

MEDICINA SCIENZA E SOCIETÀ

LDL ELETTRONEGATIVE: INTERVISTA AL DOTT. GABRIELE BITTOLO BON*

LDL electronegatives: interview with dr. Gabriele Bittolo Bon*

**Già primario di Medicina Interna negli Ospedali di Venezia e Mestre;
Già direttore del laboratorio di Fisiopatologia delle Lipoproteine del Centro per lo Studio
dell'Aterosclerosi di Venezia*

La scuola veneziana del prof. Piero Avogaro, di cui sei stato il massimo esponente, alla fine degli anni 80 del secolo scorso ha iniziato ad occuparsi di LDL modificate, quali sono state le motivazioni?

Sappiamo bene che elevate concentrazioni plasmatiche di lipoproteine a bassa densità (low density lipoproteins, LDL) sono ormai considerate fattore causale di aterosclerosi. Gran parte del colesterolo accumulato nelle lesioni aterosclerotiche è veicolato da LDL, invischiata dal loro legame con i proteoglicani nello spazio sub-endoteliale; la lipoproteina così ritenuta va incontro a modificazioni, per processi di ossidazione, lipolisi o proteolisi, che le conferiscono proprietà aterogene (1). Una volta modificata, la LDL innesca una risposta infiammatoria localizzata e promuove il reclutamento di monociti, che questi nel sub-endotelio assumono funzioni macrofagiche e spazzano le LDL modificate, dando così luogo alla formazione delle cosiddette

foam cells (cellule schiumose); si tratta il primo e più evidente segno di aterosclerosi a livello cellulare. In ogni suo stadio, dalle prime manifestazioni microscopiche, alla placca avanzata, la lesione aterosclerotica si caratterizza infatti per l'accumulo di lipidi intracellulari (soprattutto esteri di colesterolo) in cellule sottoendoteliali, la maggior parte delle quali di origine macrofagica (2). Si ritiene pertanto che uno dei momenti chiave dell'aterogenesi implichi la captazione di LDL ad opera di queste cellule immunitarie. Abbiamo imparato la LDL nativa, anche a concentrazioni molto elevate, non è tuttavia in grado di determinare accumulo di colesterolo nelle cellule macrofagiche umane in coltura (3, 4). Questi rilievi hanno stimolato la ricerca di vie di internalizzazione di LDL diverse dal meccanismo recettoriale classico, così finemente contro-regolato da non consentire un eccesso di colesterolo endocellulare. Si è così supposto che LDL dovesse essere modificata per poter essere riconosciuta dal macrofago e indurre la formazione di

foam cells. Godstein e Brown, gli stessi autori che avevano scoperto il recettore cellulare di LDL nativa, hanno confermato questa ipotesi osservando che, una volta modificata *in vitro* mediante acetilazione, LDL non è più riconosciuta dal suo recettore specifico, ma da uno diverso, chiamato recettore *scavenger*, che lega e internalizza la LDL modificata con un meccanismo non inibito dal contenuto cellulare di colesterolo e pertanto responsabile dell'esorbitante accumulo di colesterolo nelle *foam cells* (4). I recettori *scavenger* dei macrofagi riconoscono altre forme di LDL modificate per via chimica, o coniugate con aldeidi prodotte nel corso dalla loro perossidazione in presenza di rame (5). Nel 1981, Henriksen e collaboratori hanno osservato che LDL incubate con cellule endoteliali in coltura per 12-18 ore vanno incontro ad una serie di modificazioni chimico-fisiche che determinano il loro riconoscimento da parte dei macrofagi, acquisendo una affinità competitiva per lo stesso recettore *scavenger* delle LDL acetilate (6). La modificazione di LDL operata dalle cellule in coltura comporta una perossidazione lipidica, con conversione di lecitina in lisolecitina; può essere riprodotta *in vitro* dall'incubazione con metalli bivalenti, come lo ione rame o ferro, ed è totalmente inibita dagli antiossidanti (6).

Come nasce l'interesse per le LDL elettronegative o LDL(-)?

Attributo comune delle modificazioni di LDL, tali farle perdere affinità con il suo recettore specifico e di renderla affine al recettore *scavenger*, è l'aumento della sua carica negativa.

Durante uno degli abituali incontri per il caffè, con il direttore professor Pietro Avogaro, era emersa l'idea di sfruttare questa caratteristica fisica per cercare di verificare la presenza nel plasma umano di

una LDL modificata. Merita ricordare che il concetto di LDL elettronegativa era stato proposto per la prima volta nel 1979 dal gruppo di Gotto, al Baylor College of Medicine; studiando le caratteristiche delle lipoproteine estratte da lesioni aterosclerotiche dell'aorta umana, si era osservato che queste possiedono una carica elettrica più elettronegativa rispetto alla LDL plasmatica (8).

