



## **ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL**

**Marta González Muñoz**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

Marta González Muñoz

**ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE  
LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I  
PARTÍCULES ROMANENTS EN DIFERENTS  
CONDICIONS ASSOCIADES A RISC  
ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL  
COLESTEROL**

TESI DOCTORAL

Dr. Josep Ribalta

Dra. Montse Guardiola

Dr. Antoni Castro

Departament de Medicina i Cirurgia

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Programa de doctorat en Nutrició i Metabolisme



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

CIIIIIM!!!

He fet cim! Finalment puc veure la immensitat que es dibuixa davant meu, i la grandesa del camí recorregut a la paret ... aquell pic anhelat que cada cop anava fent-se més gran i proper ja és una realitat.

Han estat molts “*llargs*” durant tots aquests anys, alguns més laboriosos i lents, altres que es deixaven xalar més, alguns “*encadenats*”, altres “*desencadenats*”, cadascun aportant la seva peça al gran mosaic final.

Aquesta no ha estat pas una ascensió en solitari, ans al contrari, la cordada ha estat compartida per tots vosaltres. És un cim compartit ... més diria, ha estat una escalada assistida per tots els que m’envolteu, m’estimeu i em doneu suport. Gràcies a vosaltres he trobat aquell *parabolt*, *friend* o *tasconet* que m’ha salvat en aquells moments en que pensava que la gravetat em guanyava la partida.

Però no penseu que no hagi caigut ... oh i tant que he caigut, però gràcies als companys de cordada (que n’han estat molts) cada caiguda ha estat un motiu més per pujar amb més ganes i motivació.

Aquesta aventura va començar a gestar-se molt abans que jo en fos conscient de la seva existència. En acabar Biotecnologia, gràcies a



la Dra. Pilar Sardà, vaig tindre l'oportunitat d'entrar en contacte amb el Dr. Lluís Masana, que em donà l'oportunitat de realitzar les pràctiques d'empresa dins del seu grup de recerca: la URLA, un grup dedicat a l'estudi dels lípids i l'arterioscleròsi, paraules que en aquells moments em sonaven a xinés. D'aquesta manera vaig entrar a formar part de l'equip del Dr. Josep Ribalta introduint-me al món de les *fibulines*. Va ser, per tant, el treball de final de carrera, el primer tastet de la ruta que m'esperava.

El dia que vaig començar a plantejar-me realment aquesta "via", fou poc després d'acabar la meua etapa universitària, anys després d'haver conegut les *fibulines*, passant per la Facultat de Medicina i retrobant-me el Dr. Josep Ribalta. Ha estat gràcies a tu, Josep, que he pogut conèixer paraules com "*iodixanol*" o "*remnants*", que he après a gestionar el procés creatiu de les meves neurones (bastant complicat, per cert), i que he après (espero) a escriure amb "*més carinyu*" articles científics, entre altres mil coses. Al teu costat he tingut la sort de comptar amb el suport i ajuda de la Dra. Montse Guardiola, primer com a companya de doctorat i posteriorment com a co-directora de tesi; gràcies per compartir amb mi consells i suggeriments, refrigeris nocturns de congressos, resoldre'm dubtes, i un llarg etcèteres de positivitat. És gràcies a vosaltres que he conegut el vertader treball en equip, que m'he sentit guiada i

acompanyada en tot el trajecte, que no ha estat curt, i que sóc aquí, doncs sense la vostra empenta hagués “*rapel·lat*” la paret en més d’un moment

Al formar part d’aquest equip he tingut l’oportunitat de treballar al costat de professionals a qui els hi dec moltes idees i ajudes, gràcies també Dr. Antoni Castro, Dr. Joan Carles Vallvé i Roser Rosales! Evidentment tampoc podria haver finalitzat aquest projecte sense el suport de totes les meves companyes i companys de la URLA i l’hospital: Iolanda amb qui les tardes eren més curtes, Merche que m’has ensenyat amb paciència el món del laboratori, Alba gràcies per passar de format virtual a paper els articles que més m’interessaven, Dr. Merino i les canyes de xocolata, Nuria i Berta gràcies per animar-me durant la meva estada a la UIC, la Dra. Núria Plana amb qui vaig descobrir el món dels assajos clínics, ... i a tots amb qui he compartit aquest recorregut.

I com que els últims són els primers, agrair a la meva mare i pare l’estima i l’energia positiva que he necessitat per finalitzar aquesta gran paret; segur que frisseu per celebrar-ho. Àvia al final no t’he pogut ensenyar aquell llibre que estava escrivint amb els teus ànims constants, alegria i “entrenyabilitat”: t’enyoraré. Germanet aquestes tardes a l’ombra de la paret han estat genials, *grazie mille*. Oriol aquesta tesis és tant meva com teva, mil gràcies per ser-hi sempre,

donant-me ànims per seguir amunt i fer que les caigudes fossin tan  
suaus. I per últim, a tots aquells que cada cap de setmana, festa  
major, sopar, immersió o escalada m'heu donat ànims i ajudat a  
desconnectar quan calia: gràcies IMB., (TOTS) i Blubs, companys de  
vida i il·lusions. A tots vosaltres us la dedico.

Àvia, per tu.

*Rome was not built in a day  
opposition will come your way  
but the harder the battle, you see  
is the sweeter the victory  
You can get it if you really want  
you can get it if you really want  
you can get it if you really want  
but you must try - try and try - try and try  
you'll succeed at least ...*

*"You Can Get It If You Really Want". Jimmy Cliff.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# ÍNDEX



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

**LLISTAT D'ABREVIATURES - 23 -**

**PRESENTACIÓ I JUSTIFICACIÓ - 31 -**

**INTRODUCCIÓ - 39 -**

**I. METABOLISME LIPÍDIC - 41 -**

I.I. LÍPIDS I LIPOPROTEÏNES - 41 -

I.II. METABOLISME EXOGEN - 44 -

I.III. METABOLISME ENDOGEN - 53 -

**II. DETERMINACIÓ DE LES LIPOPROTEÏNES - 63 -**

II.I. ULTRACENTRIFUGACIÓ - 69 -

II.II. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR - 72 -

**III. LIPOPROTEÏNES ROMANENTS - 74 -**

**IV. DISLIPÈMIA ATERÒGENA - 84 -**

**V. ARTERIOSCLEROSI - 88 -**

V.I. PROCÉS PATOGENIC DE L'ARTERIOSCLERÒSI - 89 -

V.II. ARTERIOSCLEROSI SUBCLÍNICA - 92 -

V.III. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR - 94 -

V.IV. DISLIPÈMIA ATERÒGENA, SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I ARTERIOSCLEROSI	- 103 -
V.V. LIPOPROTEÏNES ROMANENTS I ARTERIOSCLEROSI	- 108 -
V.VI. LUPUS ERITEMATÒS SISTÈMIC I ARTERIOSCLEROSI	- 117 -

**HIPÒTESI I OBJECTIUS** - 143 -

**RESULTATS** - 151 -

**ARTICLES** - 163 -

<b>1. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE LIPOPROTEIN SUBCLASSES AND THE APOE GENOTYPE INFLUENCE CAROTID ATHEROSCLEROSIS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS.</b>	<b>- 165 -</b>
<b>2. CHANGES IN LIPOPROTEIN COMPOSITION, DENSITY, PARTICLE SIZE, AND PARTICLE NUMBER DURING HEALTHY AGEING: THE <i>VITAGE</i> PROJECT.</b>	<b>- 179 -</b>
<b>3. BMI CORRELATES WITH ATHEROGENIC LIPOPROTEIN PROFILE EVEN IN NON-OBESE, NORMOGLYCEMIC, AND NORMOLIPIDEMIC HEALTHY MEN.</b>	<b>- 225 -</b>

#### **4. INCREASED PRESENCE OF REMNANT LIPOPROTEIN**

**CHOLESTEROL IN THE HDL OF DIABETIC SUBJECTS. - 237 -**

**DISCUSSIÓ - 255 -**

**CONCLUSIONS - 289 -**

**BIBLIOGRAFIA - 293 -**

**ANNEXOS - 345 -**

**ANNEX I. PNT ULTRACENTRIFUGACIÓ SEQÜENCIAL - 347 -**

**ANNEX II. PNT ULTRACENTRIFUGACIÓ AMB GRADIENT**

**IODIXANOL - 353 -**

**ANNEX III. PNT RLP-CHOLESTEROL ASSAY - 360 -**

**ANNEX IV. CRITERIS DE CLASSIFICACIÓ DE SLICC 2012 - 367 -**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# LLISTAT D'ABREVIATURES



