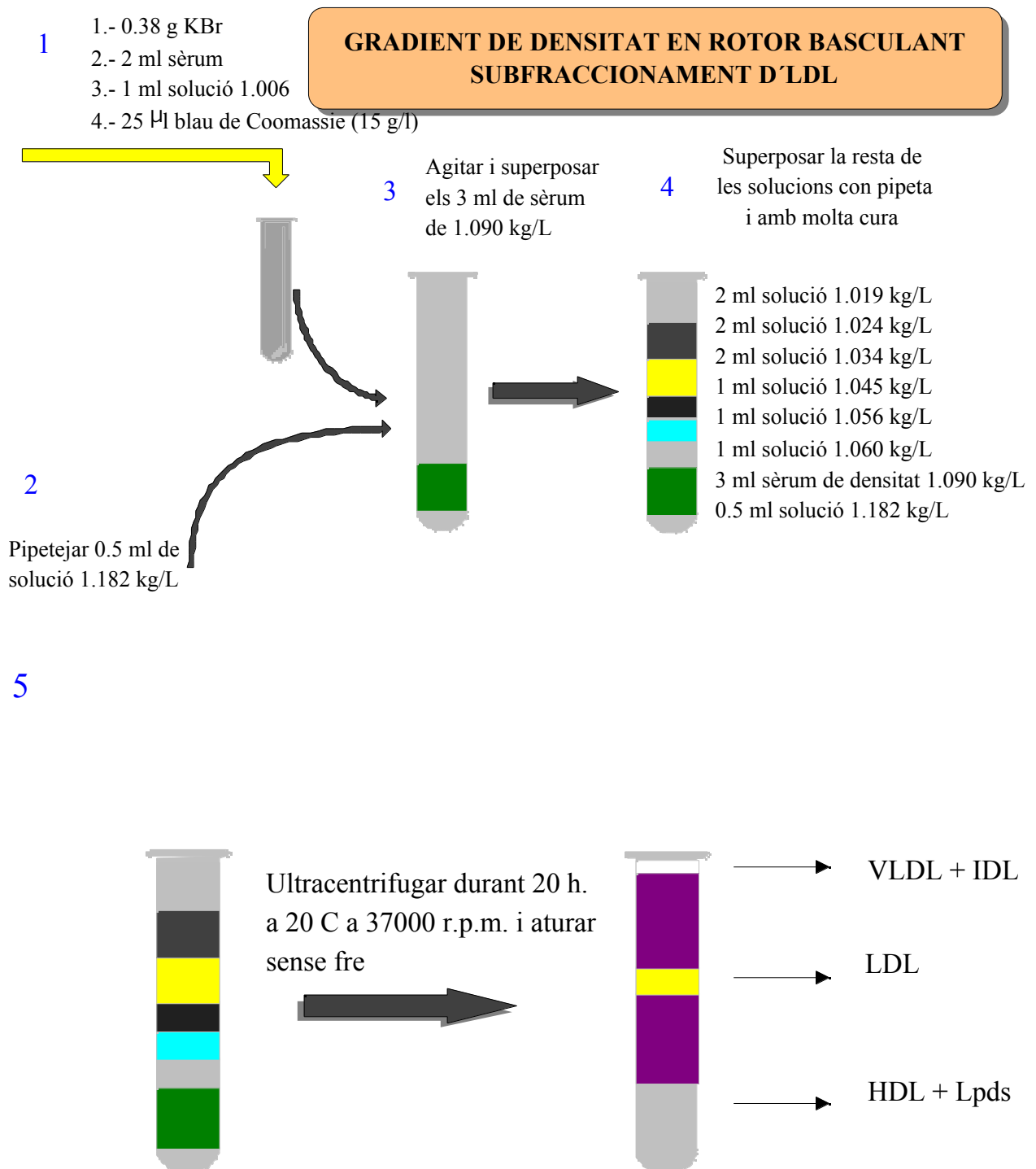


Figura 2. Subfraccionament de l'LDL en gradient de densitat mitjançant rotor basculant.

1.4 AÏLLAMENT DE L'LDL ELECTRONEGATIVA (LDL(-))

Prèviament a l'aïllament de les fraccions d'LDL en funció de la càrrega, l'LDL total ha de ser dialitzada en tampó A i filtrada a través de 0.45µm.

L'LDL electronegativa o LDL(-) es va separar de la forma nativa mitjançant cromatografia de bescanvi aniònic i detecció a 280 nm seguint mètodes ja descrits (Vedie 1991, Sánchez-Quesada 1996, de Castellarnau 2000), però amb la introducció d'algunes modificacions.

Depenent del tipus de mostra utilitzada i la finalitat de l'experiment l'aïllament es va portar a terme mitjançant diferent tipus de columna. Si l'objectiu era evaluar la proporció d'LDL(-) va ser utilitzada la columna analítica monoQ HR 5/5 (Amersham Pharmacia) (Sánchez-Quesada 1996). Si es partia d'un volum de mostra elevat i l'objectiu era obtenir les fraccions LDL(+) i LDL(-) per recuperar-les i realitzar estudis posteriors, es va fer servir la columna preparativa Q-Sepharosa High Performance 35/100 (Amersham Pharmacia) (de Castellarnau 2000). En ambdós casos la columna estava adaptada a un sistema de FPLC o Fast Protein Liquid Chromatography (Pharmacia Biotech). La columna mono-Q es va utilitzar per valorar l'electronegativitat d'LDL carregada en NEFA i la de diferents subfraccions de densitat de l'LDL. Amb la columna preparativa es van aïllar les fraccions d'LDL(+) i LDL(-) a partir de pools d'LDL provinent d'individus NL i HF. Aquesta columna de Q-Sepharosa té una capacitat que permet treballar amb una quantitat de fins a més de 60 mg totals d'LDL, fent ús d'un loop de 10 ml.

Independentment del tipus de columna emprada el tampó d'unió utilitzat va ser el tampó A, i el d'elució és el tampó salí anomenat tampó B. És important realitzar, abans d'aplicar la mostra, l'equilibratge de la columna amb tampó B,

almenys amb dos volums de columna, que en el cas de la Q-Sepharosa representa 200 ml. Posteriorment s'ha de reequilibrar amb altres dos volums de tampó A.

<p style="text-align: center;"><u>Tampó B</u> Tris-HCl 10 mM NaCl 1 M EDTA 1 mM pH 7.4</p>

La separació de les dues fraccions d'LDL en funció de la càrrega es va produir utilitzant un gradient salí esglaonat. Primerament, es va provar un gradient salí lineal en la columna mono-Q, però la separació entre els pics d'LDL(+) i LDL(-) no era ben definida, de manera que els dos pics cromatogràfics quedaven superposats. Per aquest motiu es va descartar aquest mètode de separació, utilitzant finalment el gradient salí esglaonat. Respecte al fluxe, en el cas de la columna preparativa va ser de 4 ml/minut i en el de la mono-Q de 1 ml/minut.

Els mètodes, diferents segons la columna emprada, es mostren detallats en les següents taules, on s'inclou també la descripció del mètode amb gradient lineal de la mono-Q.

Mètode lineal de la columna analítica mono-Q (fluxe 1 ml/min)

Volum (ml)	% Tampó B
0-25	0-40 % (continu)
25-30	40-100 % (continu)
30-32	100 %
32-37	0%

Mètode esglaonat de la columna analítica mono-Q (fluxe 1 ml/min)

Volum (ml)	% tampó B
0-10	0-10 % (continu)
10-18	23%
18-25	45%
25-32	100%
32-35	0%

Mètode esglaonat de la columna preparativa Q-sepharosa (fluxe 4 ml/min)

Volum (ml)	% tampó B
0-100	0%
100-200	0-10% (continu)
200-400	22%
400-600	50%
600-800	100%
800-1000	0%

Per aquests mètodes cromatogràfics es van aïllar les dues fraccions, l'LDL(+) o forma nativa i l'LDL(-) o electronegativa, les quals van eluir respectivament a 0.22 M i 0.5 M de NaCl en el cas de la columna preparativa, i a 0.23 M i 0.45 M en el cas de l'analítica. A l'apartat de resultats es mostren cromatogrames representatius a la Figura 1.

El percentatge relatiu de la fracció electronegativa es va quantificar en funció del contingut en colesterol, apoB i per integració de l'àrea del pic cromatogràfic (absorbància a 280 nm).

Un cop separades les fraccions i calculada la proporció de cadascuna, es van reconcentrar per mitjà d'ultracentrifugació (10 hores, 36.000 rpm, 4°C), i seguidament es va procedir a la seva caracterització.

La columna es va netejar cada 4 o 5 punxades, per evitar l'acumulació de brutícia. El rentat es realitza invertint la posició de la columna i fent-li passar 1 M NaOH, aigua i 70% etanol, seguint les instruccions del fabricant.

2- CARACTERITZACIÓ FÍSICO-QUÍMICA

2.1 COMPOSICIÓ EN LÍPIDS I APOLIPOPROTEÏNES

El contingut lipídic es va valorar per mitjà de mètodes comercials de tipus enzimocolorimètrics adaptats a un analitzador automàtic Hitachi 911. Concretament es van utilitzar kits de Roche (Roche Diagnostics, Suïssa) per la determinació de colesterol lliure (CL) i total (CT), triglicèrids (TG), mentres que fosfolípids (FL) i àcids grassos no esterificats (NEFA) es van avaluar per kits de Wako (Wako Chemicals, Alemanya). Les diferents apoproteïnes es van quantificar per mètodes comercials immunoturbidimètrics també en Hitachi 911, incloent apo A-I, apoB (Roche) apoC-II, apoC-III, apoE (Wako). També per aquest sistema i mètode immunològic, es va valorar la presència d'Lp(a) (Roche). A continuació, es comenten els fonaments de les determinacions d'aquests lípids i apoproteïnes segons els mètodes comercials

emprats. També s'indiquen els coeficients de correlació (CV) interdia de les tècniques.

Fonaments en què es basen els mètodes:

- Colesterol lliure: oxidació per acció de la colesterol oxidasa donant lloc a la formació de colestenoïna i H_2O_2 . L' H_2O_2 reacciona amb la 4-aminoantipirina i el 4-fenol per acció de la peroxidasa i es produeix una condensació oxidativa que produeix color vermell detectable a 505 nm. (CV<1.5%)
- Colesterol total: trencament enzimàtic dels ésters de colesterol per acció de la colesterol esterasa i posterior oxidació del colesterol que dona lloc a la formació de H_2O_2 , aquesta per acció de la peroxidasa sofrirà la mateixa reacció que pel colesterol lliure. (CV< 2%).
- Triglicèrids: acció de la LpL que hidrolitza els TG a glicerol, el qual per reacció oxidativa dona lloc a dihidroxiacetona fosfat i H_2O_2 , aquesta última tindrà la reacció amb la peroxidasa. (CV< 0.9%).
- Fosfolípids: reacció amb fosfolipasa D originat-se colina, la qual en presència de colina oxidasa dona lloc a betaïna i H_2O_2 . Seguidament, té lloc la reacció de l' H_2O_2 amb la peroxidasa. (CV< 2%).
- NEFA: reacció amb el coenzim A i ATP originant-se acil-CoA, a partir del qual per acció de l'acilCoA oxidasa es forma H_2O_2 , que sofrirà després una reacció de condensació oxidativa. (CV< 3%).
- Apolipoproteïnes: reacció amb anticòs antiapo concreta i formació d'agregat insoluble, el qual augmenta la turbidesa que es mesura òpticament. (apoB CV< 3%, apo AI CV< 1.1%, Lp(a) CV< 2%).