Il tecnico di laboratorio Giuseppe Cazolato aveva suggerito di verificare l'ipotesi di LDL plasmatiche con diversa carica elettrica utilizzando la tecnica della cromatografia a scambio ionico, capace appunto di discriminare le lipoproteine sulla base della loro carica. Con questa metodica si è ottenuta la separazione di LDL in due frazioni: una maggiore, pari al 90-98%, e una minore, che rende ragione fino al 10% di LDL totale. Fummo così i primi a descrivere la presenza nel plasma umano di una frazione di LDL, eluita ad una forza ionica maggiore di 0,3 M di NaCl, pertanto con carica elettrica più negativa rispetto al grosso della LDL (9). Questa LDL si caratterizza per aver un minor contenuto di fosfolipidi, una maggiore concentrazione di colesterolo libero e di proteine, e un contenuto maggiore di dieni coniugati, soprattutto di esteri di colesterolo. Si osserva inoltre la presenza di aggregati proteici, reattivi agli anticorpi monoclonali anti-apoB. La microscopia elettronica ha documentato nella frazione più elettronegativa una maggior variabilità nelle dimensioni delle particelle lipoproteiche e la tendenza a formare aggregati. Questa LDL, inoltre, ha una ridotta capacità di legame con alcuni anticorpi monoclonali che reagiscono con il dominio recettoriale di apoB e una minore affinità per i recettori specifici dei fibroblasti umani in coltura. Questo comportamento viene mantenuto anche nei confronti dei recettori specifici per LDL nativa nei macrofagi,

senza essere riconosciuta dal recettore *scavenger*; l'effetto netto è che questa frazione più elettronegativa viene internalizzata dai macrofagi meno di LDL acetilate ed anche di LDL con normale carica elettrica. Le modificazioni chimico-fisiche, il contenuto di dieni coniugati e il comportamento con i recettori dei fibroblasti e dei macrofagi ci avevano fatto concludere che la frazione LDL più elettronegativa poteva rappresentare un'aliquota di LDL umane circolanti che ha subito delle modificazioni dovute a fenomeni di tipo perossidativo. Il nostro lavoro, che portava il titolo di *Presence of a modified low-density lipoprotein in humans*, è stato pubblicato nel 1988 su *Arteriosclerosis* (9).

Come è stato accolto il vostro lavoro dalla comunità scientifica?

Certamente con grande interesse. Non mancavano dubbi circa la possibilità che i nostri risultati fossero da attribuirsi ad artefatti nel corso della preparazione delle frazioni lipoproteiche, e anche atteggiamenti decisamente critici. In particolare, le nostre conclusioni sono state duramente osteggiate dal prestigioso gruppo di San Diego, guidato da Steinberg. Si partiva dall'assunto che l'ossidazione di LDL fosse possibile solo nella parete arteriosa, in ambiente subintimale, non in circolo, data la ricca presenza di antiossidanti nel plasma; si sosteneva inoltre che, anche se LDL circolanti fossero coinvolte in fenomeni ossidativi, queste sarebbero spazzate dal sistema reticolo endoteliale nel giro di pochi minuti (10).

A dispetto di critiche severe, abbiamo continuato il nostro lavoro di studio. Da allora ci siamo tuttavia guardati bene dall'usare il termine di "LDL modificata", che qualcuno pretendeva dovesse essere riservato solo a modificazioni di LDL *in vitro* o dall'interazione con cellule in coltura. Si è così iniziato ad usare il termine più diplo-

matico di LDL elettronegativa [LDL "minus" o LDL(-)], per distinguerla da LDL con normale carica elettrica [nLDL]; questa terminologia è stata poi accolta da molti altri autori ed è tuttora in uso.

Quali sono stati i vostri passi ulteriori in questo campo di studio?

Innanzitutto si è migliorata la tecnica di frazionamento, passando alla cromatografia analitica ad alta pressione (High Pressure Ion Exchange Liquid Chromatography; IE-HPLC), che consente una miglior discriminazione di LDL(-) da nLDL, oltre a una più rapida esecuzione dell'indagine. Con questa metodica si è confermato in LDL(-) un maggior contenuto di sostanze reattive all'acido barbiturico (TBARS), ovvero di molecole a basso peso molecolare, fra cui la malondialdeide (MDA), che si formano durante la decomposizione di alcuni prodotti di perossidazione lipidica. A questo, si aggiunge una riduzione significativa del contenuto dell'antiossidante vitamina E, il che rende LDL(-) più facilmente ossidabile in presenza di ioni rame, con accorciamento o perdita della tipica *lag phase*, legata al tempo di consumo degli antiossidanti (11). Anche il rilievo di aggregati di apoB nella LDL(-) sembrava essere giustificato da una maggior concentrazione di MDA: l'incubazione di LDL *in vitro* con MDA determina infatti la formazione di aggregati di apoB (12). Si è così avuta conferma che questa frazione di LDL sia espressione di un, sia pur lieve, danno ossidativo occorso in circolo. Non potevamo comunque escludere che LDL potesse raccogliere, durante la sua permanenza in circolo, piccole quantità di MDA prodotta altrove, diventando simile alla LDL "minimamente" modificata, che si produce *in vitro* con incubazione con MDA (14) e che assume appunto una carica più elettronegativa. Restava aperta anche la possibilità che si

trattasse di LDL rientrata in circolo, dopo un passaggio nel sub-endotelio.