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



***aβ2GP1*** : anticossos antiβ<sub>2</sub>glicoproteïna 1

***ABCA1*** : *ATP-binding cassette sub-family A member 1*

***ABCG1*** : *ATP-binding cassette sub-family G member 1*

***apo*** : apolipoproteïna

***aOxLDL*** : anticossos anti LDLox

***CETP*** : *cholesterol ester transfer protein*

***DM*** : diabetis mellitus

***DMT2*** : DM tipus 2

***EL*** : *endothelial lipase* - lipasa endotelial

***ELISA*** : *enzyme-linked immunoabsorbent assay*

***FPLC*** : *fast protein liquid chromatography*

***GIM*** : gruix de la íntima media

***GIMc*** : gruix de la íntima mMedia carotídia

***GGE*** : *gradient gel electrophoresis* - electroforesis en gradient de gel

***HDL*** : *high density lipoprotein*

- **LLISTAT D'ABREVIATURES** -

**HDLc** : colesterol transportat per les HDL

**HDL-P** : partícules HDL determinades per RMN

**HL** : *hepatic lipase* - lipasa hepàtica

**HSPG** : heparà sulfat proteoglicà

**IDL** : *intermediate density lipoprotein*

**IDLc** : colesterol transportat per les IDL

**IDL-P** : partícules IDL determinades per RMN

**IMC** : índex de massa corporal

**LCAT** : *lecithin cholesterol acyl-transferase*

**LDL** : *low density lipoprotein*

**LDLc** : colesterol transportat per les LDL

**LDLox** : LDL oxidada

**LDL-P** : partícules LDL determinades per RMN

**LDLR** : *LDL receptor* - receptor de la LDL

**LES** : lupus eritematós sistèmic

**Lp(a)** : lipoproteïna (a)



**LPL** : lipoproteïna lipasa

**LR** : lipoproteïna romanent

**LRP** : *LDLR related protein* - proteïna relacionada al receptor LDL

**MAC** : malaltia arterial coronària

**MCV** : malaltia cardiovascular

**MTP** : *microsomal triglyceride transfer protein*

**RMN** : ressonància magnètica nuclear

**PAGE** : *polyacrilamida gel electrophoresis* – electroforesi en gel de poliacrilamida

**PCR** : proteïna C reactiva

**PCSK9** : *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*

**PLTP** : *phospholipid transfer protein*

**pre $\beta$ HDL** : HDL naixents

**RLP** : *remnant-like lipoprotein*

**RLPc** : colesterol transportat per les RLP

**sdLDL** : *small and dense LDL* - LDL petites i denses

- **LLISTAT D'ABREVIATURES** -

**TG** : triglicèrids

**TNF $\alpha$**  : *tumor necrosis factor alfa* - factor de necrosis tumoral alfa

**VAP-II** : *vertical auto profile ultracentrifugation*

**VLDL** : *very low density lipoprotein*

**VLDLR** : *VLDL receptor* - receptor de les VLDL

**VLDL-P** : partícules VLDL determinades per RMN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# PRESENTACIÓ i JUSTIFICACIÓ



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



## - PRESENTACIÓ I JUSTIFICACIÓ -

Aquesta tesi doctoral s'ha dut a terme a la Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi (URLA), dedicada a la investigació del metabolisme lipídic, els mecanismes implicats en l'arteriosclerosi, les seves manifestacions clíniques i els seus factors de risc. El desenvolupament de la tesi se centra en l'efecte de la mida, el nombre i l'eliminació de la circulació de les diferents lipoproteïnes en l'arteriosclerosi.

Tot i els enormes avenços en el camp de la prevenció del risc cardiovascular, encara, avui en dia, una part molt significativa del infarts de miocardi es donen en individus amb un perfil lipídic de rutina normal. En el moment de la meua arribada a la URLA, l'interès de la línia d'investigació a la qual vaig entrar a formar part es trobava centrat en la cerca de paràmetres que complementessin les limitacions dels paràmetres lipídics de la bioquímica clínica de rutina (convencionals). Tant la ressonància magnètica nuclear (RMN) com la determinació de les lipoproteïnes romanents (LR) eren noves tècniques que calia explorar, i que podien donar resposta a les nostres restriccions metodològiques.

En aquest context, els pacients amb lupus eritematós sistèmic (LES) són un model poblacional interessant, perquè, tot i tenir un alt risc de malaltia cardiovascular (MCV), en general, presenten un perfil lipídic convencional mínimament alterat. És per això que en aquests

## - PRESENTACIÓ I JUSTIFICACIÓ -

pacients tant la mida com el nombre de lipoproteïnes, i també la presència d'LR podrien aportar informació addicional, que permetrien establir nous factors de risc cardiovascular propis d'aquesta població.

D'altra banda, el pacient LES és, majoritàriament, de sexe femení i jove, però la prevalença d'arteriosclerosi subclínica en edats joves és major que en la població general, i, per tant, l'edat no té un impacte tan fort en el procés arterioscleròtic com en la població general. Tant l'edat com l'índex de massa corporal (IMC) són factors de risc arterioscleròtic coneguts i importants, però mai no s'han estudiat en una població estrictament sana. La informació proporcionada per RMN i la determinació de les LR poden donar una visió del metabolisme lipídic en condicions de normalitat més acurada, cosa que fa possible establir de manera més precisa alteracions en les subclasses de lipoproteïnes i les LR en diferents edats i IMC.

Finalment, atès que la fracció d'RLPc ha estat considerada un factor independent de risc arterioscleròtic, és important conèixer les partícules que la componen. Fins a la data, hi ha poques dades respecte de la caracterització d'aquesta fracció, tot i que se sap que conté un ampli espectre de lipoproteïnes que varien en densitat i mida que no s'uneixen eficaçment en els anticossos



- PRESENTACIÓ I JUSTIFICACIÓ -

antiapolipoproteïna AI i apolipoproteïna B100. Per això, creiem que la descripció d'aquesta fracció romanent en les subclasses de lipoproteïnes obtingudes per diferents tècniques, com la ultracentrifugació convencional i el gradient d'iodixanol, podria ajudar a una millor comprensió del comportament i els efectes d'aquesta partícula.

En resum, una aproximació al perfil lipídic des d'altres punts de vista que aportin les noves tècniques pot ajudar en la comprensió i prevenció d'aquells accidents cardiovasculars que no es poden explicar a partir de la visió actual.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# INTRODUCCIÓ



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



# I. METABOLISME LIPÍDIC

---

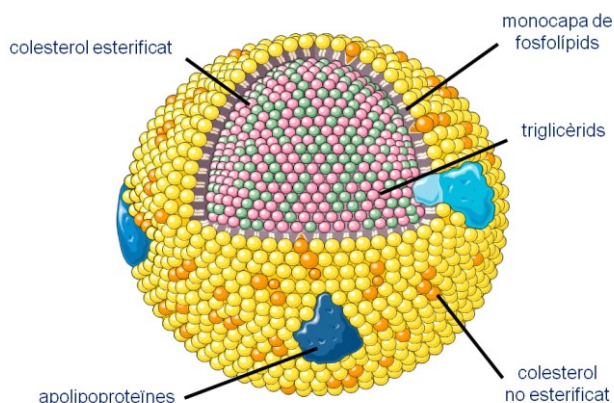
## I.I. LÍPIDS I LIPOPROTEÏNES

Els lípids són components essencials dels organismes vius atesa la importància que

tenen quant a l'estructura i la reserva

energètica i és, per tant, necessari que es distribueixin

per tot l'organisme. El corrent sanguini



**Figura 1.** Estructura d'una lipoproteïna. Imatge extreta i adaptada de [www.servier.com/Powerpoint-image-bank](http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank)

els transporta a teixits i òrgans, on es poden transformar, modificar, emmagatzemar o utilitzar per a l'obtenció d'energia. En ser molècules no polars o hidrofòbiques, és a dir, no solubles en medi aquós, cal que altres molècules polars les transportin: en el cas dels àcids grassos de cadena curta o intermèdia aquesta és l'albumina,

## - INTRODUCCIÓ -

però el transportador principal de lípids en circulació són les anomenades **lipoproteïnes**. Les lipoproteïnes consten d'un nucli hidrofòbic on es transporten els lípids no polars (triglicèrids i colesterol esterificat), envoltat per una capa de lípids amfipàtics (fosfolípids i colesterol lliure o no esterificat) que estan entrelaçats amb diferents proteïnes anomenades apolipoproteïnes (apo), que en determinen el seu destí metabòlic, i altres molècules liposolubles com les vitamines (A, D, E i K).

Entre les lipoproteïnes, s'inclou un grup altament heterogeni de partícules que difereixen en mida, càrrega, composició i funció fisiològica.

Les funcions principals de les lipoproteïnes són el transport de: 1) triglicèrids (exogen i endogen), 2) colesterol cap als teixits perifèrics i 3) excés de colesterol dels teixits perifèrics cap al fetge per eliminar-lo (transport revers).

Segons l'origen i la destinació dels lípids que transporten les lipoproteïnes, aquestes presentaran diferents característiques quant a **composició** i **mida**. La mida de les lipoproteïnes varia entre 5 i 1200 nm de diàmetre, i la seva composició lipídica i proteica és variable, fins i tot, entre partícules de mida semblant. Les lipoproteïnes no tenen una mida i una composició fixa, sinó que es troben en contínua modificació a causa de l'acció dels **transferidors**



**de lípids**, presents en plasma, com el *cholesterol ester transfer protein* (CETP) i la *phospholipid transfer protein* (PLTP), i **enzims** presents en parets cel·lulars, com la lipoproteïnàlipasa (LPL), l'*hepatic lipase* o lipasa hepàtica (HL), l'*endothelial lipase* o lipasa endotelial (EL) i la *lecithin cholesterol acyl-transferase* (LCAT), ambdós explicats amb més detall en apartats posteriors. D'aquesta manera, les diferents classes de lipoproteïnes se situen dins de certs rangs de mida; és a dir, formen un continu en què varien composició, mida, densitat i funció.

La caracterització de les lipoproteïnes ve determinada, en part, per la seva composició en **apos**, les funcions de les quals són: 1) estabilitzar i solubilitzar els lípids de les lipoproteïnes col·locant-se a la seva superfície, 2) actuar com a cofactors o activadors d'enzims que actuen sobre els lípids que aquestes transporten i 3) actuar com a lligands específics per a una sèrie de receptors cel·lulars a través dels quals les lipoproteïnes són reconegudes i les cèl·lules de l'organisme les poden internalitzar.

Donades les seves diverses funcions, trobem diferents tipus d'apos.