2.2 MÈTODES CROMATOGRÀFICS

2.2.1 ÀCID SIÀLIC

El contingut en àcid siàlic es va mesurar per un sistema HPLC (Hewlett Packard, sèrie 1050) per cromatografia en fase reversa en columna C18 (columna Hypersil ODS 0.46x20 cm, 5 μ m, Hewlett Packard) i mitjançant detecció

fluorimètrica. Com a estàndard extern es va fer servir àcid acetilneuramínic (NANA). El procediment es va seguir segons metodologia descrita (Li 1992b).

Procediment:

- S'hidrolitza la mostra, un volum de 5 μ l d'LDL (0.5 g/L) o de NANA (16.6 μ M), amb 100 μ l de H₂SO₄ 0.05 M durant 30 minuts a 80°C. L'objectiu és alliberar l'àcid siàlic.
- Es deixa refredar la barreja i a continuació es derivatitza l'àcid siàlic mitjançant incubació amb 200 μ l de malononitril (solució aquosa al 0.8%) i 1.5 ml de tampó borat (0.15 M pH 9.5) a 80°C durant 30 minuts, temps suficient per a que es desenvolupi la fluorescència.
- S'injecten 20 μ l al cromatògraf. El flux de la fase mòbil és de 1 ml/min. La fase mòbil està composta de metanol i acetat amònic a pH 5.5 (15:85 en proporció de volum), la qual s'ha de filtrar a 0.45 μ m i es conserva a 4°C. La detecció té lloc a d'excitació de 357 nm i d'emissió a 434 nm

A continuació es mostra a la Figura 3 un cromatograma representatiu.

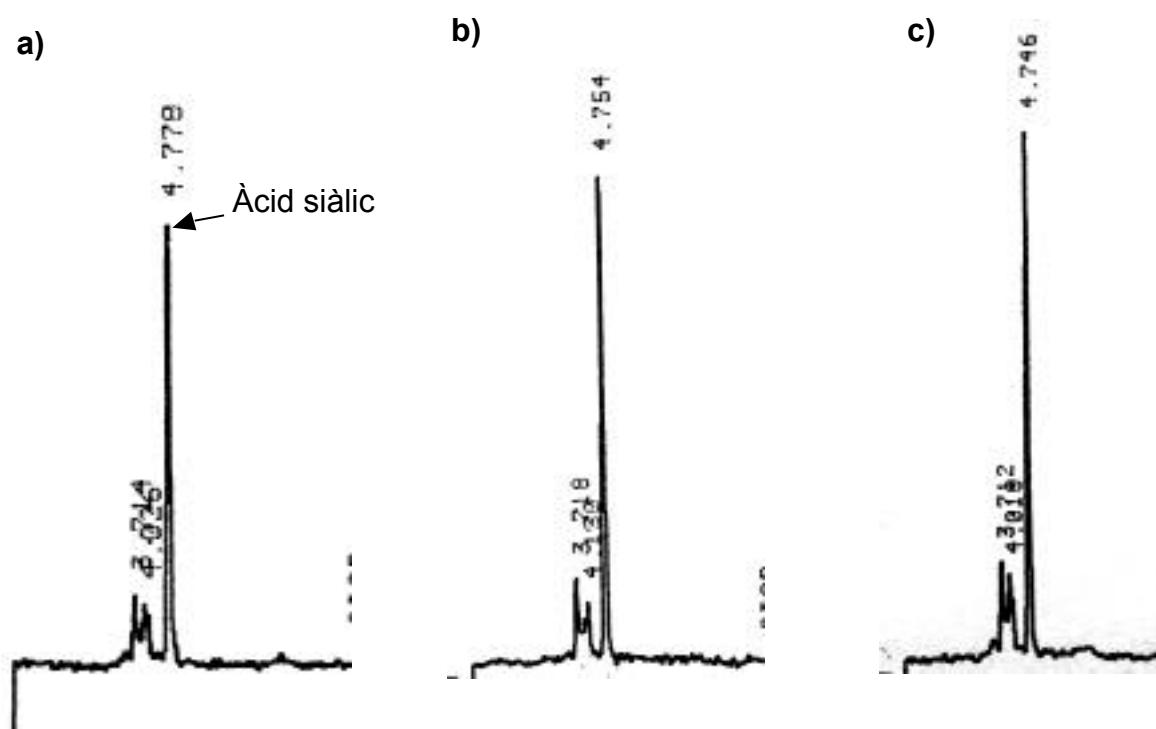


Figura 3. Exemple representatiu del tipus de cromatograma obtingut: a) estàndard (NANA), b) NL-LDL(+), c) NL-LDL(-).

2.2.2 CONTINGUT EN ANTIOXIDANTS

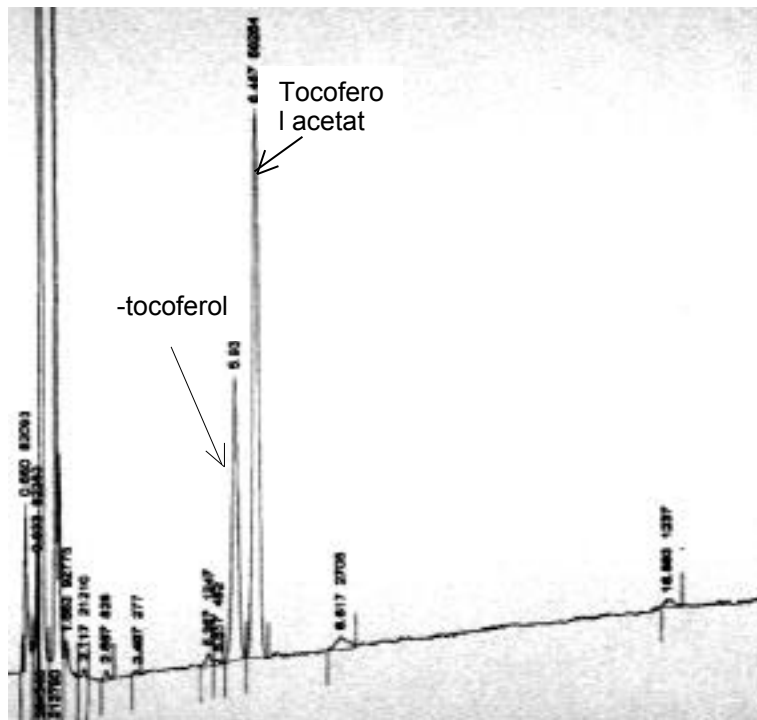
Es va valorar el contingut en α -tocoferol, β - i γ -carotè i licopè per mitjà d'un sistema HPLC (Beckman, model 126) utilitzant una columna de fase reversa ODS (columna Ultrasphere ODS 0.46x25 cm 5 μ m, System Gold, Beckman) i per detector diode array (Detector 168, Beckman). Es van seguir mètodes descrits (Elinder 1992 i Sánchez-Quesada 1997). Es va utilitzar tocoferol acetat com a estàndard intern, el qual es processa juntament amb les mostres. El sistema de detecció diode array permet detectar a diferents longituds d'ona simultàniament, les òptimes per a cada compost van ser a 290 nm per a α -tocoferol i tocoferol acetat, i a 450 nm per a β -carotè, γ -carotè i licopè.

Procediment:

- Es barregen 500 μ l de mostra (LDL a 0.5g/L) i 500 μ l de l'estàndard intern (tocoferol acetat en etanol a 10 μ g/L).
- Seguidament es realitza l'extracció lipídica afegint 1 ml d'heptà i agitant durant 1 minut. Després es centrifuga a 3000 rpm en fred durant 15 minuts, es separa la fase superior, a on es troben els antioxidants, i s'evapora amb nitrògen a 37°C. En aquest pas es poden congelar les mostres a -80°C fins al moment de la seva determinació.
- Es reconstitueix en 80 μ l d'etanol i es transfereix als vials de l'injector automàtic amb refrigeració acoblat al cromatògraf.
- La cromatografia es realitza a un flux de 0.4 ml/min i amb fase mòbil composta de acetonitril/H₂O/tetrahidrofurà (THF) en proporció de volums 81.3/5.7/13. La detecció del tocoferol i els carotens és mesurada de forma simultània a 290 i 450 nm, respectivament.

A la Figura 4 es mostren dos cromatogrames representatius d'una LDL nativa, on es detecta el tocoferol i els carotens.

a)



b)

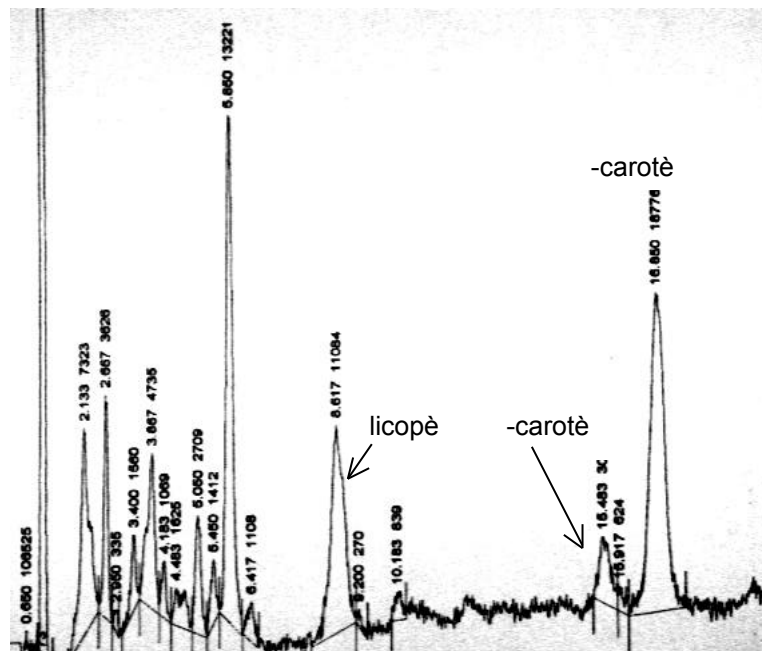


Figura 4. Cromatograma representatiu de la detecció d'antioxidants d'una LDL nativa. a) tocoferol (290 nm) i b) carotenoids (450 nm)

2.2.3 CONTINGUT EN ALDEHIDS

Es van valorar els aldehyds de l'LDL per HPLC seguint metodologia descrita (Bailey 1997). Per aquest mètode es va quantificar el contingut d'MDA (malonaldehid) de les mostres, el qual és un producte final de l'oxidació, mentres d'altres aldehyds com el 4-HHE (4-hidroxihexenal) i el 4-HNE (4-hidroxinonenal) només eren detectables en el cas de l'LDL oxidada "in vitro" que es va utilitzar com a control. Es va utilitzar un sistema HPLC (Hewlett Packard, sèrie 1050) per cromatografia en fase reversa en columna C18 (columna Hypersil ODS 0.46x20 cm 5 µm, Hewlett Packard) i mitjançant detecció fluorimètrica. L'estàndard extern que es va utilitzar era MDA obtingut a partir de la hidròlisi de 1,1,3,3-tetrametoxipropà amb HCl a 100° durant 20 minuts, seguidament es diluïa a una concentració de 4.74 µM d'MDA. Es van realitzar injeccions al cromatògraf de blanc de mostra i blanc d'estàndard per restar aquest valor basal de la mostra i l'estàndard, respectivament. El processament de les mostres i mètode cromatogràfic es descriuen tot seguit.