Abbiamo poi allargato lo spettro di ricerca, ricorrendo a collaborazioni internazionali, soprattutto con il gruppo di Los Angeles, guidato dal compianto amico Alex Sevanian. Si è così confermata la presenza di LDL(-) nella scimmia macaco cinomolgo; la sua concentrazione, relativa a LDL totale, aumenta sensibilmente negli animali trattati con dieta aterogena. Con gas cromatografia capillare si è documentato che il contenuto di ossisteroli in LDL(-) è 5 volte maggiore rispetto a quanto rilevato nella frazione meno elettronegativa. Inoltre, la LDL(-) della scimmia, diversamente dalla nativa, è citotossica nei confronti di cellule endoteliali in coltura (14). L'analisi degli idroperossidi, con una tecnica molto sensibile, basata sulla chemiluminescenza e conta dei singoli fotoni, ha documentato che LDL(-) è una lipoproteina circolante con un contenuto di idroperossidi più di sei volte maggiore rispetto alla nativa; a questo si aggiunge un minor contenuto di acidi grassi poli-insaturi, più suscettibili all'ossidazione, e una minor concentrazione degli aminoacidi più ossidabili, come istidina e lisina, verosimilmente consumati nel corso del processo ossidativo (15).

LDL(-) potrebbe dunque essere espressione di una popolazione di LDL più "vecchie", non sufficientemente modificate da essere rimosse rapidamente dal circolo, ma con minor affinità per il recettore proprio di LDL nativa (9), tale da favorire un maggior tempo di residenza in circolo. In queste circostanze i perossidi lipidici si possono accumulare per reazioni radicaliche di propagazione. Resta comunque aperta la possibilità di un coinvolgimento di perossidi lipidici generati dagli endoteli vascolari o provenienti da fonti dietetiche; gli idroperossidi lipidici sembrano infatti aumentare sensibilmente nella fase post-

prandiale (16). La possibilità che LDL(-) sia in qualche modo correlabile con modificazioni post-secretorie dovute a un maggior tempo di residenza in circolo, sembra anche confermata dal rilievo di una sua maggior concentrazione in LDL "piccole e dense" e può rendere ragione della loro maggior suscettibilità all'ossidazione *in vitro* (17). Sappiamo che le LDL più dense hanno un tempo di residenza in circolo significativamente maggiore e questo si correla con loro modificazioni ossidative (18). D'altra parte, un maggior tempo di circolo, aumenta per la lipoproteina le occasioni di entrare e riemergere dal sub-endotelio vascolare, ovvero dall'ambiente in cui è più facile che si verifichino fenomeni ossidativi (19). Il rapporto di LDL(-) con una sua più lunga permanenza in circolo sembra anche suffragato dalla marcata riduzione della concentrazione di questa frazione che si osserva dopo trattamento aferetico, capace di eliminare selettivamente le LDL più vecchie, più ossidate e con basso contenuto di vitamina E (20).

Che LDL(-) sia legata a fenomeni di tipo ossidativo sembra confermato dall'effetto del farmaco probucolo, che oltre al suo noto effetto ipocolesterolemizzante, ha proprietà antiossidanti ed è in grado di inibire *in vitro* la modificazione ossidativa di LDL ad opera delle cellule endoteliali in coltura (21). Il trattamento con probucolo in soggetti ipercolesterolemici induce la riduzione attesa del 17% della concentrazione di LDL totali e una riduzione molto più sensibile, pari al 43%, della frazione LDL(-); la LDL dei pazienti trattati si dimostra inoltre più resistente alla ossidazione *in vitro* indotta da ioni rame (22).

Come origina la carica negativa di LDL(-)?

La natura della carica negativa di LDL(-) è controversa. Come si è visto, il titolo dei

gruppi aminici di superficie indica un aumento della carica negativa, probabilmente per un consumo ossidativo preferenziale di lisina, fra gli altri aminoacidi sensibili all'ossidazione (16). In generale, più studi hanno sottolineato modificazioni dell'apolipoproteina B-100, come elemento chiave per determinare una aumentata elettronegatività della lipoproteina (23-25). Il dicroismo circolare ha documentato una parziale perdita della struttura secondaria di apoB-100, con maggior contenuto di strutture beta e un minor contenuto di alfa-eliche (26). Se è inoltre osservata una perdita di emissione di fluorescenza del triptofano attribuibile a una alterazione nell'impacchettamento dello strato lipidico di superficie, probabilmente legato alla presenza di lipidi ossidati; un monostrato lipidico meno compatto, può favorire un'alterazione del ripiegamento della proteina, con "affondamento" di sue parti in ambiente più idrofobico (26). Il disordine della struttura lipidica osservato in LDL(-) può anche rendere ragione della sua tendenza a formare aggregati, così come l'alterato ripiegamento di apoB-100 può essere motivo della sua scarsa affinità per il recettore specifico di LDL (9).