## - INTRODUCCIÓ -

**Taula 1.** Característiques de les apolipoproteïnes principals.

<b>Apolipoproteïnes</b>	<b>Pes molecular (kDa)</b>	<b>Presentes en</b>
apoAI	28	Quilomicrons i HDL
apoAII	17	
apoAIV	44	
apoB48	240	Quilomicrons
apoB100	513	VLDL, IDL i LDL
apoCI	7	Quilomicrons, VLDL, IDL i HDL
apoCII	9	
apoCIII	9	
apoE	34	

*apoAI*: apolipoproteïna AI; *apoAII*: apolipoproteïna AII; *apoAIV*: apolipoproteïna AIV; *apoB48*: apolipoproteïna B48; *apoB100*: apolipoproteïna B100; *apoCI*: apolipoproteïna CI; *apoCII*: apolipoproteïna CII; *apoCIII*: apolipoproteïna CIII; *apoE*: apolipoproteïna E; *HDL*: High density lipoprotein; *IDL*: Intermediate density lipoprotein; *LDL*: Low density lipoprotein; *VLDL*: Very low density lipoprotein.

## I.II. METABOLISME EXOGEN

La composició de les lipoproteïnes, però, comprèn molts més aspectes, com ara l'origen dels seus lípids. Els lípids components de les lipoproteïnes poden tenir un origen exogen a través de la dieta per mitjà de l'absorció intestinal, o bé endogen a partir de la seva



síntesi per part del mateix cos, l'òrgan sintetitzador del qual és el fetge. Els lípids que provenen de la dieta es digereixen a l'intestí prim gràcies als àcids biliars, que permeten un increment de la superfície de les partícules lipídiques, cosa que crea, d'aquesta manera, una major accessibilitat als enzims pancreàtics. El fetge sintetitza els àcids biliars a partir del colesterol, i aquests se secreten al duodè, on es produeix la digestió i la posterior absorció que fan els enteròcits (cèl·lules que formen el microvilli) dels lípids en forma de monoacilglicerols, àcids grassos lliures, colesterol i lisofosfoglicerols. Els enteròcits resintetitzen *de novo* els triglicèrids (TG), els fosfolípids i els èster de colesterol al reticle endoplasmàtic, on es poden emmagatzemar o poden iniciar l'assemblatge dels **quilomicrons**. Els quilomicrons es componen, sobretot, de TG (85%), però també de colesterol, colesterol èster, fosfolípids, i apos B48, AI, AII, AIV, CI, CII, CIII i E. La seva síntesi comença amb l'assemblatge dels lípids absorbits i l'apoB48, que actua com a nucli iniciador durant la traducció d'aquesta als ribosomes (1) (figura 2).

L'**apoB48** és una de les dues formes que hi ha d'apolipoproteïna B (apoB), la qual només es troba present en aquelles lipoproteïnes d'origen intestinal. Un procés de *splicing* alternatiu al gen d'apoB que transforma una glutamina en un codó de parada dóna lloc a l'apoB48, que s'anomena així perquè representa el 48% de la part n-

## - INTRODUCCIÓ -

terminal de l'apolipoproteïna original, l'**apoB100**. Sense aquest procés de *splicing* alternatiu, l'apo obtinguda és l'apoB100, una proteïna de mida gran (515kDa) que és present, majoritàriament, en lipoproteïnes d'origen hepàtic. La determinació plasmàtica tant de l'apoB48 com de l'apoB100 és un bon reflex del nombre de lipoproteïnes circulants que contenen aquestes apos, ja que només se'n localitza una per lipoproteïna. Una altra proteïna clau per al procés de síntesi dels quilomicrons és l'**MTP** (*microsomal triglyceride transfer protein*), present en el reticle endoplasmàtic i que transfereix a les apoB48 naixents lípids polars i neutres de la membrana del reticle endoplasmàtic. Deficiències en aquesta proteïna degudes a mutacions en el gen d'MTP donen lloc a l'abetalipoproteïnèmia, una malaltia autosòmica recessiva que causa baixos nivells de TG i colesterol, i nivells indetectables de colesterol LDL (LDLc) i apoB. Aquest concepte ha portat a considerar l'MTP com a diana terapèutica, el que ha donat lloc al desenvolupament d'inhibidors d'MTP (2).

Per iniciar la formació del quilomicró, només cal la traducció dels dos primers dominis funcionals de l'apoB48, la qual l'MTP començarà a enriquir amb lípids. A mesura que es va incrementant la llargada de l'apo, la ràtio TG:fosfolípids també va incrementant, i es forma un nucli ric en TG característic d'aquest tipus de lipoproteïnes, també

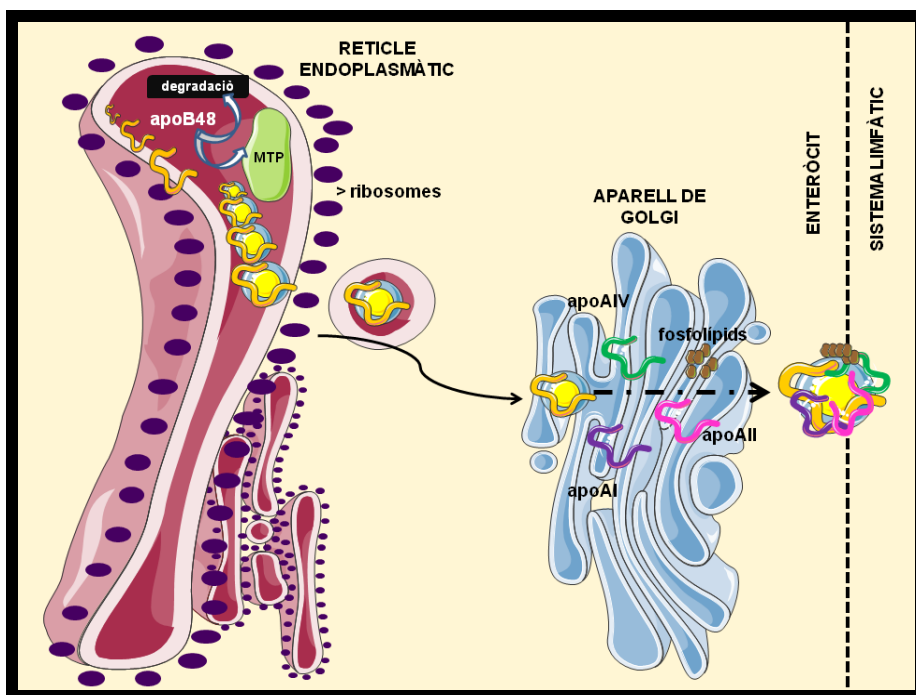


anomenades lipoproteïnes riques en TG. Aquelles apoB48 que no s'enriqueixen amb lípids, el sistema ubiquitina/proteasoma, predominantment, les degrada. El pas següent en la síntesi del quilomicro es produeix en l'aparell de Golgi, on s'afegeixen més fosfolípids i apos A (AI, AII i AIV), que acaben d'estabilitzar i assemblar el quilomicro (1). Finalment, l'enteròcit allibera els quilomicrons al sistema limfàtic i es drenen en el corrent circulatori via conducte toràcic. Durant tot el procés de síntesi, podem trobar diferents sistemes proteolítics que poden actuar sobre el quilomicro naixent i evitar-ne la síntesi i alliberació final.

Un cop en el corrent circulatori, els quilomicrons inicien un procés continu de canvi de mida i composició en interaccionar, mitjançant proteïnes de transferència de lípids com la PLTP i el CETP, amb altres lipoproteïnes en circulació, de les que obtenen o capten diferents molècules. La **CETP** és una glicoproteïna hidrofòbica secretada, que, sobretot, secreta el fetge i que circula en plasma unida, majoritàriament, a una lipoproteïna d'origen endogen anomenada *high density lipoprotein* (HDL). La seva funció principal és facilitar la redistribució dels TG, els èsters de colesterol i, en menor mesura, els fosfolípids, entre les lipoproteïnes circulants. Aquest procés equilibra els diferents lípids entre les lipoproteïnes.



Sobretot es transfereixen els èsters de colesterol de les HDL als quilomicrons i a les *low density lipoprotein* (LDL), i els TG dels quilomicrons i les LDL, a les HDL; és a dir, les lipoproteïnes riques en colesterol cedeixen el colesterol a les riques en TG, i aquestes cedeixen els TG a les riques en colesterol.



**Figura 2.** Formació de quilomicrons a l'enteròcit. El procés s'inicia al reticle endoplasmàtic amb la síntesi de l'apoB48, que es pot enriquir amb lípids per MTP o bé ser degradada. Posteriorment, a l'aparell de Golgi s'afegeixen fosfolípids i apoAs per acabar d'estabilitzar el quilomicro, que serà alliberat en el sistema limfàtic. ApoAI: apolipoproteïna AI, apoAII: apolipoproteïna AII, apoAIV: apolipoproteïna AIV, apoB48: apolipoproteïna



B48, MTP: *microsomal triglyceride transfer protein*. Composició d'imatges extretes i adaptades de [www.servier.com/Powerpoint-image-bank](http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank)

D'aquesta manera, la CETP promou, indirectament, l'eliminació en circulació dels èsters de colesterol via fetge (3). Atès el seu paper equilibrador, qualsevol alteració té un impacte en la susceptibilitat a l'arteriosclerosi, com es demostra en casos de dèficit de CETP, on es produeix un augment del colesterol HDL (HDLc) i una disminució d'LDLc, però els efectes sobre la malaltia cardiovascular (MCV) sembla que depenguin del genotip que causi la mutació i que pot alterar l'activitat de la CETP sobre altres paràmetres, tant de manera aterogènica com antiaterogènica (3,4). Precisament per aquest fet, també ha estat focus d'interès en la indústria farmacèutica, on s'han desenvolupat assajos clínics per valorar els efectes dels inhibidors de la CETP (torcetrapib, dalcetrapib, anacetrapib i evacetrapib) en la MCV (5). El futur d'aquest grup de fàrmacs és incert, doncs. Tot i els estudis publicats on es demostra l'increment de nivells d'HDLc i una millora de les seves propietats anti-aterogèniques (6), els assajos de torcetrapib es van interrompre el 2006 (7) quan els estudis de fase III van mostrar una excessiva mortalitat per qualsevol causa en el grup de tractament amb torcetrapib i atorvastatina, i, posteriorment, dalcetrapib no va demostrar una eficàcia clínica significativa. Tant anacetrapib com evacetrapib es troben en desenvolupament i no es preveu obtenir-ne resultats fins al 2017.