Procediment:

- Es derivatitza un volum de 100 µl de mostra (LDL a 0.2 g/L) amb 40 µl de 1,3-ciclohexanodiona (CHD) a 60° durant 1 hora. La CHD es prepara al 1% en solució aquosa amb 40% de sulfat amònic, ajustant el pH a 4.
- Es refreda la barreja i es porta a un volum final de 560 µl amb metanol per precipitar la proteïna i el reactiu en excés.
- A continuació es centrifuga a 600 g durant 10 minuts per tal d'eliminar els precipitats. Dels sobrenedants, que es poden conservar un màxim de 24 hores a -20°C, es punxen 20 µl a l'HPLC.
- El mètode cromatogràfic es realitza seguint un gradient binari. Hi han dues fases mòbils: fase A (5% THF/H₂O) i fase B (50% THF/H₂O), i el fluxe és de 0.8 ml/min. Les dues fases mòbils es combinen seguint el gradient següent: els primers 40 minuts es segueix un gradient lineal de 100% de fase A a 100% de fase B, en els següents 5 minuts retorna a 100% de fase A.
- La detecció té lloc a una d'excitació de 380 nm i a una d'emissió de 445 nm.

A continuació, la Figura 5 mostra uns cromatogrames representatius dels resultats obtinguts amb LDL nativa i LDL oxidada.

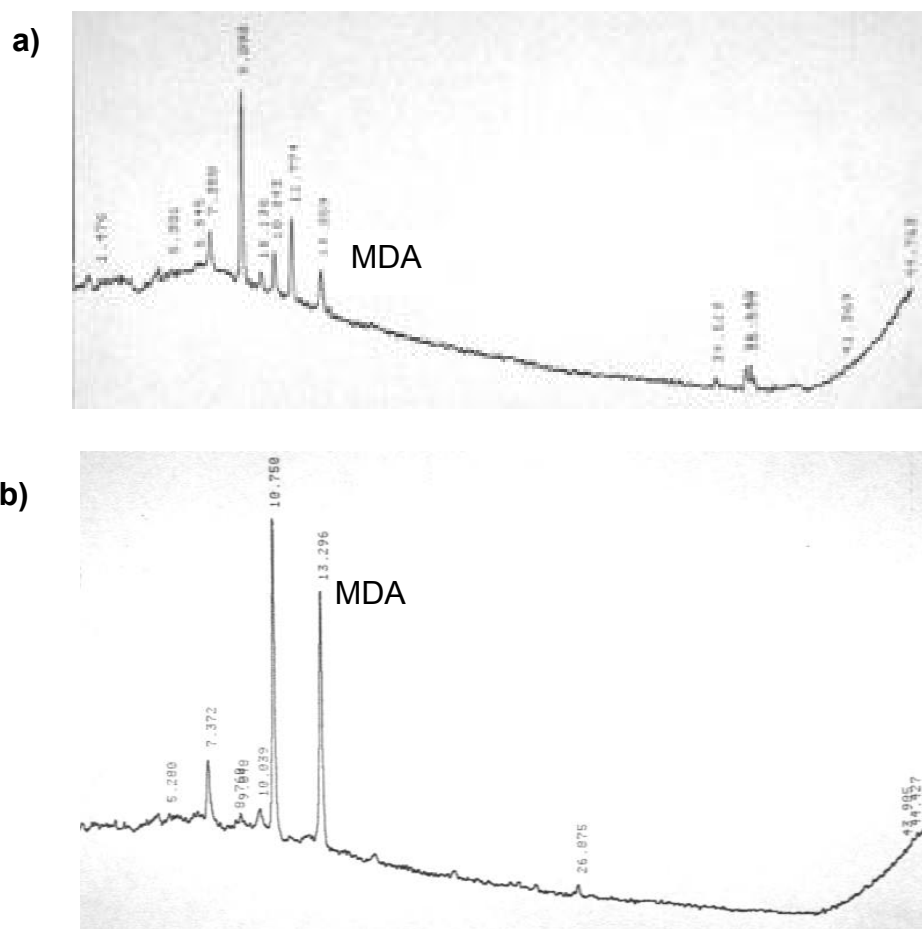


Figura 5. Cromatograma representatiu de la detecció d'MDA, sent a) LDL nativa i b) LDL oxidada.

2.2.4 CONTINGUT EN HIDRÒXIDS

Es van valorar els hidròxids per cromatografia de gasos i espectrometria de masses (CG-EM). L'estàndard intern està format per 75 µg d'BHT i 740 ng d'heneicosanoat metil éster, es va afegir a l'LDL (200-600 µg apoB dissolta en 1 ml de tampó A). El procediment que es va seguir a continuació és el que es descriu tot seguit:

Procediment:

- Es realitza l'extracció lipídica segons el mètode de Bligh and Dyer (Bligh 1959) Els extractes de cloroform s'assequen en N₂ i el residu es dissol en 250 µl de metanol.
- Es procedeix a hidrogenar els lípids per reduir els dobles enllaços i així evitar que la mostra s'oxidi més i es formin subproductes. Es van seguir mètodes prèviament descrits (Nikari 1995).
- Seguidament les mostres es saponifiquen en medi bàsic per separar els hidròxids dels fosfolípids. Després s'acidifica el medi i s'extrauen els àcids grassos lliures mitjançant extracció orgànica segons metodologia descrita (Antón 2002).
- Els extractes es dissolen en metanol i es derivatitzen amb metil ésters (ME)-trimetilsiliéters (TMS) per augmentar la volatilitat dels compostos (Antón 1998).
- Es duu a terme la cromatografia de gasos i l'espectrometria de masses (CG-EM) en el EI scan mode (70-600 u.m.a) segons metodologia descrita (Antón 1998). La detecció per EM es basa en impacte electrònic, pel qual es formen diferents fragments dels compostos que formen un espectre típic per cada compost concret. Per quantificar els derivats ME-TMS dels HODEs i HETEes, es trien ions específics per a cada compost (Antón 1998). Pel metil heneicosanoat l'io específic és a m/z 340.
- Es realitzen regressions lineals de l'estàndard en un rang de 1-200 ng per tal de quantificar.

2.3 SUSCEPTIBILITAT A L'OXIDACIÓ

Les LDL van ser dialitzades en tampó fosfat salí (PBS) i es van igualar a una concentració de 50 mg/L. A continuació es va induir l'oxidació "in vitro" a través de l'addició de 2.5 µM de CuSO₄ i a partir d'aquest punt es va monitoritzar la formació de diens conjugats (absorbància a 234 nm) durant 3 hores a 30°C en un espectrofotometre Biochrom 4060 (Pharmacia) que permet avaluar set mostres en una mateixa tanda.

Els resultats de la cinètica es van interpretar valorant la fase de latència, que es considera que és el temps que triga l'LDL abans d'oxidar-se i que és degut a la

presència dels antioxidants de l'LDL (Esterbauer 1989). Per tant, una fase de latència més curta indica una major susceptibilitat a oxidar-se per part de l'LDL. Es va calcular la fase de latència des del punt d'absorbància inicial de la cinètica fins a on talla amb el pendent màxim de la corba. D'altra banda, el pendent màxim ens va indicar la velocitat de l'oxidació. L'increment d'absorbància també aporta informació, ja que depèn del substracte oxidable, com ara el número d'àcids grassos poliinsaturats. Finalment, l'absorbància inicial representà el valor de diens abans d'induir l'oxidació, fet pel qual serà un reflexe dels lipoperòxids inicials.

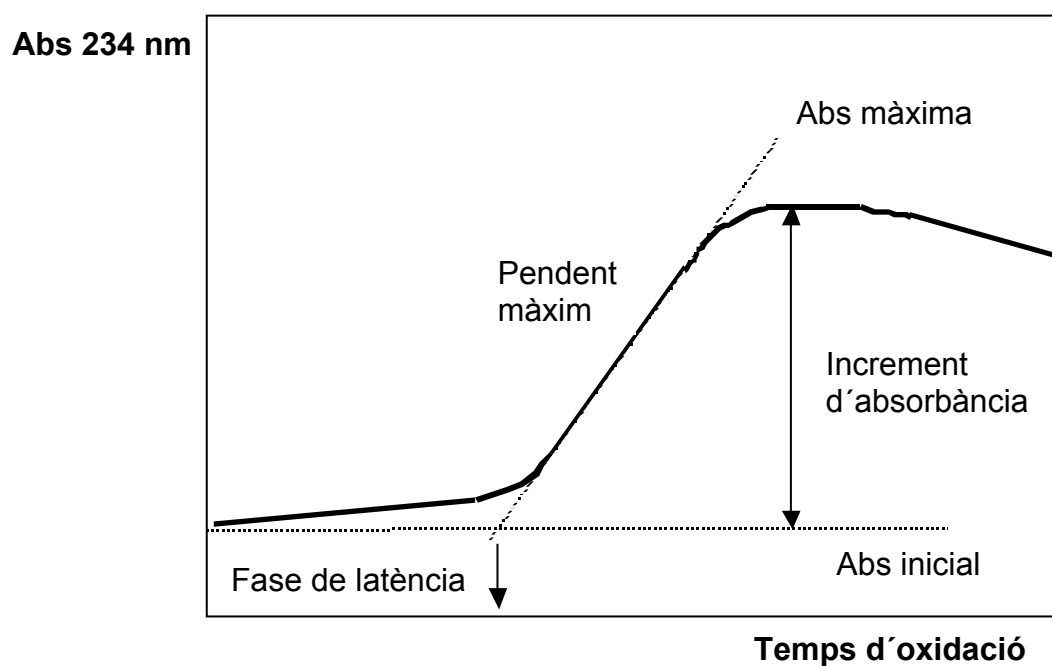


Figura 6. Cinètica de l'oxidació de l'LDL mitjançant la formació de diens conjugats.

2.4 SUSCEPTIBILITAT A L'AGREGACIÓ

L'agitació de l'LDL provoca canvis conformacionals en l'apoB de manera que s'afavoreix l'agregació de diferents partícules (Khoo 1988). Degut a això, es va avaluar la susceptibilitat a l'agregació mitjançant agitació intensa amb vòrtex de les mostres (1 mM de colesterol total) durant temps creixents. Després d'agitar es va mesurar l'absorbància a 680 nm. Del segon 0 al 30, les mesures d'absorbància es van realitzar cada 5 segons, i, a partir del minut 30, cada 10 segons, fins arribar a un temps final d'1 minut.

2.5 CARACTERITZACIÓ ELECTROFORÈTICA.

Es van realitzar diferents tipus d'electroforesi. D'una banda, per avaluar la càrrega elèctrica, es van fer electroforesis en gels comercials d'agarosa i d'agarosa-acrilamida. Per comprovar la integritat de l'apoB i la presència o no de proteïnes contaminants es van fer gels d'acrilamida amb dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE). També es van realitzar gels en gradient d'acrilamida del 2-16%, en condicions no desnaturants per valorar la grandària de la partícula d'LDL i comprovar el seu diàmetre.

2.5.1 ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA-ACRILAMIDA.

Es va fer servir uns gels comercials "Lipofilm" (Sebia, França) que consten de dues parts: la primera és d'agarosa amb 2% d'acrilamida i la segona d'agarosa amb un 3% d'acrilamida. Aquest canvi de percentatge disminueix el tamany del porus de la matriu agarosa/acrilamida, limitant el pas de les partícules VLDL. El procediment es basa en les instruccions del fabricant.

Procediment:

- Les mostres es tenyeixen prèviament amb Negre Sudan (volum:volum) durant 15 minuts en fosc. El Negre Sudan s'uneix específicament als lípids, d'aquesta manera les mostres es poden visualitzar al llarg de l'electroforesi.
- S'apliquen 6 µl de les mostres a les butxaques del gel.
- L'electroforesi es desenvolupa a 8 mA durant una hora.
- Després de córrer les mostres es fixa el gel en una solució aquosa amb un 5% d'àcid acètic i 0.5% de glicerol. Un cop fixat es passa per aigua destil.lada i s'asseca.

2.5.2 ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA.

Es van utilitzar gels comercials d'agarosa, "Midigel lipo" (Biomidi, França). En aquests gels les partícules migren en funció de la càrrega elèctrica. El procediment es segueix segons el fabricant.