Ovviamente, una delle prime questioni che si sono poste riguarda la possibilità che l'ossidazione di LDL, con formazione di LDL(-), sia frutto di artefatti nel corso della sua preparazione e separazione. Vi sono tre ordini di evidenze che portano ad escludere questa ipotesi:

- 1) LDL(-) può essere rilevata mediante elettroforesi capillare nel plasma non frazionato (27);
- 2) la perossidazione in vitro di LDL isolate produce un largo spettro di lipoproteine con mobilità elettroforetica aumentata, ma pochissime particelle con i caratteri di LDL(-) (28);
- 3) si può misurare nel plasma utilizzando anticorpi monoclonali (29).

LDL(-) può essere generata da meccanismi diversi dall'ossidazione e la relativa preponderanza di un meccanismo rispetto ad un altro, dipende dalla patologia sottostante o dallo stato metabolico di ciascun individuo. Questo non significa che ciascun meccanismo specifico corrisponda ad uno stato patologico, ma piuttosto che modificazioni o alterazioni molecolari sono fra loro connesse e probabilmente si potenziano mutualmente.

La glicosilazione non enzimatica di LDL, ad esempio, contribuisce alla generazione di LDL(-) e, nello stesso tempo, rende la lipoproteina più prona alla perossidazione, riduce la sua affinità con il recettore specifico, aumenta il contenuto di esteri di colesterolo nei macrofagi e altera la funzione endoteliale (30).

Anche la rimozione di acido sialico dalle catene oligosaccaridiche di apoB-100 produce una LDL che determina accumulo di colesterolo nelle cellule in coltura e mostra avere effetti citotossici (31). In effetti si è osservato che la LDL desialilata isolata dal sangue umano presenta caratteristiche molto simili a LDL(-) (32).

La carbamilazione risulta dalla sostituzione di residui di lisina e arginina ad opera di cianati derivati dall'urea (nei pazienti uremici) o dal tiocianato (nei fumatori) (33); lo stress ossidativo proprio dell'insufficienza renale cronica e del consumo di tabacco può contribuire all'aumento della carica elettronegativa della LDL carbamilita. In questo contesto, si è osservato che la carbamilazione rende la LDL più suscettibile alla ossidazione (34).

Anche la presenza di LDL "piccole e dense" (small dense LDL; sdLDL), proprie della ipertrigliceridemia, della dislipidemia diabetica e della sindrome metabolica, contribuisce a una maggior proporzione di LDL(-), con meccanismi diversi (17, 35). Anzitutto le sdLDL hanno di per sé una carica elettrica più negativa e sono più su-

scettibili all'ossidazione e alla glicazione non enzimatica (17, 36, 37). Alla diversa carica elettrica di sdLDL potrebbe contribuire la presenza di piccole quantità di apolipoproteine non B (38).

Altro elemento con un ruolo rilevante nella formazione di LDL(-) è costituito dall'aumento di acidi grassi non esterificati (non-esterified fatty acids, NEFA) nel sangue. Si è sostenuto che la concentrazione plasmatica di NEFA sarebbe il maggior determinante della carica elettrica di LDL(-), almeno nei soggetti normolipidemicici (35). Elevate concentrazioni di NEFA nel plasma si osservano in condizioni fisiologiche, come la fase postprandiale e dopo intenso esercizio aerobico, e in processi patologici come il diabete, l'insulino-resistenza, la sindrome metabolica e la steatosi epatica non alcolica. Alcuni studi indicano che il contenuto di NEFA in LDL le conferisce capacità infiammatorie e favorisce l'aggregazione lipoproteica; entrambe caratteristiche di LDL(-) (39, 40).

Quali metodi sono in uso per isolare e studiare le LDL(-)?

Per separare LDL(-) in un primo tempo è stata utilizzata la cromatografia a scambio ionico, in un sistema HPLC (high performance liquid chromatography) (9); la tecnica è stata poi ottimizzata utilizzando un sistema FPLC (fast protein liquid chromatography) (11, 14, 15, 42). Si è anche impiegata l'isotacoforesi capillare (capillary isotachopheresis), che separa le subfrazioni lipoproteiche sulla base della loro carica elettrica netta (27, 42). Più recentemente si è ricorso all'uso di anticorpi monoclonali che riconoscono epitopi presenti in LDL(-), isolata con FPLC, e non nella LDL nativa (43, 44). Usando due diversi anticorpi monoclonali è stata messo a punto un sistema di dosaggio ELISA, che avrebbe il vantaggio di avere una maggiore

sensibilità e specificità, consentendo anche di testare numerosi campioni in tempo relativamente breve (45).