## - INTRODUCCIÓ -

En la interacció dels quilomicrons amb les HDL, encarregades del transport revers del colesterol, els primers capten les apos CII i E de les segones. L'**apoCII** és l'encarregada de la interacció dels quilomicrons amb l'enzim lipolític LPL, i la seva antagonista **apoCIII** és l'encarregada d'inhibir-la. A més, l'apoCIII modula la captació de les lipoproteïnes interrompent el reconeixement de l'apoE (encarregada del reconeixement de les lipoproteïnes pels seus receptors) pels receptors hepàtics (8,9). L'**LPL**, que forma part de la família de les lipases, se sintetitza al cor, múscul i teixit adipós, i posteriorment se secreta a la superfície de les cèl·lules endotelials adjacents unida al proteoglicà heparin sulfat. La seva funció, estimulada per apoAIV, és catalitzar la hidròlisi dels TG continguts en aquelles lipoproteïnes que presenten apoCII. Els quilomicrons circulants que ja contenen l'apoCII que prové de les HDLs els capta l'LPL a l'endoteli, on n'hidrolitzen els TG, la qual cosa dóna lloc a glicerol, que s'integra a la via de la gluconeogènesi, i a àcids grassos, que les cèl·lules poden absorbir per emmagatzemar-los i/o obtenir-ne energia. L'LPL és la peça clau en el procés d'eliminació de lipoproteïnes mitjançant receptor (10,11).

La vida mitjana dels quilomicrons en circulació és, aproximadament, d'1 hora (tot i que poden arribar a trobar-se'n en sang fins al cap de 4 hores). Un cop passat aquest temps, i havent estat hidrolitzats



repetidament, han perdut el 80-90% dels TG i han tornat a transferir les apoC i apoA a les HDL, fet que en canvia la seva mida i conformació tridimensional. En aquest punt, els quilomicrons passen a anomenar-se **quilomicrons romanents**, els quals són més petits, densos i es componen, bàsicament, de colesterol i apoE; i romanen (d'aquí el seu nom) en circulació fins que interaccionen amb receptors, principalment, hepàtics. Aquesta interacció amb els receptors es duu a terme gràcies a l'**apoE**, i dona com a resultat l'endocitosi del quilomicro i la hidròlisi lisosomal subsegüent que allibera glicerol i àcids grassos per emmagatzemar-los o utilitzar-los per a l'obtenció d'energia. L'apoE és la peça clau en el catabolisme de moltes lipoproteïnes, perquè és el lligand reconegut pels receptors de l'LDL (LDLR), la proteïna relacionada al receptor LDL (LDLR *related protein*, LRP), l'heparà sulfat proteoglicà (HSPG) i el receptor de les VLDL (VLDLR), que faciliten l'eliminació dels quilomicrons romanents de circulació, els quals explicarem amb més detall més endavant. L'apoE és una glicoproteïna de 34kDa, amb domini d'unió n-terminal a LDLR, LRP i HSPG, sintetitzada, majoritàriament, al fetge i, en menor mesura, en altres teixits extrahepàtics (entre un 20% i un 40%). En humans, el gen APOE és polimòrfic i presenta tres al·lels diferents: E2, E3 i E4, que poden donar lloc a sis possibles genotips (E2/E2, E2/E3, E3/E3, E3/E4,

## - INTRODUCCIÓ -

E4/E4 i E2/E4). Els tres al·lels es diferencien per: 1) la presència/absència dels aminoàcids cisteïna (Cys) i arginina (Arg) als llocs polimòrfics, 2) la seva afinitat per l'LDLR i 3) la seva unió a lípids i lipoproteïnes (12). Tot i l'existència de fins a 20 variants diferents d'aquest gen (13–15), aquí s'exposen les més comunes (les freqüències poden variar segons la població que s'estudiï (16)):

- L'al·lel E3 (Cys112 i Arg158) és considerada la forma original i més freqüent, i es troba en un 70-85% de la població general.
- L'al·lel E4 (Arg112 i Arg158) el trobem amb una freqüència de 12-18% en població general. A causa de a la seva alta afinitat per LDLR, comparada amb E3, s'associa, paradoxalment, a nivells majors d'LDLc i menors de TG circulant. Això és degut a l'accelerada captació d'LDL que incrementa la concentració intracel·lular d'LDL, fa disminuir l'expressió hepàtica d'LDLR i, consegüentment, disminueix la unió LDLR-LDL i augmenta l'LDL plasmàtic. El descens dels TG circulants es troba explicat per la preferència d'unió d'E4 per partícules riques en TG, fet que en disminueix els nivells plasmàtics.
- L'al·lel E2 (Cys112 i Cys158) presenta la freqüència més baixa de tots tres al·lels (3-12%) en població general. De manera contrària a E4, E2 presenta menor afinitat per LDLR (98-99 %), LRP i HSPG (30-50 %) respecte d'E3 (17), i pels mecanismes explicats



en E4, aquesta isoforma es troba associada a nivells més baixos d'LDLc i més alts de TG.

### I.III. METABOLISME ENDOGEN

Els lípids d'origen endogen se sintetitzen al fetge. Al fetge s'emmagatzema glicerol, àcids grassos i colesterol provinent de teixits perifèrics (transport revers, transportats per les LR o les HDL) i de teixit adipós (derivats de la seva lipòlisi i transportats per l'albumina, predominantment en dejú, en dietes riques en greixos o en estats patològics com la diabetis mellitus (DM)), i de la síntesi *de novo* que el mateix fetge porta a terme a partir de l'acetil Co-A. Els hepatòcits són els encarregats d'emmagatzemar aquests lípids i transformar-los segons les necessitats de l'organisme. Les seves funcions principals són: 1) la síntesi *de novo* dels TG a partir dels glicerols i àcids grassos emmagatzemats, 2) la síntesi d'àcids biliars a partir del colesterol i 3) la síntesi de les *very low density lipoproteins* (VLDL).

La síntesi de les **VLDL** és un procés molt semblant a la dels quilomicrons (figura 3). Igual que els quilomicrons, aquestes partícules contenen, bàsicament, TG, però d'origen endogen, i amb una composició d'apos: E, CI, CII, CIII i B100. Tot i la semblança en composició amb els quilomicrons, les VLDL són, generalment, de

## - INTRODUCCIÓ -

mida més petita. Un cop són alliberades a la circulació, també poden patir un canvi continu en mida i composició en interaccionar amb altres lipoproteïnes, com les HDL, amb les quals intercanvien colesterol i apos (apoE i apoCs) mitjançant CETP, i enzims com l'LPL; a més les poden captar receptors hepàtics que reconeixen tant apoE (LDLR, LRP, HSPG i VLDLR) com apoB100 (LDLR). La hidròlisi que duu a terme l'LPL dels TG del nucli apolar de les VLDL i el retorn de les apoC i els fosfolípids a HDL donen lloc a les VLDL romanents, anomenades *intermediate density lipoproteins* (IDL), que explicarem amb més detall més endavant. Breument, els receptors hepàtics específics poden reconèixer aquestes lipoproteïnes, gràcies a l'apoE, i eliminar-les del corrent sanguini, o l'HL les pot hidrolitzar. L'HL forma part de la família de les lipases, juntament amb LPL i l'EL, i es localitza al fetge, tant als hepatòcits com a les cèl·lules endotelials sinusoïdals, on s'uneix a l'HSPG per la hidròlisi de TG continguts en IDL, però també LDL i HDL, i consegüent alliberació de glicerol i els àcids grassos. Tant el dèficit com un increment en l'activitat d'aquest enzim poden originar canvis en les densitats i mides del conjunt de lipoproteïnes (19). Aquesta modificació en les IDL dóna lloc a les **LDL** amb alt contingut en colesterol. Les LDL són, essencialment, d'origen plasmàtic, però el fetge també les pot sintetitzar (20,21). En les LDL es transporta la