Procediment:

- S'apliquen 4 µl de mostra al gel i es fan córrer les mostres a 130 V durant 2 hores.
- Un cop acabada l'electroforesi el gel es fixa durant 10 minuts, es fa un rentat de 5 minuts amb aigua destil.lada i s'asseca el gel sota una font directa de calor (assecador) durant 10 minuts.
- Es procedeix a la tinció durant 10 minuts i a continuació es realitzen dos banys de destinció. Finalment es passa aigua destil.lada al gel i s'asseca.

Solució fixadora

Aigua destil.lada....90 ml
Acètic glacial....30 ml
Etanol....180 ml

Solució de tinció

Negre Sudan concentrat....4 ml
Etanol....80 ml
NaCl a 20g/L....40 ml

Solució de destinció

Etanol....150 ml
NaCl 20g/L....150 ml

2.5.3 ELECTROFORESI EN GELS DE ACRILAMIDA AMB SDS

L'SDS (dodecilsulfat sòdic) és un detergent que serveix per desnaturalitzar les partícules i també per neutralitzar la seva càrrega, en conseqüència les mostres migren en l'electroforesi en funció del seu tamany. Amb aquest tipus d'electroforesi es va avaluar la integritat de l'apoproteïna B de l'LDL i la presència o absència de proteïnes contaminants. Es van utilitzar gels comercials SDS-PAGE (SDS en gradient de poliacrilamida) del 4-20% de la marca BioRad que inclou el gel i el tampó de mostra (BioRad, EUA), seguint el mètode que es descriu.

Procediment:

- Preelectroforesi. El gel es sotmet a una electroforesi prèvia en tampó Tris-glicina amb SDS durant 1 hora a 100 V.
- Les mostres s'incuben durant 10 minuts amb el tampó de mostra, ja preparat al kit electroforètic.
- S'apliquen 20 µl de la mostra al gel i un estàndard de pes molecular.
- El sistema electroforètic és Mini-Protean II (BioRad). Les condicions d'electroforesi són: 50 V durant 30 minuts, temps necessari per a l'entrada de la mostra, i després s'augmenta el voltatge a 100 V fins a la visualització del front electroforètic a la part inferior del gel.
- La tinció es realitza amb Blau Brillant de Coomassie segons un mètode comercial (PhastGel Blue, Pharmacia) i a continuació es procedeix a destenyir el gel.

Tampó de Tris-glicina

Tris 24 mM
Glicina 190 mM
SDS 0.1%

Solució de destinció

Metanol 50%
Àcid acètic 10 %
Glicerol 1 %

2.5.4 ELECTROFORESI EN GELS EN GRADIENT D'ACRILAMIDA

Per determinar la grandària de la partícula es van realitzar electroforesis en gels no desnaturalitzants en gradient d'acrilamida del 2-16% (GGE), adaptant el mètode de Nichols (Nichols 1986). Es va preparar una solució stock d'acrilamida amb 30% de T (total d'acrilamida + bisacrilamida) i un 5% de C (% de bisacrilamida de T). Aquesta solució d'acrilamida s'ha de filtrar i conservar a 4°C. A partir de l'stock d'acrilamida es van preparar les solucions amb les quals es crearà el gradient, del 2% d'acrilamida l'una i del 16% l'altra.

Reactiu	Solució stock 2%	Solució stock 16%
Solució stock d'acrilamida	1.65 ml	10.65 ml
Sacarosa 50%	250 µl	984 µl
Tampó borat (1)	fins 25 ml	fins 20 ml
TEMED (2)	16.5 µl	6.7 µl
APS (10%) (3)	100 µl	200 µl
Blau de bromofenol	200 µl	-

(1) Tampó borat: Tris-HCl 9 mM, EDTA 0.3 M, àcid bòric 8 mM (pH = 8.3).

(2) TEMED: tetrametiletilendiamida;

(3) APS: amoniopersulfat;

En preparar les solucions s'han d'ajustar els volums sense afegir el TEMED i l'APS que s'addicionen just abans de començar a formar-se el gradient, ja que són dues substàncies que promouen la polimerització. El suport electroforètic utilitzat va ser el Mini-Protean II multi-casting (BioRad). Les dues solucions es barregen de forma gradual per mitjà d'un sistema de dos bombes peristàltiques P-1 (Pharmacia), de manera que va penetrant per la part inferior del gel la solució progressivament més concentrada, omplint-se el gel de baix a dalt, de forma que a la part superior el gel és del 2% d'acrilamida i, en anar baixant, s'incrementa aquest percentatge fins al

16% a l'extrem inferior. A la Figura 7 s'esquematitza el procés de la formació del gradient al gel.

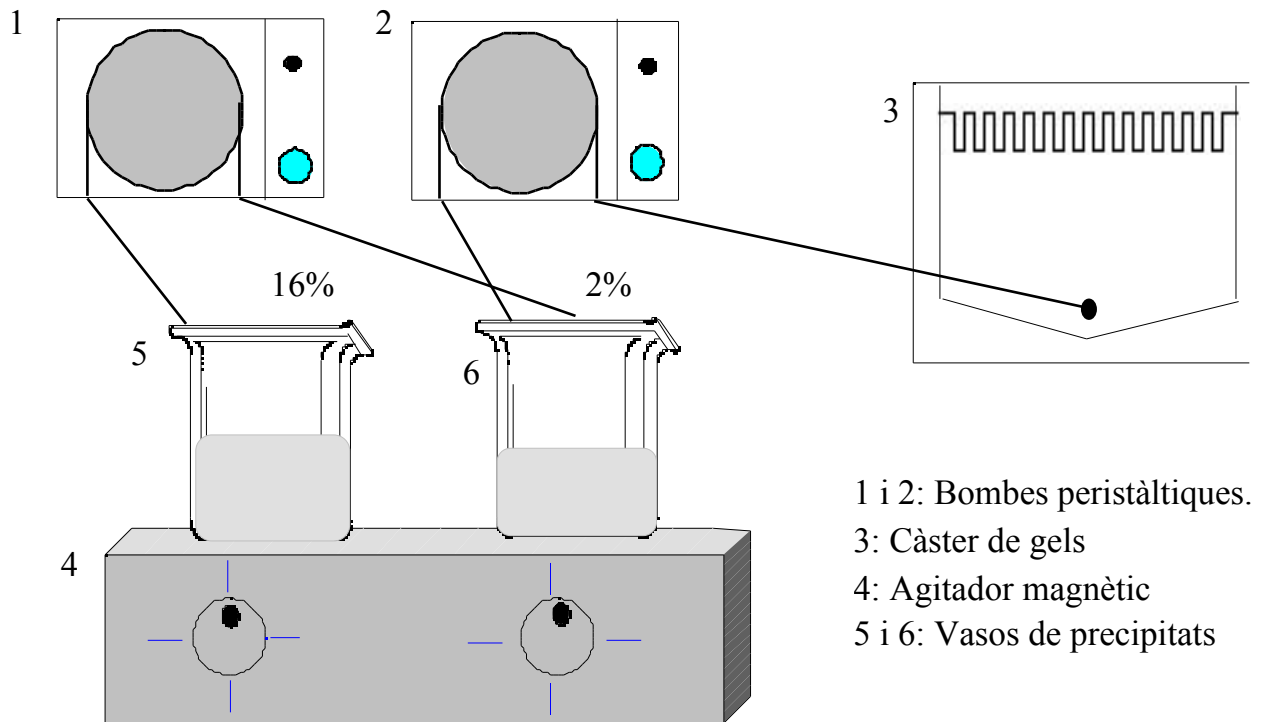


Figura 7. Procés de formació dels gels en gradient.

Després de polimeritzar el gel, al cap d'unes 6 hores, es guarda a 4°C per a conservar-lo fins al dia següent, en què es realitza l'electroforesi segons el següent protocol.

Procediment:

- Es realitza una preelectroforesi en tampó borat amb la finalitat d'equilibrar el gel i eliminar el Blau de bromfenol, durant 30 minuts a 120 V.
- Es preincuben 10 µl d'LDL, a una concentració de 0.5-1 g d'apoB /L, durant 15 minuts amb 10 µl de Negre Sudan (0.1% pes/volum en etilenglicol) i 5 µl de sacarosa (50% pes/volum).

- De la barreja anterior, s'apliquen 10 µl de cada mostra als pous electroforètics. El sistema electroforètic és Mini-Protean II (BioRad) i el tampó d'electroforesi és el tampó borat. Les condicions d'electroforesi són de 30 minuts a 20 V, 30 minuts a 70 V i 16 hores a 100 V, sempre a 4°C.
- Les bandes s'escanegen per densitometria en un sistema GelDoc (BioRad), es mesura el recorregut de les bandes (Rf), segons la distància des de l'origen fins al centre de la banda majoritària, i es determina el tamany de l'LDL utilitzant com a estàndard un pool de plasma que conté quatre bandes de diàmetre determinat prèviament per microscopia electrònica (22.9 ± 0.5 , 24.5 ± 0.2 , 26.2 ± 0.2 i 28.4 ± 0.4 nm). Aquest procediment desenvolupat al nostre laboratori ha estat una modificació d'un mètode prèviament descrit (Nichols 1986).

3- MODIFICACIÓ “IN VITRO” DE L'LDL

Es va procedir a realitzar una sèrie de diferents modificacions “in vitro” de l'LDL que tinguessin la característica comuna d'incrementar la càrrega negativa de la partícula. Aquestes formes modificades de l'LDL es van utilitzar com a control en alguns dels experiments, per comparar el seu comportament amb el de l'LDL(-).

3.1 MODIFICACIÓ PER OXIDACIÓ.

L' oxidació de l'LDL és un procés molt complex que es produeix en cascada, en el qual primer queda afectada la part lipídica de la partícula i finalment s'acaba afectant a la fracció proteica. Es produeix un increment en la càrrega negativa degut principalment a l'emascament de les lisines i arginines de l'apoB. La incubació de l'LDL amb metalls pesants, com el Fe o el Cu, desencadenen “in vitro” el procés oxidatiu (Steinbrecher 1987). En el nostre cas, es va utilitzar l'LDL oxidada “in vitro” com a control positiu en la producció de les quimioquines IL-8 i MCP-1 i com a control negatiu de desplaçament de la unió al rLDL.

Procediment :

- Es dialitza l'LDL en PBS i es dilueix a una concentració de 0.2 g/L d'apoB per tal d'evitar una excessiva formació d'agregats.
- Per a promoure l'oxidació s'afegeix una concentració de CuSO₄ de 5-10 µM. Si es vol obtenir una oxidació més forta es pot incrementar la concentració.
- Es deixa l'LDL oxidant-se a temperatura ambient durant unes 15 hores o més, segons el grau desitjat d'oxidació.
- L'LDL oxidada es pot concentrar per ultracentrifugació, considerant que la solució està a 1.006 kg/L i hem d'aïllar l'LDL oxidada a una densitat de 1.100 kg/L (l'LDL oxidada adquireix una major densitat que l'LDL nativa).
- Per aturar l'oxidació de l'LDL s'ha de dialitzar en tampó A amb 20 µM de BHT, ja que el BHT (hidroxitoluè butilat) és un captador de radicals lliures i a més l'EDTA contingut en el tampó A és un quelant de Cu⁺².

3.2 MODIFICACIÓ PER ACETILACIÓ

L'acetilació és una modificació que actua directament sobre les lisines de l'apoB, de manera que hi ha menor exposició de la seva càrrega positiva i, en conseqüència, augmenta l'electronegativitat. Per aquests motius, l'LDL acetilada presenta una notable pèrdua d'afinitat pel rLDL, i en canvi és captada a través del SR. Degut a aquestes característiques de l'LDL acetilada quant a la interacció amb els receptors cel·lulars, es va utilitzar com a control positiu en els estudis d'acumulació d'ésters de colesterol i com a control negatiu en els de desplaçament de la unió al rLDL.