Va considerato che i metodi di dosaggio di LDL(-) sono specifici per la LDL elettro-negativa, indipendentemente dalla sua origine. Non discrimina LDL(-) generata da fenomeni ossidativi, da glicosilazione non enzimatica, da lipolisi o proteolisi enzimatiche, dall'arricchimento con NEFA, da presenza di apolipoproteine non B, o da altre modificazioni post-secretive. Infine, mancano studi che mostrino una stretta correlazione fra i vari metodi di dosaggio riportati in letteratura; non disponiamo pertanto di una metodica di studio standardizzata.

Quale significato hanno in ambito clinico le LDL(-)?

Una concentrazione percentuale maggiore di LDL(-) si osserva nell'ipercolesterolemia familiare e nell'ipertrigliceridemia (46); il trattamento con statine corregge l'eccesso percentuale di LDL(-) (47, 48). Anche nel diabete, sia esso di tipo 1 o di tipo 2, si osserva un significativo incremento di LDL(-) (49-51); l'ottimizzazione del controllo glicemico, con riduzione delle proteine glicosilate comporta una normalizzazione di LDL(-) (52). Nei pazienti con diabete si è rilevata una relazione fra glicazione di apoB-100 e la presenza di LDL(-); come già osservato, non si può escludere che la glicazione possa, per sé, conferire una carica elettrica più elettronegativa a LDL; in ogni caso, la LDL glicata è anche più suscettibile alla ossidazione in vitro (53). Un aumento della quota di LDL(-) interessa anche soggetti con insulino-resistenza o con sindrome metabolica (54, 55) e si correla negativamente con la concentrazione plasmatica di colesterolo HDL (56). Altre situazioni che comportano un aumento della frazione LDL(-) sono la steatosi epatica non alcolica (57), l'insufficienza

za renale cronica severa (58, 59) e il fumo di sigaretta (60). LDL(-) aumenta anche in fase post-prandiale (16), o dopo uno stress ossidativo, come un intenso esercizio aerobico (61). In malattie autoimmuni, come il lupus eritematoso sistemico, che si accompagna con complicazioni aterosclerotiche severe, aumenta significativamente la frazione di LDL più elettronegativa, a dispetto di valori normati o bassi di LDL totale (62). Analoghe osservazioni si riferiscono all'artrite reumatoide (63).

Si è osservata una correlazione fra prevalenza di LDL(-) e l'entità dell'aterosclerosi coronarica valutata con angiografia (64, 65).

La concentrazione di LDL(-) aumenta dopo infarto del miocardio (66, 67) o ictus ischemico (68); in queste situazioni è stato osservato l'aumento della frazione chiamata L5, che mostra carica elettrica più elettronegativa (69).

L'ampio spettro di situazioni nelle quali si osserva un aumento di LDL(-) riflette la loro eterogeneità e la varietà dei processi coinvolti nella sua generazione. Il suo comportamento nei processi aterosclerotici acuti, così come la sua correlazione con l'entità del danno aterosclerotico, potrebbe, per contro, essere espressione del processo patologico sottostante piuttosto che la sua causa. Questa ipotesi appare particolarmente credibile nelle situazioni in cui la rottura di una placca aterosclerotica determina ischemia; in questo caso le lipoproteine ingabbiate nello spazio sub-endoteliale possono essere rimesse in circolo e contribuire al pool di LDL(-), probabilmente sotto forma della più elettronegativa L5, in grado di peggiorare l'ischemia a causa della sua trombogenicità (66, 68).

Quale altri ruoli biologici sono stati ipotizzati per LDL(-)?

Non tutti gli effetti di LDL(-) sono da considerarsi strettamente aterogeni. È sta-

to descritto infatti un doppio ruolo per LDL(-) a proposito di una sua attività infiammatoria (70): l'espressione di molecole di adesione ad opera di cellule endoteliali indotta da LDL(-) può essere rovesciata per azione di lipoprotein lipasi (LpL). La lipolisi di LDL(-), mediata da LpL, genera dei fattori di trascrizione anti-infiammatori, che a loro volta inibiscono la sintesi di molecole di adesione; entrerebbe dunque in opera un meccanismo di feedback che limita la risposta infiammatoria. Si è poi osservato che LDL(-), in parallelo all'azione su citochine pro-flogistiche, promuove il rilascio da monociti e linfociti della citochina anti-infiammatoria interleuchina 10 (IL-10), contribuendo così a modulare la risposta infiammatoria (71). Dunque, l'attribuzione a LDL(-) di effetti biologici non può essere categorica, poiché dipende dalle situazioni. Può giocare un ruolo di modulatore della risposta infiammatoria per evitare risposte immuni inappropriate. Abbiamo visto come la concentrazione relativa di LDL(-) sia aumentata in situazioni flogistiche come l'artrite reumatoide o il lupus eritematoso sistemico. In queste situazioni potrebbe modulare in qualche modo la risposta immune, emergere per contrastare una risposta infiammatoria eccessiva: essere dunque conseguenza, piuttosto che causa, dei processi flogistici.

In conclusione, puoi riassumere le ragioni del rinnovato interesse scientifico e clinico verso le LDL(-)?