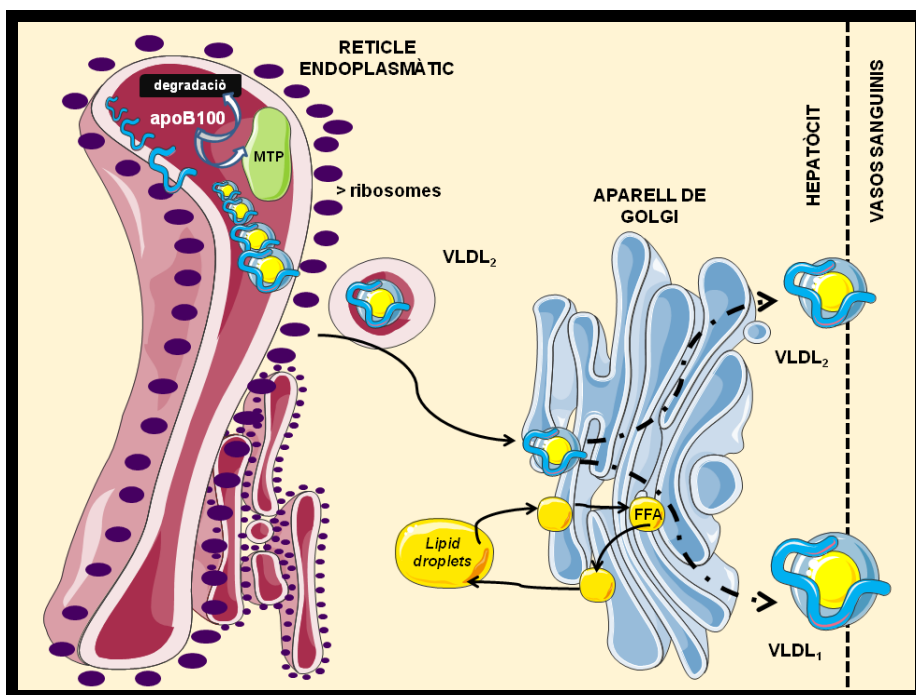


major part del colesterol en circulació, perquè, per bé que són més petites i denses, es troben, bàsicament, compostes de colesterol èsters i una molècula d'apoB100. La vida mitjana d'aquestes lipoproteïnes és de 2-3 dies. Són eliminades de circulació mitjançant **LDLR**: glicoproteïna transmembranal localitzada, principalment, a la superfície cel·lular dels hepatòcits, tot i que es pot trobar en totes les cèl·lules (menys els eritròcits) que controlen els nivells plasmàtics de colesterol captant (per un procés d'endocitosi) i catabolitzant lipoproteïnes que contenen apoB100 (present en les LDL) i apoE (present en quilomicrons, VLDL, IDL i HDL). El receptor, un cop finalitzat el procés, es recicla en la membrana plasmàtica. L'expressió transcripcional d'LDLR es regula segons els nivells intracel·lulars de colesterol lliure; és a dir, com més colesterol intracel·lular menys expressió d'LDLR; i el seu catabolisme mitjançant l'enzim **PCSK9** (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*), que s'uneix a LDLR i promou la seva degradació lisosomal (22). Mutacions en els gens d'LDLR i/o PCSK9 donen lloc a la hipercolesterolèmia familiar. L'heterozigosi de mutacions en el gen de l'LDLR expressa la meitat dels receptors funcionals (1 en 500 individus) i l'homozigosi n'expressa molt pocs o els que expressa no són funcionals (1 en 10<sup>6</sup> individus) (23). El procés del catabolisme de les LDL es dona, principalment, al fetge (l'excés del colesterol es



## - INTRODUCCIÓ -

transforma en àcids biliars i se secreta a la bilis), però d'altres components lipídics es catabolitzen via intestí o s'utilitzen en la síntesis de les hormones sexuals, per a la formació de les membranes cel·lulars i per a macròfags.



**Figura 3.** Formació de les VLDL. Adaptat d'Adiels et al. (18). El procés s'inicia al reticle endoplasmàtic amb la síntesi d'apoB100, que pot ser enriquida amb lípids per MTP o bé degradada. Posteriorment, a l'aparell de Golgi es pot transformar en VLDL<sub>1</sub> si les concentracions d'FFA intracel·lulars són altes. apoB100: apolipoproteïna B100, FFA: àcid grassos lliures (*free fatty acid*), MTP: *microsomal triglyceride transfer protein*, VLDL: *very low density lipoprotein*. Composició d'imatges extretes i adaptades de [www.servier.com/Powerpoint-image-bank](http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank)



La **lipoproteïna (a)** (Lp(a)) és una forma d'LDL modificada al fetge per l'addició covalent de l'apo(a) a l'apoB100 (24,25). Aquesta apo se sintetitza al fetge de manera independent a l'apoB. Lp(a) és una lipoproteïna altament glicosilada (28% del seu pes) i la composició lipídica és, bàsicament, d'èsters de colesterol, tot i que en estat postprandial trobem altes concentracions de TG. Les concentracions plasmàtiques d'aquesta partícula estan fortament condicionades per factors genètics, però es considera que diferents condicions fisiològiques o patològiques poden variar-ne un 10% la concentració. S'han suggerit diverses vies d'eliminació, entre les quals trobem les mateixes de l'LDL, la via del receptor *scavenger* SR-BI i la captació per macròfags, però cap d'aquestes sembla ser-ne la principal (26).

El fetge i els òrgans sintetitzadors d'hormones esteroides són els únics teixits capaços de reutilitzar el colesterol sobrant, la resta de teixits de l'organisme no poden fer-ho. Per tant, és necessari el transport del colesterol de teixit perifèric al fetge, l'anomenat **transport revers del colesterol**.

L'**HDL** és la lipoproteïna encarregada de dur a terme aquest transport. La composició d'aquest tipus de lipoproteïnes és molt heterogènia, i comprèn un ampli rang de subfraccions que difereixen en mida, densitat i composició d'apos i lípids (27). Aquestes

## - INTRODUCCIÓ -

partícules estan compostes, bàsicament, d'un nucli d'èsters de colesterol i petites quantitats de TG. Les proteïnes representen >30% del seu pes, sent la majoritària l'**apoA1**, que representa un 70% de la proteïna total, se sintetitza al fetge i a l'intestí prim i presenta concentracions plasmàtiques abundants 1.0-1.5 mg/dL (4). Altres apos importants serien l'apoAII (20%) i, en menor quantitat, altres apos, com l'apoE (<10%). Les HDL també són portadores d'enzims implicats en el metabolisme lipídic, com l'LCAT o les paraoxonases.

La síntesi de les HDL comença amb la formació de les HDL naixents (pre $\beta$ HDL), que són complexos discoïdals de fosfolípids amb migració electroforètica pre $\beta$  i apoA1, tot i que altres apos, com apoE i apoAIV, poden ser-hi també presents. Aquestes HDL les secreten el fetge i l'intestí prim en la circulació, però també es poden formar a partir de material alliberat durant la lipòlisi de les VLDL o els quilomicrons (fosfolípids i apos solubles) en circulació.

Les partícules pre $\beta$ HDL tenen una alta capacitat de capturar el colesterol dels teixits perifèrics (com ara les artèries) i dels macròfags. Actualment, es proposen dues hipòtesis que expliquen el mecanisme responsable de la transferència del colesterol de les cèl·lules a les HDL:



## - INTRODUCCIÓ -

- Per difusió: Les molècules de colesterol s'alliberen de la membrana cel·lular i s'incorporen a les naixents HDL sense la necessitat de la interacció amb receptors específics.
- Per interacció de les apoA1 de pre $\beta$ HDL amb receptors de la superfície cel·lular: La interacció indueix un senyal intracel·lular que produeix la translocació del colesterol intracel·lular a la membrana plasmàtica, on les pre $\beta$ HDL el capten.

Actualment es creu que ambdós processos podrien coexistir i dependria de la cèl·lula implicada que es dugués a terme l'un o l'altre.

L'enriquiment lipídic de les pre $\beta$ HDL es duu a terme gràcies als transportadors de membrana **ABCA1** (*ATP-binding cassette sub-family A member 1*) i **ABCG1** (*ATP-binding cassette sub-family G member 1*) expressats a la superfície de les cèl·lules, com els macròfags (28). Dèficits en ABCA1 (malaltia de Tangier) no permeten la formació d'HDL<sub>3</sub> ni HDL<sub>2</sub> (figura 4), i donen lloc a una única presència de pre $\beta$ HDL (29); aquests canvis en el metabolisme de les HDL provoquen baixos nivells d'HDLc amb acumulació de colesterol en teixits perifèrics i arteriosclerosi prematura (28).

El colesterol transferit a les HDL naixents és capturat i l'**LCAT**, enzim unit a la superfície d'HDL i activat per apoA1, ràpidament l'esterifica. El colesterol esterificat passa al nucli de la partícula gràcies a la

## - INTRODUCCIÓ -

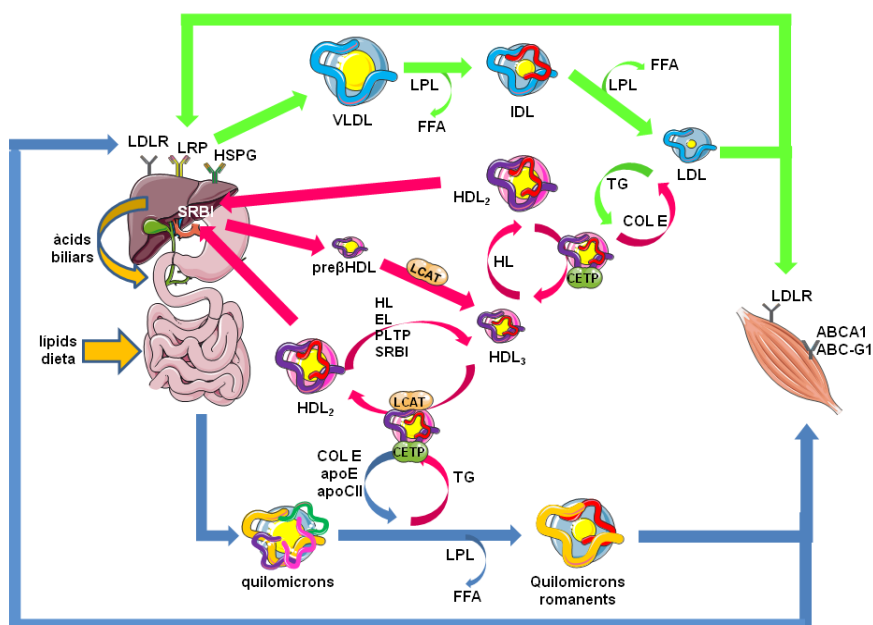
seva hidrofobicitat. En aquest moment del procés, la partícula comença a agafar forma esfèrica, s'engrandeix i es transforma en HDL<sub>3</sub> i, subsegüentment, en HDL<sub>2</sub> (acció reversible gràcies a CETP). Aquestes partícules poden interaccionar amb la proteïna ABCG1 i promoure acumulacions intracel·lulars majors que les dels macròfags (30).