El procés d'acetilació "in vitro" de l'LDL es va realitzar seguint el protocol de Basu et al (Basu 1976) mitjançant l'addició d'anhídrid acètic de la manera que es descriu a continuació.

Procediment:

- Es parteix d'LDL dialitzada en tampó A a una concentració superior a 1 g/L.
- Es posa l'LDL en relació volum/volum amb solució d'acetat sòdic saturat.
- S'afegeixen 2 µl d'anhidrid acètic i s'agita suaument a 4°C durant 15 minuts, repetint-se aquest procés 3 cops més
- Finalment es filtra i es dialitza en tampó A per eliminar la sal i l'anhidrid acètic.

3.3 MODIFICACIÓ PER INCUBACIÓ AMB ÀCIDS GRASSOS NO ESTERIFICATS (NEFA)

Es coneix que la incubació "in vitro" de l'LDL amb àcids grassos no esterificats (NEFA) comporta, a més d'un enriquiment de l'LDL en NEFA, un augment en la seva càrrega negativa. No obstant això, no està clar el comportament de l'LDL-NEFA en varis aspectes com la interacció amb els receptors cel.lulars. Per tant, es va voler avaluar aquesta partícula per comparar les seves propietats amb l'LDL(-).

Es van realitzar dos tipus d'experiment: incubació amb una barreja dels àcids grassos majoritaris en proporcions fisiològiques a plasma (Esterbauer 1991) i incubació amb els diferents àcids grassos de la barreja per separat. En les dues condicions el procediment experimental va ser el mateix.

a) Experiment amb barreja d'àcids grassos: es va incubar l'LDL amb 0, 0.25, 0.5 i 2 mM de la barreja d'àcids grassos.

Barreja d'àcids grassos (% en pes)

35% àcid palmític
20% àcid oleic
40% àcid linolèic
5% àcid araquidònic

b) Experiments d'incubació amb els diferents àcids grassos majoritaris per separat presents a l'LDL: palmític (saturat), oleic (monoinsaturat) i linolèic (dos dobles enllaços), més un blanc d'LDL sense àcid gras. Es va incubar l'LDL amb dues concentracions, 0.5 mM, en què s'assoleix una càrrega similar a la de l'LDL(-) i 2 mM, com a control alt, adquirint l'LDL una quantitat suprafisiològica de NEFA,

Procediment:

- Es procedeix a realitzar la incubació amb LDL dialitzada en tampó A a una concentració de 3 mM de colesterol, la concentració corresponent d'àcids grassos, 45 g/L d'LPDS (per realitzar l'experiment en presència de nivells fisiològics d'albúmina) i finalment es van portar totes les mostres al mateix volum amb tampó A. Les solucions de cada NEFA es realitzen en etanol. Per evitar un diferent contingut d'etanol a totes les concentracions es manté constant el seu percentatge (5% d'etanol respecte el volum final). Les condicions de la incubació són de 4 hores a 37°C.
- Posteriorment es concentren les mostres mitjançant ultracentrifugació, i un cop aïllada l'LDL es va dialitzar en tampó A per cromatografia de gel filtració, fent ús de columnes PD10 (Pharmacia). La diàlisi ens permet eliminar els àcids grassos no units a l'LDL.

Posteriorment es van analitzar les propietats fisico-químiques i d'interacció amb els receptors cel·lulars d'aquestes LDL-NEFA pels mètodes descrits detalladament als seus apartats corresponents. L'objectiu d'aquests estudis va ser el de comparar les característiques de l'LDL-NEFA amb les de l'LDL(-). Concretament, es va avaluar la composició, el percentatge d'LDL(-), la mobilitat electroforètica en gel d'agarosa, la susceptibilitat a l'oxidació i la interacció amb el rLDL i amb el SRA.

4 CULTIUS CEL.LULARS

4.1 TIPUS CEL.LULARS.

4.1.1 LÍNIES CEL.LULARS.

Es va treballar amb dues línies cel.lulars provinents de l'ATCC (American Type Culture Collection) :

- Macròfags P388D1 de ratolí, és una línia originàriament aïllada a partir d'un neoplasma limfoide (P388) induït en ratolins DBA/2. Aquesta línia té la capacitat de produir grans quantitats d'IL-1 en resposta a LPS o PMA. Presenten, a més del receptor "scavenger", receptors pel complement C3 i per immunoglobulina (Fc). S'adhereixen bé a superfícies plàstiques i també de vidre (Koren 1975).
- Fibroblasts CCD-27Sk, els quals són fibroblasts de pell humana procedents de l'àrea del pit humà i d'origen fetal. Van ser adquirits en el pas 5 de congelació. Aquest tipus cel.lular és l'utilitzat clàssicament per estudiar el rLDL.

4.1.2 CULTIUS PRIMARIS DE CÈL.LULES ENDOTELIALS.

L'altre model cel.lular amb què es va treballar van ser les cèl.lules aïllades a partir de la vena del cordó umbilical o HUVEC (cèl.lules endotelials de vena de cordó umbilical humà) mitjançant perfusió amb col.lagenasa seguint mètodes descrits (López 1993).

Procediment:

- Precondicionar prèviament flascons de 25 cm² amb gelatina durant 1 hora, cubrint la superfície amb uns 2.5 ml. La gelatina és necessària per a que les cèl.lules s'adhereixin a la superfície del flascó. La gelatina està preparada al 2% amb aigua, i, prèviament al seu ús, ha de ser autoclavada. Abans de posar el medi amb les cèl.lules al flascó, s'ha de decantar l'excés de gelatina.
- Recollida del cordó umbilical. S'ha de recollir el cordó en condicions d'esterilitat. Per a una bona preservació de l'endoteli, el cordó umbilical s'ha de processar el mateix dia del part o al dia següent conservat en nevera. Tota la manipulació del cordó ha de ser en esterilitat, (guants de cirurgia i material quirúrgic esterilitzat).
- Neteja de la vena del cordó umbilical. El cordó umbilical presenta dues arteries i una vena, la qual és més gruixuda i de la qual s'aïllen les cèl.lules endotelials. Mitjançant una xeringa de 10 ml es passa PBS per l'interior de la vena, per netejar-la bé de sang i coalls.
- Aïllament de les cèl.lules amb la col.lagenasa. La col.lagenasa s'utilitza per desenganxar les cèl.lules endotelials del cordó, la concentració de col.lagenasa dependrà de l'activitat de l'enzim, en general es prepara al 0.025% amb PBS. Per aplicar la col.lagenasa s'ha de pinçar el cordó per baix, introduir la solució de col.lagenasa per la vena i tornar a pinçar el cordó per dalt. S'incuba amb l'enzim durant 10 minuts a 37°C, a l'incubador de CO₂.
- Recollida de les cèl.lules endotelials. Després de la incubació amb la col.lagenasa s'allibera l'extrem inferior del cordó i es recull el contingut en un tub. A continuació es treu la pinça o clampa de l'extrem superior i es passa per aquest extrem el medi de cultiu 199 amb xeringa, recollint la suspensió cel.lular en un altre tub.
- Es centrifuguen els tubs a 1200 rpm durant uns 10 minuts i a continuació s'elimina el sobrenedant per decantació, mentres que el pellet, on es troben les cèl.lules, es resuspén en medi de cultiu 199 i s'aboca als flascons que havien estat condicionats amb la gelatina.
- Al cap de 2 hores les cèl.lules comencen a adherir-se a la superfície del flascó, i aleshores es pot realitzar un canvi de medis, afegint el medi complet 199 que es detallarà posteriorment.

4.2 CONDICIONS DE CREIXEMENT CEL·LULAR

Tant les dues línies cel·lulars adquirides al ATCC com les HUVEC es van cultivar mantenint-les a una temperatura de 37°C, en atmosfera de 5% de CO₂ i amb una humitat del 100%, en flascons estèrils de cultiu amb el medi adient. El canvi de medi de cultiu es realitzà cada dos dies, prèviament es realitza un parell de rentats amb PBS. El creixement i estat dels cultius es van seguir per microscopia òptica.

Cada tipus cel·lular requereix un medi de cultiu concret suplementat amb determinats components. Els macròfags van créixer en medi de cultiu RPMI 1640, els fibroblasts en medi DMEM i les HUVEC en medi 199 (Biowhittaker, EUA), suplementats com s'indica tot seguit. En les condicions concretes d'experiment es cultivaven en medi deficient amb la composició que s'indicarà a següents apartats.

Medi RPMI complet (macròfags)

Sèrum boví fetal (SBF) 10%
Glutamina 2 mM
Antibiòtic: 0.1 UI /L de penicil.lina i
100 mg/L d'estreptomicina
HEPES 10 mM
Piruvat sòdic 1 mM

Medi DMEM complet (fibroblasts)

Sèrum boví fetal (SBF) 10%
Glutamina 2 mM
Antibiòtic:0.1 UI/L de penicil.lina i
100 mg/L d'estreptomicina

Medi 199 complet (HUVEC)

Sèrum boví fetal (SBF) 20%
Glutamina 2 mM
Antibiòtic: 0.1 UI/L de penicil.lina
i 100 mg/L d'estreptomicina
HEPES 20 mM
ECGS (suplement de creixement) 30 mg/L
Heparina 100 mg/L

4.3 SUBCULTIUS

Per realitzar subcultius dels macròfags, en arribar a la confluència, es van separar del suport plàstic del flascó amb l'ajut d'un gratador ("cell scraper") de 25 cm i es va traspasar el contingut a diferents flascons amb medi, o bé es sembrà un número determinat de cèl.lules en plaques de pous. Aquesta línia cel.lular és immortal, per tant, el número de passos o subcultius que es pot realitzar és infinit.

Els fibroblasts per ser separats del suport del flascó han de ser sotmesos a una tripsinització. El procés de tripsinització consisteix en l'addició de tripsina per tal d'hidrolitzar la matriu extracel.lular, secretada pels fibroblasts, que els uneix al plàstic. En el cas de les HUVEC també és necessari el procés de tripsinització per separar les cèl.lules de la gelatina del flascó per tal de fer subcultius.

Procediment:

- S'elimina el medi del flascó i es renta amb PBS .
- S'afegeix la tripsina/EDTA 0.05/0.02% (2 ml per flascó de 75 cm²) i es deixa actuar 1 minut a 37°C.
- S'observa per microscopia òptica el bon funcionament del procés.
- Es recull el contingut del flascó i es procedeix a repartir en flascons o plaques.
- Al cap de 2 hores té lloc un canvi de medi per eliminar les cèl.lules no adherides i l'excés de tripsina.

Cada cop que es va realitzar una tripsinització es va considerar com a un pas més. Els fibroblasts presenten una bona viabilitat fins a un número de passos inferior a 20, per tant els experiments amb fibroblasts es van realitzar abans que arribessin al pas 20. En el cas de les HUVEC, després de fer créixer el cultiu primari en flascons de 25 cm² i arribar a la confluència, les cèl.lules es van tripsinitzar i es van traspasar a un flascó de 75 cm² (segon pas). Un cop arribada la confluència

cel.lular al segon pas, les cèl.lules es van tripsinitzar i es van fer créixer en plaques de 12 pouets, per posteriorment realitzar els experiments.

Per fer inòculs cel.lulars en plaques de pouets s'ha de fer prèviament un comptatge en càmara de Neubauer. El número de cèl.lules del quadrant es multiplica per un factor de 10^4 , donant el valor de les cèl.lules existents per ml.