Ai classici fattori di rischio cardiovascolare, si sono aggiunti nel tempo le modificazioni fisico-chimiche delle lipoproteine, in particolare di LDL, che includono la sua carica elettrica. In questo contesto, un interesse particolare assume la frazione LDL con carica più elettronegativa, da noi connotata come LDL(-). La sua origine, complessa ed eterogenea, include processi di

tipo ossidativo. Diverse situazioni che aumentano il rischio cardiovascolare, favoriscono la formazione di LDL(-) o si associano a un suo aumento. In aggiunta, eventi cardiovascolari acuti danno luogo ad importanti incrementi di LDL(-), probabilmente per ritorno in circolo di questa lipoproteina modificata nel corso della sua permanenza in ambiente sottoendoteliale. Molti studi *in vitro* hanno dimostrato la capacità di LDL(-) di promuovere a livello cellulare varie azioni di tipo infiammatorio, ma anche di determinare alcuni effetti anti-infiammatori in grado di controllare una risposta infiammatoria eccessiva.

In conclusione LDL(-) è un probabile marcatore di stress metabolico. Non disponiamo ancora di una metodologia di studio ben standardizzata, anche se, ad ora, la più usata è la FLPC. Non disponiamo poi di informazioni di ampia scala, quali si potrebbero ottenere includendo lo studio di LDL(-) in studi prospettici, randomizzati; solo così sarà possibile valutare correttamente la sua rilevanza clinica.

Bibliografia

- Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol.* 1998; 9: 471-4.
- Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1983; 52: 223-61.
- 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.
- Brown MS, Goldstein JL, Krieger M, Ho YK, Anderson RG. Reversible accumulation of cholesterol esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J Cell Biol.* 1979; 82: 597-613.
- Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autooxidation of low density lipoprotein; loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res.* 1987; 28: 495-509.
- 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.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Koo JC, Witztum JL. Beyond Cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl J Med.* 1989; 320: 915-24.
- Hoff HF, Bradley WA, Heideman CL, Gaubatz JW, Caragas MD, Gotto AM. Characterization of low-density lipoprotein-like particle in the human aorta from grossly normal and atherosclerotic lesions. *Biochim Biophys Acta.* 1979; 573: 361-74.
- Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G. Presence of a modified low-density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis.* 1988; 8 (1): 79-87.
- Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL: correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis.* 1987; 1: 135-43.
- Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo Bon G. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. *Free Radical Biol Med.* 1991; 11: 247-53.
- Bittolo Bon G, Cazzolato G, Avogaro P. Changes of apolipoprotein B molecular weight and immunoreactivity in malondialdehyde-modified low density lipoproteins. *Artery.* 1983; 12: 74-80.
- Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, et al. Minimally modified low density lipoproteins stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest.* 1990; 85: 1260-6.
- Hodis HN, Krams DM, Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzolato G, Hwang J, et al. Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulating oxidized low density lipoprotein (LDL_{ox}). *J Lipid Res.* 1994; 35: 669-77.
- Sevanian A., Bittolo Bon G, Cazzolato G, Hodis H, Hwang J, Zamburlini A, et al. LDL_{ox} is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J Lipid Res.* 1997; 38: 419-28.
- Ursini F, Zamburlini A, Cazzolato G, Maiorino M, Bittolo Bon G, Sevanian A. Postprandial lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis. *Free Rad Biol Med.* 1998; 25: 250-2.
- 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.