Un cop en circulació, les HDL, de la mateixa manera que les altres lipoproteïnes, sofreixen modificacions en mida i composició com a conseqüència de la seva interacció amb diferents enzims. Com s'ha comentat anteriorment, l'HDL és modificada per la CETP, que varia la seva composició en TG i èsters de colesterol, però, a més a més, recentment s'ha descrit un nou membre de la família de les lipases, l'**EL**, que també sembla tenir un paper en el remodelatge de partícules HDL. Sintetitzada i localitzada exclusivament a les cèl·lules endotelials, i homòloga d'LPL (45%) i HL (41%), l'expressió d'aquesta nova lipasa, amb activitat fosfolipasa A1, correlaciona inversament amb els nivells circulants d'HDLc (31,32).

El destí dels èsters de colesterol de les HDL varia. Els receptors hepàtics, SRBI o receptors d'apoE poden reconèixer directament l'HDL; i un cop internalitzats, es pot utilitzar el colesterol per a l'assemblatge de lipoproteïnes, com a substrat per a la síntesi dels àcids biliars o secretat directament a la bilis. En aquest cas, en no



haver-hi captació de partícula, l'HDL es pot reciclar a circulació per començar de nou el procés de captació de colesterol. Una altra opció és que el colesterol de les HDL es capti de manera indirecta, per LRP, gràcies a l'acció de CETP, que transfereix el contingut en colesterol de les HDL a altres lipoproteïnes que contenen apoB, en circulació.



**Figura 4.** Esquema general del metabolisme de les lipoproteïnes: metabolisme endogen (fletxes verdes), metabolisme exogen (fletxes blaves), transport revers del colesterol (fletxes roses). ABCA1: ATP-binding cassette sub-family A member 1, ABCG1: ATP-binding cassette sub-family

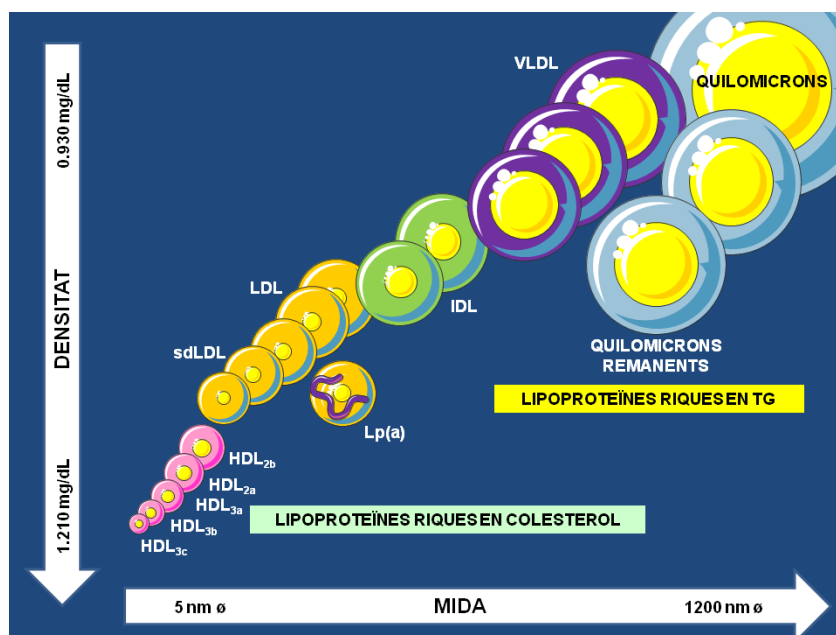
## - INTRODUCCIÓ -

G member 1, apoE: apolipoproteïna E, apoCII: apolipoproteïna CII, CETP: *cholesterol ester transfer protein*, COL E: colesterol esterificat, EL: lipasa endotelial, FFA: àcids grassos lliures, HDL: *high density lipoprotein*, HL: lipasa hepàtica, HSPG: heparà sulfat proteoglicans, IDL: *intermediate density lipoprotein*, LCAT: *lecithin cholesterol acyl-transferase*, LDL: *low density lipoprotein*, LDLR: receptors de l'LDL, LRP: proteïna relacionada amb LDLR, LPL: lipoproteïna lipasa, PLTP: *phospholipid transfer protein*, TG: triglicèrids, VLDL: *very low density lipoprotein*. Composició d'imatges extretes i adaptades de [www.servier.com/Powerpoint-image-bank](http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank)



## II. DETERMINACIÓ DE LES LIPOPROTEÏNES

Tot i la classificació que s'ha donat fins ara de les lipoproteïnes, el pool de lipoproteïnes que hi ha en circulació comprèn un grup altament heterogeni de partícules, molt més complex que el descrit fins ara, que difereixen en mida, càrrega, composició i funció fisiològica (figura 5).



**Figura 5.** Distribució de lipoproteïnes segons densitat i mida. HDL: *high density lipoprotein*, IDL: *intermediate density lipoprotein*, LDL: *low density lipoprotein*, Lp(a): Lipoproteïna (a), TG: triglicèrids, sdLDL: *small density LDL*, VLDL: *very low density lipoprotein*. Composició d'imatges extremes i adaptades de [www.servier.com/Powerpoint-image-bank](http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank)



## - INTRODUCCIÓ -

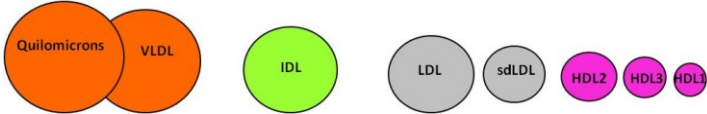
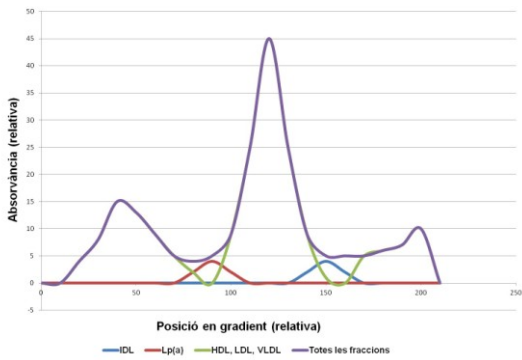
Les lipoproteïnes es troben compreses en múltiples subclasses que poden ser diferenciades d'acord amb les seves propietats fisicoquímiques. En la pràctica clínica, es quantifiquen les LDL i les HDL amb el mesurament del colesterol que transporten aquestes lipoproteïnes, normalment, mitjançant mètodes enzimàtics convencionals directament del plasma o de les lipoproteïnes d'interès no precipitades (33); també, en el cas de les LDL, es pot estimar mitjançant la fórmula de Friedewald. Però, realment, en aquest tipus de quantificació de lipoproteïnes, tant en les LDL com en les HDL, no es diferencia un pool heterogeni de lipoproteïnes que difereixin en mida, densitat i composició (34,35).

D'altra banda, hi ha altres metodologies, més utilitzades en recerca que en la pràctica clínica, per poder separar les diferents fraccions lipoproteiques, aprofitant les diferents propietats que li confereixen els seus components. En destaquem algunes en la taula 2. Una dificultat derivada de la varietat de les tècniques que hi ha és una manca d'estandardització en la separació de les subclasses que, en alguns casos, pot generar diferències en les dades obtingudes. En el cas de les HDL, se sap que presenten diferents característiques segons la tècnica amb què s'han obtingut, i per exemple les HDL amb migració electroforètica  $\alpha$  contenen tant HDL<sub>2</sub>, de mida més gran, com HDL<sub>3</sub>, de mida més petita, mentre que l'HDL preß només



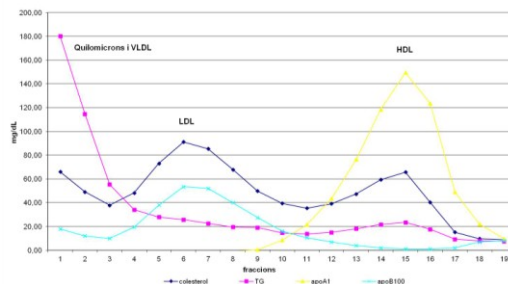
conté HDL petites i denses (36). Cal, doncs, tenir en compte aquest fet en l'observació de resultats.