4.4 DETERMINACIÓ DE LA VIABILITAT CEL.LULAR

Per avaluar el bon estat de les cèl.lules als experiments després d'incubar amb les LDL es va determinar la viabilitat cel.lular. En el cas de cultius de macròfags es va valorar la lactat deshidrogenasa (LDH) alliberada al medi, i per cultius de HUVEC es va realitzar una modificació del test del MTT (Cell Titer 96, Promega, EUA) i la tinció dels nuclis amb iodur de propidi.

4.4.1 DETERMINACIÓ D'LDH

Es va fer servir aquesta tècnica per valorar la viabilitat cel.lular dels macròfags després de ser incubat amb les LDL. Un major alliberament d'LDH al medi per part de les cèl.lules indica dany cel.lular i en conseqüència una mortalitat elevada. La mesura d'activitat enzimàtica LDH es va realitzar amb un mètode comercial (Boehringer Mannheim, Alemanya) que es basa en dues reaccions acoblades que tenen com a producte final, per la reducció de la sal de tetrazoli INT, la formació de formazan que absorbeix a 500 nm. El procediment es va seguir segons les instruccions del fabricant. Resumidament, es basa en incubar 20 μ l del sobrenedant dels pous de cèl.lules amb 80 μ l de medi base i amb 100 μ l d'una solució barreja, la

qual és una mescla de la solució 1 (catalitzador) i de la solució 2 (colorant). Aquesta barreja s'ha d'incubar durant 30 minuts a temperatura ambient i protegit de la llum. Posteriorment es procedeix a mesurar l'absorbància a 490 nm. Es va considerar com a control baix (valor mínim) el medi de cultiu, sense estar en contacte amb cèl.lules, i com a control alt (màxim alliberament de LDH i per tant 100% de mortalitat) el medi d'assaig després de llisar les cèl.lules amb tritó X-100. Per tant, el càlcul de la viabilitat cel.lular es realitzà a partir de la següent fórmula:

$$\% \text{ viabilitat cel.lular} = 1 - \frac{\text{LDH sobrenedant cel.lules} - \text{LDH medi cultiu}}{\text{LDH cèl.lules amb tritó}} \times 100$$

4.4.2 DETERMINACIÓ DE VIABILITAT A HUVEC

Per estimar la viabilitat en els cultius d'HUVEC es van incubar les cèl.lules amb les LDL electropositives, electronegatives, i LDL oxidada en plaques de 24 o 96 pous. La incubació va tenir lloc durant 24 i 48 hores amb les concentracions de 140 i 210 mg /L apoB, que són les concentracions més altes utilitzades als experiments i, per tant, s'assumeix que són les que produïrien major efecte citotòxic.

L'efecte citotòxic es va valorar amb el kit comercial Cell Titer 96 Aqueous One Solution Step (Promega) que és una modificació del test del MTT (dimetil-tiazol-difeniltetrazoli). Aquest mètode permet realitzar l'assaig en un sol pas (Price 1989) i es basa en la valoració de l'activitat mitocondrial, que es veu alterada en fases primerenques de citotoxicitat. Es va realitzar el test segons les instruccions del fabricant. El mètode s'inicia amb l'addició a cada pouet amb cèl.lules, cultivades amb 100 µl de medi de cultiu, de 20 µl de la solució de treball, que conté la sal de tetrazoli MTS i un acoblador d'electrons anomenat etosulfat fenacina. Posteriorment

s'incuba la placa 1 hora a 37°C i es mesura l'absorbància a 490 nm, a la qual es mesura la formació de formazan. A cada mesura se li ha de restar el blanc de medi sense cèl.lules, i els resultats s'expressen com a percentage sobre el control, que és l'activitat basal de les cèl.lules sense incubar amb LDL.

Paral·lelament, es va realitzar una tinció de nuclis cel·lulars amb iodur de propidi que s'incorpora al DNA en cèl.lules danyades a nivell de membrana. Es va calcular el percentatge de cèl.lules vives, seguint un mètode descrit (Rosa 1996), però adaptat per a HUVEC. Aquesta determinació es basa en afegir el iodur de propidi a 4 mg/L una hora abans del final de la incubació de les LDL amb les HUVEC. Es va determinar la fluorescència, expressada com a percentatge relatiu, amb un escàner de fluorescència Cytofluor 2350 (Milipore) amb les següents condicions: d'excitació a 530 nm amb 40 nm de pas de llum, d'emissió de 645 nm amb 50 nm de pas de llum. Com a control de toxicitat es va fer servir 7 - hidroxicolesterol a les concentracions 50 i 100 µM (Pettersen 1991).

5 ESTUDIS D'UNIÓ AL rLDL EN FIBROBLASTS.

5.1 FONAMENTS DELS DOS TIPUS D'ESTUDI

Aquests estudis es van realitzar amb fibroblasts d'origen humà, ja que és un tipus cel·lular que, en les condicions adients, pot expressar grans quantitats de rLDL. L'objectiu d'aquests experiments va ser la valoració de l'afinitat de les diferents fraccions d'LDL pel seu receptor. Dins d'aquests experiments es van fer dos tipus d'estudi: les cinètiques de saturació i els desplaçaments de la unió d'una concentració fixa d'LDL. En ambdós casos es va utilitzar el marcatge fluorescent amb el compost dioctadecilindocarbocianina perclorat (DiI) (Molecular Probes, Holanda).

5.1.1 CINÈTIQUES DE SATURACIÓ.

Per mitjà d'aquesta tècnica es pot calcular el valor de la constant de dissociació (K_D) del lligand pel seu receptor. Una constant de dissociació més alta indica una menor afinitat del lligand pel seu receptor. Al nostre cas es volia comprovar si existien diferències en l'afinitat al receptor entre LDL(+) i LDL(-), tant en individus NL com en HF.

L'LDL es va marcar fluorescentment amb el compost Dil (Dil-LDL). Posteriorment es van incubar les cèl.lules amb quantitat creixents del lligand marcat. D'aquesta manera es pot observar un increment del senyal fluorescent, fins que s'arriba a una concentració de lligand en què hi ha una saturació en la resposta, aquesta és la unió màxima del lligand marcat. Per eliminar la unió inespecífica de Dil-LDL es va posar per a cada concentració d'LDL marcada un excés de 10 vegades de l'LDL no marcada, LDL(+) o LDL(-). La fluorescència remanent és la inespecificitat que s'ha de restar de la fluorescència total. Per a cada concentració, la unió específica vindrà donada per la resta de la unió total i la unió inespecífica. A partir de la unió específica es va realitzar la linearització d'Scatchard, on a l'eix de les abcises s'expressa per a cada concentració la fracció unida (B =bound) i al de les ordenades el cocient entre la fracció unida i la lliure (B/F =bound/free). A partir d'aquesta representació d'Scatchard es pot calcular la K_D i la B_{max} (Scatchard 1949), segons les fórmules següents.

El valor de la K_D es determina segons el pendent de la recta.

$$K_D = -1 / \text{pendent}$$

El valor de B_{max} s'obté a partir del tall a l'eix d'ordenades (b) i la K_D anteriorment calculada.

$$B_{max} = b \times K_D$$

5.1.2 ESTUDIS DE DESPLAÇAMENT.

Aquests experiments es basen en l'addició d'una concentració fixa, al nostre cas de 25 mg/L d'apoB, d'LDL total marcada amb Dil i de concentracions creixents d'LDL electropositiva i electronegativa d'NL o HF no marcades. L'LDL(+) o forma nativa, en principi, hauria de desplaçar aproximadament el 50% de la unió a la concentració de 25 mg/L apoB. Si el comportament de l' LDL(-) fos del mateix tipus que el de la forma nativa, això indicaria que presenta igual afinitat pel rLDL, en canvi, si el desplaçament és menys eficaç, voldria dir que l'afinitat es troba minvada.

En aquest tipus d'estudi es pot calcular l'IC₅₀, que és la concentració de lligand fred que desplaça un 50% de la unió (Innerarity 1987), i a partir d'aquest valor es determina la K_i o K_D' (constant d'inhibició) que és una valoració indirecta de l'afinitat del lligand pel receptor. La K_i es pot calcular mitjançant l'equació de Cheng-Prusoff (Cheng 1973). Per dur a terme aquest càlcul cal utilitzar el valor de la K_D que es va obtenir amb les nostres condicions d'assaig en els estudis de saturació. La [L] representa la concentració de lligand marcat utilitzada a l'assaig (25 mg/L).

Equació de Cheng-Prusoff:

$$K_i = IC_{50} / 1 + [L]/K_D$$

Tipus d'estudi de desplaçament

Es van realitzar dos tipus d'experiments de desplaçament: els desplaçaments que anomenarem autòlegs, en què es marcava l'LDL total procedent d'un dels tipus d'individu (NL o HF) i es desplaçava amb LDL(+) i LDL(-) del mateix grup

d'individus, i els desplaçaments creuats, en els quals es desplaçava amb les fraccions procedents del tipus d'individu diferent al de l'LDL marcada. Aquestes condicions s'indiquen amb més detall a l'esquema següent:

Tipus de desplaçament	Lligand marcat	Desplaçador
Desplaçaments Autòlegs	DiI-NL-LDL	NL-LDL(+)
		NL-LDL(-)
	DiI-HF-LDL	HF-LDL(+)
		HF-LDL(-)
Desplaçaments Creuats	DiI-NL-LDL	HF-LDL(+)
		HF-LDL(-)
	DiI-HF-LDL	NL-LDL(+)
		NL-LDL(-)

5.2 PROCEDIMENTS PREVIS A L'EXPERIMENT

5.2.1 ACONDICIONAMENT DE LES CÈL.LULES

El model cel.lular amb què es va treballar, com ja s'ha esmentat, són fibroblasts d'origen humà. Prèviament a la realització dels estudis, es va portar a terme el següent procediment de tractament de les cèl.lules.

Procediment:

- Es fan inòculs de 50000 cèl.lules per ml (dia 1) en plaques de cultiu de 12 pous de 22 mm de diàmetre, es canvia el medi complet DMEM (dia 3) i es deixen créixer fins que arriben a la confluència (dia 5).

- Un cop les cèl.lules estan confluents, es passen a cultivar amb medi deficient en lipoproteïnes durant dos dies (fins al dia 7). La composició del medi deficient es diferencia del medi complet en que el sèrum boví fetal és substituït per LPDS, així les cèl.lules estan en un medi lliure de lípids i, en front a l'absència de colesterol extern necessari per a la formació de membranes, s'indueix la màxima expressió de rLDL.

Medi DMEM deficient

Medi DMEM base
LPDS 10%
Glutamina 2 mM
Antibiòtic: 0.1 U/L de penicil.lina i
100 mg/L estreptomicina

5.2.2 MARCATGE FLUORESCENT DE L'LDL

Per evitar l'ús d'isòtops radioactius com el ^{125}I , es va realitzar un marcatge de tipus fluorescent a les LDL amb el compost fluorescent Dil. Aquest compost és lipofílic i presenta una longitud d'ona d'excitació a 520 nm i d'emissió a 578 nm. El marcatge de l'LDL amb Dil es va efectuar segons el mètode d'Stephan i Yurachek (Stephan 1993).

Procediment:

- L'LDL ha d'estar dialitzada en tampó A prèviament a la incubació, la qual es realitza amb 300 mg de Dil, a partir de la solució stock a 30 g/L en DMSO, per g d'apoB. S'incuba en condicions d'agitació suau durant 18 hores a 37°C.
- Després del marcatge es concentra la mostra mitjançant ultracentrifugació a 36000 rpm a 4°C durant 5 hores. Posteriorment es filtra la mostra, amb filtre de 0.22 μm , per eliminar agregats.
- Es dialitza l'LDL marcada en tampó A en sac de diàlisi, canviant el tampó de diàlisi diferents cops per eliminar la fluorescència inespecífica.
- Un cop es té l'LDL marcada amb el Dil i dialitzada, es torna a filtrar la mostra.