18. Pietzsch J, Lattke P, Julius U. Oxidation of apolipoprotein B-100 in circulating LDL is related to LDL residence time. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: e63-e67.
19. Walzem RL, Watkins S, Frankel EN, Hansen RJ, German JB. Older plasma lipoproteins are more susceptible to oxidation: a linking mechanism for the lipid and oxidation theories of atherosclerotic cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 1995; 92: 7460-4.
20. Cattin L, Petrucco A, Cazzolato G, Bittolo Bon G, Borelli V, Nardon E, et al. Low density lipoprotein apheresis decreases oxidized low density lipoproteins and monocyte adhesion to endothelial cells. *ASAIO J.* 1997; 43: 209-13.
21. Parthasarathy S, Young SG, Witztum JL, Pittman RC, Steinberg D. Probucol inhibits oxidative modification of low-density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1986; 77: 641-4.
22. Bittolo Bon G, Cazzolato G, Avogaro P. Probucol protects Low-density lipoproteins from *in vitro* and *in vivo* oxidation. *Pharmacol Res.* 1994; 29: 337-44.
23. Hazell LJ, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein with causes transformation of lipoprotein into a high-uptake for macrophages. *Biochem J.* 1993; 290: 165-72.
24. Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL to an atherogenic form *in vitro*. *J Clin Invest.* 1999; 103: 1547-60.
25. Ziouzenkova O, Asatryan L, Akmal M, Tetta C, Wratten ML, Heineke J, Sevanian A. Cross-linking between low density lipoprotein ApoB and hemoglobin mediates conversion to electronegative LDL- during *ex-vivo* blood circulation. *J Biol Chem.* 1999; 274: 18916-24.
26. Parasassi T, Bittolo Bon G, Brunelli R, Cazzolato G, Krasnokova EK, Mei G, et al. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL(-). *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 82-9.
27. Bittolo Bon B, 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.
28. Chang YH, Sevanian A. Characterization of cholesterol oxidation products during the formation of oxidatively modified low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23: 202-14.
29. Damasceno NRT, Sevanian A, Apolinario E, Oliveira JMA, Fernandes I, Abdalla DSP. Detection of electronegative low-density lipoprotein (LDL-) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. *Clin Biochem.* 2006; 39: 28-38.
30. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 11: 93-102.
31. Orekhov AN, Tertov VV, Muchin DN, Mikhailenko IA. Modification of low-density lipoproteins by desialylation causes lipid accumulation in cultured cells: discovery of desialylated lipoprotein with altered cell metabolism in the blood of atherosclerotic patients. *Biochem Biophys Res Comm.* 1989; 162: 206-11.
32. 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 lipoproteins subfractions. *Exp Mol Pathol.* 1995; 62: 166-72.
33. Basnakian AG, Shah SV, Ok E, Altunel E, Apostolov EO. Carbamylated LDL. *Adv Clin Chem.* 2010; 51: 25-52.
34. Verbrugge FH, Tang WH, Hazen SL. Protein carbamylation and cardiovascular disease. *Kidney Int.* 2015; 88: 474-8.
35. Gaubatz JW, Gillard BK, Massey JB, Hoogeveen RC, Huang M, Lloyd EE, et al. Dynamics of dense electronegative low-density lipoproteins and their preferential association with lipoprotein phospholipase A(2). *J Lipid Res.* 2007; 48: 348-57.
36. Tribble DL. Lipoprotein oxidation in dyslipidemia: Insights into general mechanisms affecting lipoprotein oxidative behavior. *Curr Opin Lipidol.* 1995; 6: 196-208.
37. Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, Soran H, Durrington PN. Glycation of LDL in non-diabetic people; Small dense LDL is preferentially glycated both *in vivo* and *in vitro*. *Atherosclerosis.* 2009; 202: 162-8.
38. Diffenderfer MR, Shaefer EJ. The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr Opin Lipidol.* 2014; 25: 221-6.
39. Benitez S, Camacho M, Arcelus R, Vila L, Bancells C, Ordonez-Llanos J, et al. Increased lysophosphatidilcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL. *Atherosclerosis.* 2004; 177: 299-305.
40. Jayraman S, Gantz DL, Gursky O. Effect of phospholipase A(2) and its products on structural stability of human LDL: Relevance to formation of LDL-derived lipid droplets. *J Lipid Res.* 2011; 52: 549-57.
41. Sanchez-Quesada JM, Chamaco M, Anton R, Benitez S, Vila L, Ordonez-Llanos J. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from