**Taula 2.** Tècniques de determinació de lipoproteïnes. (\*) Explicats amb més detall posteriorment.

Tècnica	Característiques
Ultracentrifugació*	<p>La ultracentrifugació convencional separa segons la <b>flotabilitat</b> de les lipoproteïnes en <b>gradient de concentració salina</b>.</p> <p>a) Convencional</p>  <p><b>Figura 6.</b> Adaptació de William PT et al. (37). HDL: <i>high density lipoprotein</i>, IDL: <i>intermediate density lipoprotein</i>, LDL: <i>low density lipoprotein</i>, sdLDL: <i>small density LDL</i>, VLDL: <i>very low density lipoprotein</i>.</p> <p>b) VAP-II (<i>vertical auto profile ultracentrifugation</i>)</p>  <p><b>Figura 7.</b> Adaptació de Kulkarni et al. (38). HDL: <i>high density lipoprotein</i>, IDL: <i>intermediate density lipoprotein</i>, LDL: <i>low density lipoprotein</i>, Lp(a): Lipoproteïna (a), sdLDL: <i>small density LDL</i>, VLDL: <i>very low density lipoprotein</i>.</p>

Ultracentrifugació\*

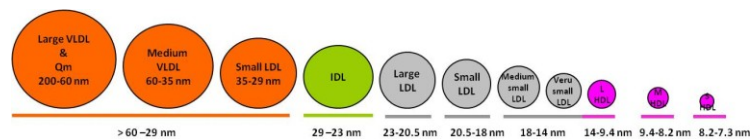
Utilitzant un gradient de concentració d'iodixanol, les lipoproteïnes se separen de manera més estratificada segons la seva **flotabilitat** en aquest compost químic.



**Figura 8.** Perfil obtingut per gradient d'iodixanol en pool d'individus normolipèmics. HDL: *high density lipoprotein*, LDL: *low density lipoprotein*, VLDL: *very low density lipoprotein*.

Ressonància magnètica nuclear (RMN)\*

L'RMN es basa en la captació del senyal que emeten els grups metil dels lípids que componen cada lipoproteïna, i permet determinar el nombre i la mida de les lipoproteïnes que hi ha en una mostra.



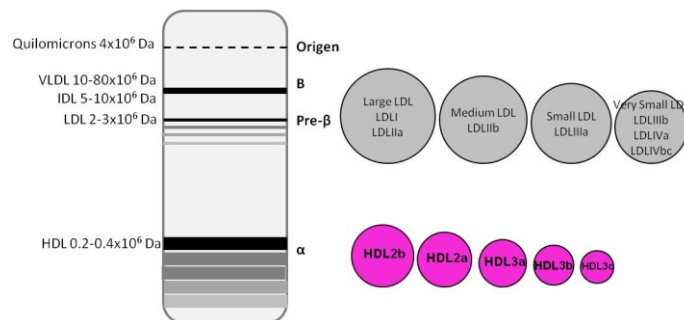
**Figura 9.** Adaptació de William PT et al. (37). HDL: *high density lipoprotein*, IDL: *intermediate density lipoprotein*, LDL: *low density lipoprotein*, VLDL: *very low density lipoprotein*.

Electroforesi

L'electroforesi és una tècnica que es basa en la mobilitat de les molècules en un camp elèctric per a la seva separació segons la **forma**, la **mida** o el **punt isoelèctric**. L'electroforesi de gradient de gel (2-16% poliacrilamida) no desnaturalitzant (*gradient gel electrophoresis*, GGE) (34,39,40) distingeix segons el pes molecular de les lipoproteïnes; i com a resultat obtenim una banda estàtica i tres bandes mòbils corresponents a la mobilitat de la  $\beta$ -globulina, la pre- $\beta$ -globulina i la  $\alpha$ -globulina (figura 10).



En combinació amb la ultracentrifugació, aquesta tècnica també permet obtenir subfraccions lipoproteïques. Tot i el reduït cost necessari per portar a terme aquesta tècnica, i la seva simplicitat, el mateix procés electroforètic pot canviar aquells aspectes més qualitius de les lipoproteïnes, com la conformació de les seves proteïnes, i no és possible l'obtenció de les diferents fraccions lipoproteïques per anàlisis posteriors.



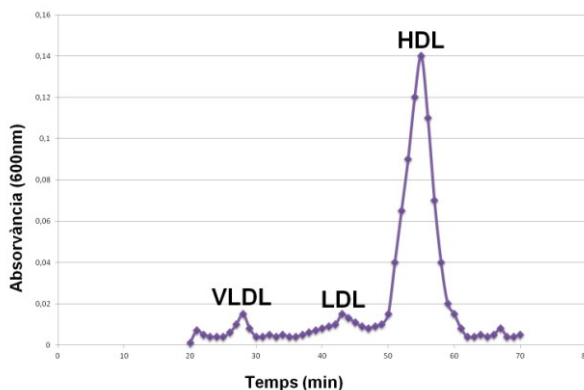
**Figura 10.** Adaptació de William PT et al. (37). HDL: *high density lipoprotein*, IDL: *intermediate density lipoprotein*, LDL: *low density lipoprotein*, VLDL: *very low density lipoprotein*.

Cromatografia

Trobem diferents variacions en la tècnica cromatogràfica aplicada a la separació de lipoproteïnes, com l'FPLC (*fast protein liquid chromatography*), que separa les lipoproteïnes per mida (41), o la cromatografia per **intercanvi iònic** (42). Bàsicament, la mostra passa a través del gel i els seus components elueixen a temps diferents segons la seva massa molecular o càrrega. Tant la ultracentrifugació com l'electroforesi són tècniques que poden alterar la conformació de les proteïnes components en les lipoproteïnes. En canvi, aquesta metodologia, en no sotmetre la mostra a gradients de sal ni a altes velocitats de centrifugació, conserva millor l'estructura i l'associació de les proteïnes. Un altre avantatge és el petit volum de mostra requerida. De la mateixa manera que en l'electroforesi, poden utilitzar-se en combinació amb la ultracentrifugació i així obtenir subfraccions lipoproteïques. D'altra banda, és una tècnica tediosa i necessita un bon manteniment perquè les condicions de les columnes es mantinguin.

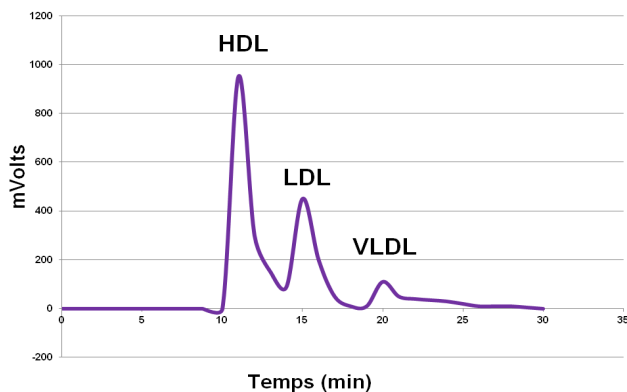
- INTRODUCCIÓ -

a) FPLC



**Figura 11.** Adaptació d'Ordovas et al. (41). HDL: *high density lipoprotein*, LDL: *low density lipoprotein*, VLDL: *very low density lipoprotein*.

b) Intercanvi iònic



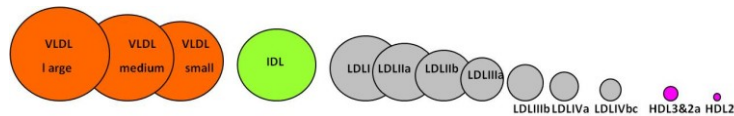
**Figura 12.** Adaptació de Neyer et al. (43). HDL: *high density lipoprotein*, LDL: *low density lipoprotein*, VLDL: *very low density lipoprotein*.

Mobilitat iònica

Desenvolupada recentment, la mobilitat elèctrica diferencial de fase gas, coneguda com a mobilitat iònica, es basa en el principi que qualsevol partícula amb determinada càrrega i mida es comporta d'una manera previsible en ser transportada en un flux laminar



d'aire subjecte en un camp elèctric (44). De la mateixa manera que FPLC, aquesta requereix poc volum de mostra (5  $\mu$ L) i les proteïnes no són destruïdes ni dissociades de les partícules lipoproteïques. A causa del seu recent desenvolupament, calen més estudis per a la validació de la tècnica (45,46).



**Figura 13.** Adaptació de William PT et al. (37). HDL: *high density lipoprotein*, IDL: *intermediate density lipoprotein*, LDL: *low density lipoprotein*, VLDL: *very low density lipoprotein*.

## II.I. ULTRACENTRIFUGACIÓ

La **ultracentrifugació convencional** es considera el mètode de referència per a la separació de lipoproteïnes, perquè va ser la primera tècnica aplicada per a la descripció de les diferents fraccions lipoproteïques, i se'n deriva la nomenclatura de les lipoproteïnes (47). La caracterització de les lipoproteïnes es basa en la flotabilitat de les partícules en diferents rangs de solucions amb altes concentracions de sal després de sotmetre-les a ultracentrifugació (vegeu annex I). Aquests rangs (Svedberg *flotation rates*:  $S_f$  i  $F_{1,2}$ ) determinaven la mida, la forma i la densitat hidratada de les partícules lipoproteïques (taula 3).

- INTRODUCCIÓ -

**Taula 3.** Característiques de les fraccions obtingudes per ultracentrifugació en gradient salí.

Fracció	Nomenclatura	Densitat (g/mL)	Subfraccions	
			Fracció	Nomenclatura
F <sub>1,2</sub>	HDL	1.063-1.210	F <sub>1,2</sub> 0-3.5	HDL3
			F <sub>1,2</sub> 3.5-9	HDL2
			F <sub>1,2</sub> 9-20	HDL1
Sf° 0-12	LDL	1.019-1.063	Sf° 0-7	sdLDL
			Sf° 7-12	LDL
Sf° 12-20	IDL	1.006-1.019		
Sf° 20-100	VLDL	0.93-1.006		
Sf° 100-400	Quilomicrons	< 0.93		

HDL: *High density lipoprotein*; IDL: *Intermediate density lipoprotein*; LDL: *Low density lipoprotein*; sdLDL: LDL petites i denses; VLDL: *Very low density lipoprotein*.