Per comprovar que el marcatge amb Dil no va afectar la càrrega elèctrica de l'LDL, grandària o grau d'agregació, es va realitzar electroforesi en agarosa (Midigel) i agarosa-acrilamida (Lipofilm) de les partícules després del seu marcatge.

D'altra banda, l'eficiència de marcatge es va mesurar a partir de la fluorescència d'una recta patró d'LDL marcada amb Dil (dilucions amb isopropanol) i la fluorescència d'una recta amb diferents concentracions del marcador fluorescent Dil. Interpolant es pot calcular per a cada experiment els mg de Dil incorporats per g de Dil-LDL. Aquest paràmetre és equivalent a l'activitat específica en els marcatges isotòpics.

5.3 EXPERIMENTS D'UNIÓ AL RECEPTOR

- a) Els experiments de saturació es van fer amb 5-8 concentracions de Dil-LDL (0-200 mg/L). Per a cada concentració es va fer un duplicat de la unió total i un duplicat de la unió inespecífica, en què s'addicionà, a més de l'LDL marcada, un excés de 10 vegades d'LDL no marcada .

- b) En els estudis de desplaçament de la unió es van realitzar triplicats per a cada concentració de l'LDL sense marcar. La concentració d'LDL no marcada va ser entre 0-200 mg/L, i la concentració de Dil-LDL addicionada a tots els punts fou de 25 mg/L. Aquestes condicions d'assaig van ser les mateixes tant si eren experiments de desplaçaments autòlegs com creuats. Es van utilitzar com a control negatiu, de poca afinitat al rLDL, LDL acetilada i LDL oxidada que s'havien obtingut segons els procediments abans descrits.

Abans d'incubar amb les cèl.lules, totes les mostres es van dialitzar per gel filtració (en columnes PD10) amb PBS, incloent la Dil-LDL que, a més, es va tornar a

filtrar. La finalitat de la diàlisi amb PBS és la d'eliminar el EDTA que pot quelar el calci requerit per a la unió amb el rLDL.

Les plaques de cèl.lules es van preconditionar 30 minuts a 4°C abans d'incubar amb les mostres. A cada pou de cèl.lules es va posar el volum adient d'LDL no marcada i/o marcada amb la finalitat d'assolir la concentració que ens interessava. A més s'afegia un volum fix, 800 µl, del medi d'unió (HEPES) i s'ajustava a un volum final de 1 ml amb PBS. El medi d'unió conté LPDS en lloc de SBF per evitar un aport addicional de lipoproteïnes. D'altra banda, l'HEPES té la funció de mantenir constant el pH i d'aquesta manera no s'afecta la unió entre receptor i LDL.

<p><u>Medi d'unió</u> Medi DMEM LPDS 10% HEPES 10 mM pH 7.4.</p>

Després d'addicionar l'LDL, el medi d'unió i el PBS, el procediment a seguir és el que s'indica tot seguit.

Procediment:

- S'incuben les cèl.lules amb el lligand a 4°C durant 3 hores en agitació suau.
- Posteriorment a la incubació es realitzen uns rentats per eliminar l'excés de lligand :
 - rentat ràpid amb 2 ml/pou de PBS-albúmina (2 g/l)
 - rentat amb 2 ml de PBS-albúmina de 10 minuts en agitació
 - dos rentats ràpids amb 2 ml PBS.

- Un cop fets els rentats, s'obtenen els lípids de l'LDL (incloent el Dil) que s'han unit al receptor, mitjançant l'extracció amb isopropanol (1 ml d'isopropanol per pou) durant 15 minuts en agitació.
- Es recull l'isopropanol i es centrifuga el contingut a 3000 rpm durant 15 minuts amb la finalitat d'eliminar agregats. De l'extracte de cada pou es posen 200 µl en una placa microtiter de 96 pouets i es mesura la fluorescència (fluorímetre LS50B de Perkin Elmer, EUA) amb una longitud d'ona d'excitació de 520 nm i d'emissió de 578 nm.

A partir de la recta patró d'eficiència del marcatge es calcula la quantitat d'LDL unida. És important, però, corregir aquest valor pel factor de la concentració de proteïna cel.lular, ja que una major senyal fluorescent pot ser deguda no a una afinitat més gran de la partícula, sinó a un major número de cèl.lules. La mesura de la concentració de proteïna es va realitzar pel mètode de Bradford (Bradford 1976).

Procediment:

- S'afegeix 1 ml de NaOH 1 N per pou i es deixa en agitació 24 hores .
- Es mesura la proteïna pel mètode de Bradford fent ús del reactiu comercial de Bio-Rad, posant: 20 µl de mostra, 180 µl d'aigua destil.lada i 800 µl del colorant comercial diluït 1/4. Després de 5 minuts, es mesura l'absorbància a 595 nm i interpol.lant a partir d'una recta patró de concentració coneguda de proteïna es calcula la concentració de les mostres.

6 ESTUDIS D'ACUMULACIÓ DE COLESTEROL ESTERIFICAT (CE) EN MACRÒFAGS

En aquests experiments de determinació de l'acumulació intracel.lular d'ésters de colesterol s'utilitzaren els macròfags P388D₁, ja que són cèl.lules amb activitat "scavenger" (Via 1985). Concretament, expressen el receptor scavenger SRAII, i per tant són capaces de transformar-se en cèl.lules espumoses quan són incubades amb LDL modificades. El que es pretén investigar és si l'LDL(-) està prou

modificada com per tenir la capacitat de ser captada a través del SR i estimular l'acumulació d'ésters de colesterol. En el nostre cas es va prendre com a model de lipoproteïna modificada l'LDL acetilada, ja que indueix de forma efectiva l'acumulació d'ésters de colesterol a macròfags (Goldstein 1979).

6.1 INCUBACIÓ DE LES FRACCIONS D'LDL AMB ELS MACRÒFAGS

Es van incubar les diferents LDL amb els macròfags, en què s'ha induït prèviament l'expressió de SR, seguint el protocol que es detalla a continuació.

Procediment:

- Es fan inòculs de 50000 cèl.lules per pou a plaques de cultiu de 6 pous de 35 mm de diàmetre.
- Es deixen créixer els cultius durant 5 dies, amb medi RPMI complet (2 ml per pou), realitzant un canvi de medi a les 48 hores després del sembrat inicial.
- Es cultiven les plaques 2 dies amb medi suplementat amb 50 µg/L de forbol 12-miristat 13-acetat (PMA) (Pitas 1992). El PMA és un éster de forbol que potencia la diferenciació dels macròfags i en alguns tipus cel.lular indueix un increment en la producció d'SR (Via 1989).
- Després de 48 hores de l'addició del PMA es fan rentats de les plaques amb PBS i s'hi afegeix medi RPMI deficient, que és el medi RPMI complet en què es substitueix el SBF per LPDS en la mateixa proporció. Es fa la incubació de les LDL (25 mg/L apoB) dialitzades en tampó A i afegint-les, un cop filtrades en esterilitat, al medi deficient on hi han les cèl.lules. L'ús de medi deficient evita un aport extern de lipoproteïnes que no sigui l'LDL que s'hi afegeix.
- La incubació va tenir lloc durant 72 hores, realitzant després d'aquest temps l'extracció lipídica.

Medi RPMI deficient

Medi base RPMI
LPDS 10%
Glutamina 2 mM
Antibiòtic: 0.1 UI/L de penicil.lina i
100 mg/L d'estreptomicina

6.2 EXTRACCIÓ LIPÍDICA INTRACEL·LULAR

L'acumulació d'ésters de colesterol es va valorar quantitativament mitjançant cromatografia en capa fina, a partir de l'extracte lipídic obtingut de les cèl·lules que havien estat incubades en les condicions descrites a l'apartat anterior. El procediment d'extracció lipídica es descriu a continuació.

Procediment:

- Es desenganxen les cèl·lules del suport plàstic amb un "scraper" de 25 cm i es guarden 100 µl de la suspensió cel·lular per mesurar la proteïna. Aquesta alíquota que s'agafa per a la mesura de proteïna s'ha de centrifugar a 1500 rpm durant 5 minuts. A continuació s'elimina el sobrenedant (medi) i s'afegeix a les cèl·lules del pellet 100 µl de NaOH 1N deixant 24 hores en agitació per fer posteriorment la determinació de proteïna pel mètode de Bradford (apartat 5.3).
- La suspensió de cèl·lules, després de treure l'alíquota per a la mesura de proteïna, es centrifuga a 2000 rpm durant 10 minuts.
- Després de la centrifugació es descarta el sobrenedant (medi) i a partir de les cèl·lules es fa l'extracció lipídica afegint als tubs 1 ml de la barreja orgànica hexà-isopropanol en proporció 3:2 v/v i es deixa durant 30 minuts en agitació per afavorir l'extracció dels lípids (Goldstein 1983b).
- Seguidament a l'extracció es realitza una centrifugació de 10 minuts a 2000 rpm per tal de descartar el pellet, on es trobaran les restes cel·lulars. Del sobrenedant s'agafen 800 µl que es traspassen a tubs cònics i s'evaporen amb nitrògen, per evitar l'oxidació dels lípids.
- Posteriorment a l'evaporació de la fase orgànica, el tub amb l'extracte lipídic es pot conservar congelat a -20°C.

6.3 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (CCF)

Mitjançant la cromatografia en capa fina es poden separar els diferents lípids provinents de l'extracte lipídic cel·lular. D'aquesta manera es pot determinar el contingut cel·lular en fosfolípid, triglicèrid, colesterol lliure i ésterificat i àcids grassos. En el nostre cas ens va interessar quantificar el colesterol ésterificat.

Procediment:

- L'extracte lipídic obtingut a partir de les cèl·lules es resuspèn amb 40 µl de cloroform i d'aquests s'apliquen 15 µl a la cromatografia. Les plaques cromatogràfiques són de sílica gel de 5x20 cm (Whatman) i cadascuna té lloc per a aplicar quatre mostres. En una de les plaques s'apliquen 5 µl d'un patró amb quatre concentracions conegudes de colesterol lliure, triglicèrid i ésters de colesterol (1, 2.5, 5 i 12.5 g/L), d'aquesta manera es pot observar on migren els diferents lípids i quantificar els de les mostres a partir de la recta patró.
- Les plaques s'introdueixen en les cubetes cromatogràfiques amb una solució orgànica formada per heptà:dietilèter:àcid acètic glacial en proporció de volums 74:21:4.
- Quan la barreja orgànica apolar ascendeix per capil·laritat fins a un primer front a 10 cm del punt d'aplicació, es canvia la solució de la cubeta per 80 ml d'heptà. Les plaques s'assequen i s'introdueixen en la solució d'heptà fins que el solvent arriba a un segon front que està a 14 cm del punt d'aplicació.
- Es tornen a assecar les plaques i es procedeix a la tinció.
- La solució colorant s'ha de preparar fresca, dissolent 10 gr d'àcid fosfomolíbdic en 200 ml d'etanol i posteriorment s'addicionen 10 ml d'àcid sulfúric concentrat. Un cop les plaques estan seques es submergeixen en el colorant durant 1 minut i després s'introdueixen a un forn a 100°C durant 7 minuts. Transcorregut aquest temps les bandes han de quedar tenyides de blau sobre un fons groguenc.
- Un cop obtinguda la CCF es quantifiquen les bandes per densitometria fent servir un escàner model ScanJet 4C (Hewlett Packard) amb el software PC Image v 2.2 for Windows (Foster Findlay).