- human endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2003; 166: 261-70.
42. Schmitz G, Mollers C, Richter V. Analytical capillary isotachopheresis of human serum lipoproteins. *Electrophoresis*. 1997; 18: 1807-13.
 43. Damasceno NRT, Sevanian A, Apolinario E, Oliveira JMA, Fernandes I, Abdalla DSP. Detection of electronegative low density lipoprotein [LDL(-)] in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. *Clin Biochem*. 2006; 39: 28-38.
 44. Queiroz-Mello AP, Tande da Silva I, Parra Abdalla DS, Teixeira-Damasceno NR. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact in health and disease- *Atherosclerosis*. 2011; 215: 257-65.
 45. Faulin TES, Sena KC, Rodrigues-Telles AE, Mattos Grosso D, Bernardi Faulin EJ, Parra Abdalla DS. Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein. *Clin Chem Lab Med*. 2008; 46: 1769-75.
 46. Sanchez-Quesada JM, Otal-Entraigas C, Franco M, Blabco-Vaca F, Ordommez-Llanos J. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. *J Lipid Res*. 2002; 43: 699-705.
 47. Sanchez-Quesada JM, Benitez S, Otal M, Franco M, Otal-Entraigas C, Franco M, et al. Effect of simvastatin treatment on electronegative low density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 1999; 84: 655-9.
 48. Zang B, Matsunaga A, Rainwater DL, Miura S, Noda K, Nishikawa H, et al. Effect of rosuvastatin on electronegative LDL as characterized by capillary isotachopheresis. The ROSARY study. *J Lipid Res*. 2009; 50: 1832-941.
 49. Sanchez-Quesada JM, Perez A, Caixas A, Ordonez-Llanos J, Carreras G, Payes A, et al. Electronegative low-density lipoprotein subform is increased in patients with short-duration IDDM and closely related to glycaemic control. *Diabetologia*. 1996; 39: 1469-76.
 50. 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.
 51. Yano M, Inoue M, Machata E, Shiba T, Yamakado M, Hirabayashi Y, et al. Increased electronegative charge of serum low-density lipoprotein in patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2004; 340: 93-8.
 52. Sanchez-Quesada JM, Perez A, Caixas A, Rigla M, Payés A, Benitez S., Ordonez-Llanos J. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: Relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 3243-9.
 53. Moro E, Alessandrini P, Zambon C, Pianetti S, Pais M, Cazzolato G, Bittolo Bon G. Is glycation of low-density lipoprotein in patients with Type 2 diabetes mellitus a LDL pre-oxidative condition? *Diabet Med*. 1999; 16: 663-9.
 54. Zhang B, Kaneshi T, Ohta T, Saku K. Relation between insulin resistance and fast migrating LDL subfraction as characterized by capillary isotachopheresis. *J Lipid Res*. 2005; 46: 2265-77.
 55. Hsu JF, Chou TC, Lu J, Chen SH, Chen CC, Chen JL, Elayda M, Ballantyne CM, Shayani S, Chen CK. Low-density lipoprotein electronegativity is a novel cardiometabolic risk factor. *PLoS One*. 2014; 9 (9): e107340.
 56. Queiroz-Mello AP, Tande da Silva I, Silva Oliveira A, Sutti Nunes V, Abdalla DSP, Gidlund M, Teixeira Damasceno NR. Electronegative low-density lipoprotein is associated with dense low-density lipoprotein in subjects with different levels of cardiovascular risk. *Lipids*. 2010; 45: 619-25.
 57. Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, et al. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2011; 46: 101-7.
 58. Ziouzenkova O, Sevanian A. Oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) in HD patients: role in electronegative LDL formation. *Blood Purif*. 2000; 18: 169-76.
 59. Lobo JC, Mafra D, Farage NE, Faulin TE, Abdalla DS, de Nobrega AC, Torres JP. Increased electronegative LDL and decreased antibodies against electronegative levels LDL levels correlate with inflammatory markers and adhesion molecules in hemodialysed patients. *Clin Chim Acta*. 2011; 412: 1788-92.
 60. Tang D, Lu J, Walterscheid JP, Chen HH, Engler DA, Sawamura T, Chang PY, Safi HJ, Yang CY, Chen CH. Electronegative LDL circulating in smokers impairs endothelial progenitor cell differentiation by inhibiting Akt phosphorylation via LOX-1. *H Lipid Res*. 2008; 49: 33-47.
 61. Sanchez-Quesada JM, Jorba O, Payes A, Otal A, Serra-Grima R, Gonzales-Sastre F. Ascorbic acid inhibits the increase in low-density lipoprotein (LDL) susceptibility to oxidation and the proportion of electronegative LDL induced by intense aerobic exercise. *Coron Artery Dis*. 1998; 9: 249-55.
 62. Chan HC, Chan HC, Liang CJ, Lee HC, Su H, Lee AS. Role of low-density lipoprotein in early vascular

- aging associated with systemic lupus erythematosus. *Circulation*. 2019; 140 (Suppl. 1): A 16473.
63. Dai L, Zhang Z, Winyard PG, Gaffney K, Jones H, Blake DR, Morris CJ. A modified form of low-density lipoprotein with increased electronegative charge is present in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22: 705-10.
 64. Tomasik A, Janchec W, Skrzep-Poloczek B, Widera-Romuk E, Wodniecki J, Wojciechowska C. Circulating electronegatively charged low-density lipoprotein in patients with angiographically documented coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2003; 63: 259-65.
 65. Niccoli G, Bacà M, De Spirito M, Parasassi T, Cosentino N, Greco G, et al. Impact of electronegative low-density lipoprotein on angiographic coronary atherosclerotic burden. *Atherosclerosis*. 2012; 223: 166-70.
 66. Chan HC, Ke LY, Chu CS, Lee AS, Shen MY, Cruz MA, et al. Highly electronegative LDL from patients with ST-elevation myocardial infarction triggers platelets activation and aggregation. *Blood*. 2013; 122: 3632-41.
 67. Yang TC, Chang PY, Lu SC. L5-LDL from ST-elevation myocardial infarction patients induces IL-1beta production via LOX-1 and NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017; 312: H265-H274.
 68. Shen MY, Chen FY, Hsu JF, Fu RH, Chang CM, Chang CT, et al. Plasma L5 levels are elevated in ischemic stroke patients and enhance platelet aggregation. *Blood*. 2016; 127: 1336-45.
 69. Yang CY, Raya JL, Chen HH, Chen CH, Abe y, Pownall HJ, et al. Isolation, characterization, and functional assessment of oxidatively modified subfractions of circulating low-density lipoproteins. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1083-90.
 70. Ziouzenkova O, Asatryan L, Sahady D, Orasanu G, Perrey S, Cutak B, et al. Dual role for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low-density lipoprotein. *J Biol Chem*. 2003; 278: 39874-81.
 71. Estruch M, Sancgez-Quesada JK, Ordonez-Llanos J, Benitez S. Electronegative LDL: a circulating modified LDL with a role in inflammation. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 181324.