7. ESTUDIS DE L'EFECTE DE L'LDL(-) SOBRE LES CÈL·LULES ENDOTELIALS

Es va estudiar l'efecte de les fraccions electronegatives i electropositives, així com de l'LDL oxidada, sobre la funció endotelial, avaluant en cèl·lules HUVEC la inducció de citotoxicitat (descrita a l'apartat 4.4.2), la producció de les quimioquines IL-8 i MCP-1, de l'agent antifibrinolític PAI-1 i de la molécula d'adhesió VCAM.

7.1 INDUCCIÓ DE L'ALLIBERAMENT D'IL-8, MCP-1 I PAI-1

En un primer bloc d'experiments, la funció endotelial es va determinar amb fraccions provinents d'NL i es van valorar les condicions d'assaig més adients per estudiar l'efecte sobre la inducció de MCP-1, IL-8 i PAI-1. En un segon bloc, es va avaluar l'efecte de les fraccions d'individus HF sobre la producció de les esmentades quimioquines, comparant també amb NL, i a més es va estudiar l'expressió de VCAM.

7.1.1 INCUBACIÓ DE LES FRACCIONS D'LDL AMB HUVEC.

L'objectiu va ser incubar les HUVEC amb les diferents LDL, LDL(+) i LDL(-) d'NL i HF, i LDL oxidada, per avaluar el seu efecte sobre la producció d'IL-8, MCP-1 i PAI-1.

Procediment:

- Es realitzaven inòculs de 100000 cèl·lules (en pas 1-2), les quals es cultiven en plaques de 12 pous abans de l'experiment i es deixen créixer fins a la confluència (48 hores).
- Abans de realitzar l'incubació amb les LDL, en el primer bloc d'experiments es cultiven les cèl·lules amb el medi de manteniment.

- S'incuben les cèl.lules amb les diferents LDL, les quals van ser prèviament dialitzades amb medi 199 base, filtrades per 0.22µm i afegides a les cèl.lules en esterilitat.

Medi 199 manteniment

Medi base 199
Sèrum boví fetal (SBF) 4%
Glutamina 2 mM
Antibiòtic: 0.1 UI/L de penicil.lina
i 100 mg/L d'estreptomicina

Existeixen algunes diferències metodològiques que cal remarcar per posteriorment justificar els resultats entre el primer i el segon bloc d'experiments. En el cas dels estudis realitzats sols amb NL, primer bloc, 24 hores abans de la incubació amb les LDL es van condicionar les cèl.lules amb el medi de manteniment prèviament mencionat. Després la incubació va tenir lloc en el medi de manteniment amb concentracions 0-210 mg/L apoB, durant 16-18 hores a 37°C. Tanmateix, en la segona tanda d'experiments, no es van precondicionar les cèl.lules amb el medi de manteniment i la incubació va ser en medi amb un 1% SBF amb una concentració fixa d'LDL (100 mg/L) de les fraccions d'HF i NL i durant un temps més llarg, 24 hores. En ambdós casos, a més de les mostres, es va posar un blanc, de cèl.lules sense LDL, i, com a control positiu, TNF- α , primera part, i IL-1, segona part dels experiments, a una concentració de 20µg/L. El TNF- α i la IL-1 es poden utilitzar indistintament, ja que són coneguts activadors de cèl.lules endotelials, induint la producció d'IL-8, MCP-1 i PAI en HUVEC (Mantovani 1992).

7.1.2 DETERMINACIÓ D'IL-8, MCP-1 I PAI-1

Un cop finalitzada la incubació de les HUVEC amb les diferents fraccions d'LDL, es va realitzar el següent procediment.

Procediment:

- Al finalitzar la incubació, es van recollir els sobrenedants de cada pou de la placa de cultiu. D'altra banda, un cop obtinguts els sobrenedants, es van comptar les cèl.lules de cada pou a la càmera de Neubauer, prèvia tripsinització.
- Els sobrenedants es van centrifugar, amb l'objectiu d'eliminar els restes cel.lulars, es van aliquotar i emmagatzemar a -40°C fins al moment de valorar. Per les mesures de PAI-1, es va recollir una alíquota específicament en un tub que contenia Tween-20 (0.01% pes/volum).
- La mesura de la quantitat d'IL-8 i MCP-1 alliberada al medi per les HUVEC va ser avaluada a través de kits ELISA (Endogen, EUA) per al primer bloc d'experiments. En el segon es va utilitzar el mateix kit per IL-8 i un de diferent per a la determinació d'MCP-1 (Opt-EIA set, Pharmigen, EUA). Les mostres es van diluir 1/20 amb medi 199 base, utilitzant per l'assaig un volum final de 50 μl de mostra i es van seguir les instruccions del fabricant. El mètode es basa en la unió de la quimoquina (MCP-1 o bé IL-8) a un primer anticòs monoclonal específic unit a la superfície del pouet, i a un segon anticòs policlonal específic conjugat amb biotina. Després de realitzar rentats, s'incuba amb l'enzim peroxidasa unit a estreptovidina i finalment s'addiciona el substrat que induirà la formació de color detectable a 450 nm. Interpol.lant en una recta patró es van calcular els valors d'MCP-1 i IL-8 que es van expressar en $\text{ng}/10^5$ cèl.lules
- Els nivells de PAI-1 es van mesurar també per ELISA (TintELIZE PAI-1, Biopool, EUA) i Es van diluir els sobrenedants 1/20 amb medi i es va addicionar finalment al kit un volum de 20 μl . El fonament del mètode és la unió del PAI-1 de la mostra amb l'anticòs monoclonal que recobreix el pouet i amb un segon anticòs conjugat amb peroxidasa. Es realitzen rentats, s'incuba amb el substrat (H_2O_2) i es detecta a 490 nm. Per mitjà d'una recta patró es van calcular els resultats de PAI-1 que es van expressar en $\mu\text{g}/10^5$ cèl.lules.

7.1.3 EVALUACIÓ DEL MECANISME DE PRODUCCIÓ DE QUIMIOQUINES

A la primera tanda d'experiments, la realitzada amb les fraccions d'NL, es van estudiar els mecanismes de producció d'IL-8 i MCP-1 i d'altra banda, si la inducció implica síntesi de novo d'RNA. Amb aquest objectiu es van utilitzar NAC (N-acetilcisteïna), BHT (hidroxitoluè butilat) i actinomicina D (Sigma), i BN-50730 (donat per Dr Braquet, de l'Institut de Recerca Henri Beaufour, França). Aquests compostos tenen l'acció que es comenta:

- BHT, la seva acció és la de captador de radicals lliures.
- NAC, també presenta efecte de captador de radicals lliures però a menor nivell que el BHT. A més, és precursor del glutatió i com a conseqüència augmenta el potencial antioxidant de les cèl.lules generant glutatió reduït (GSH).
- BN-50730, és un antagonista del receptor del PAF. El PAF (factor activador plaquetari) és un fosfolípid fragmentat que presenta característiques inflamatòries
- Actinomicina D, la qual és un inhibidor de la transcripció.

Segons el tipus d'inhibidor testat la incubació amb les HUVEC es va realitzar de diferent manera. Es va estudiar la inhibició sobre l'efecte de 140 mg /L apoB, excepte en el cas de l'actinomicina D en què la concentració d'LDL va ser de 70 mg /L apoB.

Procediment:

- Pel tractament amb NAC les HUVEC es van preincubar durant 2 hores amb 10 mM de NAC, abans d'addicionar les LDL a les cèl.lules.
- El tractament amb el BHT va ser d'una preincubació amb les LDL abans d'incubar aquestes amb les HUVEC. La preincubació va ser de 2 hores a una concentració de BHT de 40 µM. També es va usar el BHT afegint-lo a les HUVEC simultàniament amb les LDL
- En el cas del BN-50730 es va incubar amb les cèl.lules un temps de 15 minuts amb diferents concentracions: 1, 2.5, 5 i 10 µM. Després d'aquesta preincubació es van addicionar les LDL (durant 24 hores).
- Actinomicina D. Per discernir si augmenta la producció de quimioquines en el medi de cultiu per síntesi d'RNA de novo (transcripció), les HUVEC es van incubar a la vegada amb l'LDL i 1 mg/L d'actinomicina D.

D'altra banda, es va avaluar que l'efecte inductor de les mostres no fos degut a contaminació amb lipopolisacàrids (LPS). Amb aquest objectiu es va determinar, per una banda, si les mostres d'LDL estaven contaminades amb LPS i, d'altra, si un inhibidor dels LPS, la polimixina B, inhibia l'efecte inductor de quimioquines. Es va descartar que les mostres estiguessin contaminades mitjançant un kit comercial, el test cromogènic-quantitatiu LAL (Limulus amoebocyte lysate) (QCL-1000, Roche). Aquest mètode es basa en que l'endotoxina activa un proenzim que es troba al llistat d'amebòcits, de manera que l'enzim catalitza l'alliberament de p-nitroanilina a partir del substracte cromogènic. Respecte a l'ús de polimixina, es feien pous en paral·lel incubant amb les LDL (140 mg/L) i amb o sense 50 mg/L de polimixina B, aquesta concentració inhibeix entre 90-100% l'activitat biològica de 1 mg/L d'endotoxina, de manera específica, sense afectar a l'activitat biològica d'altres molècules inductores com la IL-1 o el TNF.

7.2 PRODUCCIÓ DE LA INDUCCIÓ DE VCAM

Es van cultivar les HUVEC en plaques de 6 pous i un cop en estat de confluència es van incubar amb les fraccions d'LDL, prèviament filtrades i dialitzades en el medi 199 base, sense suplementar. Les concentracions emprades d'LDL van ser de 70, 140 i 210 mg apoB/L, i la incubació va tenir lloc durant 24 hores. Posteriorment, per a l'avaluació de VCAM es va realitzar un Western blot (WB) seguint el següent procediment.

Procediment:

- Rentat dels pous de cèl·lules amb PBS. Posteriorment, es solubilitzen les cèl·lules en tampó salí Tris (TBS) contenint 0.1% de tritó X-100 i inhibidors de les proteases.

- Es mesura la proteïna pel mètode de Bradford i s'aliquoten 20 µg per realitzar l'electroforesi i posterior transferència.
- Es realitza l'electroforesi en gels SDS-PAGE al 7.5% d'acrilamida durant 30 minuts a 150 V (cubeta electroforètica MiniProtean II, BioRad).
- Es transfereix la proteïna durant 45 minuts a 25 V a una membrana de difluorur de polivinilidè (Immobilon P, Millipore, EUA) mitjançant un aparell de transferència electroforètica semiseca (Semi Dry Transfer Cell, BioRad).
- Es bloqueja la membrana amb llet en pols desnatada diluïda al 10% en TBS durant tota la nit.
- Incubació de la membrana amb el primer anticòs (antiVCAM de cabra, sc-1504, Santa Cruz Biotechnology) diluït 1:2000, durant 1.5 hores.
- Realització de 4 rentats amb TBS contenint Tween 20 al 0.1%. Seguidament, s'incuba amb el segon anticòs marcat amb peroxidasa (anti IgG de cabra, sc-2020, Santa Cruz Biotechnology) diluït 1:2000, durant 1.5 hores.
- Realització de 4 rentats més. Finalment, es revela la membrana amb un substrat quimioluminiscent (reactiu ECL, Amersham Pharmacia).

TBS

Tris-HCl 10 mM

NaCl 150 mM

pH 7.4

8- MÈTODES ESTADÍSTICS

Els resultats s'expressen com a mitjana±desviació estàndard (SD). Es va utilitzar el programa estadístic Sigma Stat 2.0 o bé l'SPSS 6.0 per a windows. Les diferències entre variables aparellades es van avaluar pel test de Wilcoxon, i per les no aparellades es va emprar el test de U-Mann Whitney. Es va considerar, en general, significatiu una $p < 0.05$, quan no és així s'indica el valor corresponent de p .