Mitjançant la ultracentrifugació convencional de rutina s'obté una molt bona separació de cinc fraccions de lipoproteïnes, i se n'arriben a obtenir fins a vuit si es determinen les subfraccions. Tot i ser una tècnica molt robusta i fiable, el volum de mostra necessari (2 mL), la velocitat (96 h) i la laboriositat en l'obtenció de les lipoproteïnes han motivat el desenvolupament de variants en la tècnica. La **VAP-II**



(*vertical auto profile ultracentrifugation*) (38), n'és una d'aquestes, perquè, de la mateixa manera que la ultracentrifugació convencional, aquella determina les lipoproteïnes per la seva flotabilitat en concentració salina, però amb la diferència que requereix poca mostra (50 µL), un sol gradient de densitat i un únic spin de centrifugació (47 min) per a l'obtenció de les lipoproteïnes en un flux continu. Aquest flux se sotmet a una anàlisi enzimàtica de colesterol que fa un autoanalitzador, per a l'obtenció d'un perfil (figura 7). D'aquesta manera s'obté un perfil més estratificat de les lipoproteïnes que en la ultracentrifugació convencional. Tot i la velocitat del mètode i l'obtenció de més fraccions lipoproteiques, cal tenir en compte que, en ser un gradient salí, pot alterar aquells aspectes més qualitius de les lipoproteïnes, motiu pel qual cal dialitzar les mostres abans d'analitzar-les. Aquesta diàlisi no és necessària en el cas de la ultracentrifugació per **gradient d'iodixanol** (48,49). De la mateixa manera que amb VAP-II, tan sols cal un sol gradient de densitat i un sol spin de centrifugació, i obtenim també un gradient que s'analitza de manera contínua mitjançant un autoanalitzador (vegeu annex II). En aquest cas, però, encara que el temps de centrifugació és superior (24 h) i el volum de mostra també (2mL), la variació respecte de la ultracentrifugació convencional és mínima, ja que només cal crear un gradient de



## - INTRODUCCIÓ -

densitat amb iodixanol (20, 12 i 9% iodixanol) en comptes de salí, al qual cal fer ajustaments de densitat i diàlisi com s'ha comentat abans. Es recuperen 21 fraccions, en un flux continu des del fons de cada tub, que un autoanalitzador posteriorment analitza enzimàticament. D'aquesta manera obtenim un rang molt més ampli de fraccions, la composició de les quals es pot determinar fàcilment, i es poden observar canvis de densitats en les lipoproteïnes en poder ser detectats desplaçaments de pics en el perfil obtingut.

## II.II. RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR

L'última tècnica desenvolupada per a la caracterització de les diferents subclasses de lipoproteïnes és la ressonància magnètica nuclear (RMN), que es basa en la deconvolució matemàtica dels diversos senyals de ressonància magnètica donats pels grups metils dels diferents lípids, l'amplitud dels quals és directament proporcional al nombre de partícules que hi ha en la mostra, i és independent de la variació en la composició lipídica (50–53). Abans del desenvolupament d'aquesta tècnica, la determinació del nombre de partícules només era possible en la quantificació d'apoB en aquelles lipoproteïnes que la contenen (una apoB per lipoproteïna). D'un volum mínim de 500µL de mostra, podem obtenir



- INTRODUCCIÓ -

el nombre de partícules de fins a 11 subclasses de lipoproteïnes: 3 subclasses de partícules VLDL (VLDL-P), 1 subclasse de partícules IDL (IDL-P), 4 subclasses de partícules LDL (LDL-P) i 3 subclasses de partícules HDL (HDL-P) (figura 9), que difereixen en la mesura del diàmetre de la partícula. Aquesta tècnica destaca per l'alta sensibilitat, la fàcil manipulació de mostra, la velocitat en l'obtenció de resultats i la possibilitat de determinar el nombre de lipoproteïnes i no el seu contingut en colesterol o TG; però té una limitació: és una tècnica analítica i no preparativa.

### III. LIPOPROTEÏNES ROMANENTS

---

Com hem pogut veure fins ara, el metabolisme de les lipoproteïnes és molt dinàmic, perquè, gràcies a l'acció d'enzims i a la interacció entre partícules, es generen lipoproteïnes de diferent composició i mida. D'aquestes modificacions, en sorgeixen les LR, formades a partir de lipoproteïnes modificades per enzims localitzats a la superfície de les cèl·lules endotelials, com l'LPL (54), o al fetge, com l'HL (19); i transformades en lipoproteïnes més difícils d'eliminar de circulació.

L'eliminació de les LR és un factor clau del seu metabolisme, que es porta a terme, principalment, a nivell hepàtic mitjançant receptors específics. No obstant això, la seva captació també la poden mediar altres tipus cel·lulars, com cèl·lules de múscul esquelètic, cor, cervell i teixit adipós, gràcies al VLDLR (11), que reconeix apoE sense discriminar per isoformes (55) i que té com a principal lligand les IDL (lipoproteïnes romanents de les VLDL) (56); o cèl·lules endotelials, gràcies a un procés anomenat transcitosi, que permet a les lipoproteïnes de fins a 70 nm de diàmetre, com les IDL (18-25 nm), introduir-se a la cèl·lula a través de vesícules (57). D'altra banda, els principals receptors hepàtics de les LR són l'LDLR, l'LRP i l'HSPG



(15,58). Ratolins triple mutants per aquests tres receptors mostren nivells elevats d'LR (58), per tant, VLDLR, tot i la seva especificitat per les IDL, no representa una peça clau per l'eliminació de les LR. LDLR és el receptor més conegut i estudiat, ja que va ser el primer en ser determinat (59,60). Atès que tant ratolins, conills i humans deficients en l'LDLR no presenten acumulacions de LR en circulació (61–63), i que l'LDLR reconeix tant l'apoB com l'apoE, sembla ser que l'LDLR té la seva funció principal en el metabolisme de les LDL, i no pas en el de les LR. Com s'ha comentat anteriorment, és ben conegut que LDLR presenta menor afinitat per la isoforma E2 de l'apoE i major per l'E4; en canvi, l'HSPG, que pot actuar tant formant complex amb l'LRP com de manera independent (58,64), representa una alternativa a l'LDLR, atès que la seva capacitat d'unió a l'apoE2 es conserva fins a un 50-70% respecte d'E3, a diferència de l'LDLR, on es rebaixa a l'1-2% (17). A més a més, trobem variants de l'apoE amb defectes d'unió a l'HSPG, però no a l'LDLR, que sí que donen lloc a acumulació d'LR (17). Per tant, aquest HSPG hepàtic format per una proteïna, normalment la syndecan-1, i 3 cadenes d'heparà sulfat unides, sembla ser un element clau en l'eliminació de les LR de circulació.

Tradicionalment, les LR s'han considerat lipoproteïnes productes de la hidròlisi dels quilomicrons i VLDL, però actualment se sap que són

## - INTRODUCCIÓ -

un ampli grup de partícules altament heterogènies (24), tant d'origen exogen com endogen (65), que varien en mida, densitat, mobilitat electroforètica, composició química i reconeixement de receptors (66). Aquesta heterogeneïtat és deguda, sobretot, al fet que les LR es troben en diferents etapes del catabolisme lipoproteic, perquè són el resultat de la hidròlisi lipídica portada a terme pels enzims sobre les lipoproteïnes, cosa que dificulta la diferenciació de les seves precursors atesa la semblança en composició i mida, ja que el tret diferencial és, com hem comentat anteriorment, que romanen en circulació major temps. La determinació de les LR s'ha vist sempre condicionada per la metodologia emprada, atès que es tracta d'un grup de lipoproteïnes present en concentracions molt baixes. En la taula 4 es troben les diferents tècniques per la determinar i/o separar les LR.

La primera vegada que es van aïllar les LR va ser per ultracentrifugació convencional, on es va poder determinar el colesterol transportat pels romanents de les VLDL: **IDLc**. Aquesta fracció lipoproteica determinada per **densitat en gradient salí** es va caracteritzar per trobar-se enriquida en èsters de colesterol i apoEs, i reduïda en TG, fosfolípids, apoCs i apoAs (68). En pacients normolipèmics, la concentració normal d'IDLc és de 5 a 15 mg/dL (69,70); concentracions, sovint, per sota dels nivells de detecció de



les tècniques de laboratori convencionals. Per tant, en circumstàncies normals, del 3% al 10% del colesterol total plasmàtic es troba en les IDL, mentre que en pacients amb una acumulació significativa d'aquestes partícules, com són ara els pacients amb disbetalipoproteinèmia, caracteritzats per ser portadors de l'al·lel apoE2 en homozigosi, poden arribar a representar fins al 20% (71). Pacients amb hipercolesterolèmia familiar també tenen majors concentracions d'IDLc respecte dels subjectes control, tot i que no s'han descrit diferències entre heterozigots i homozigots (69). En individus normolipèmics, les IDL mesuren de 27.5 a 30 nm, contenen un 10-20% de TG, 40-50% de colesterol, 21% de fosfolípids i 18% de proteïna, de la qual el 90% és apoB100 (72). Cal tenir en compte, però, que aquesta fracció IDL, que s'ha obtingut mitjançant ultracentrifugació, conté partícules enriquides de colesterol i hidrolitzades en TG, i no inclou aquelles partícules romanents enriquides de TG, més grans i menys denses, no catabolitzades per complet, o més petites i denses.

Com s'ha comentat anteriorment, *a posteriori* de l'aparició de la ultracentrifugació, es van desenvolupar noves tècniques, com l'**electroforesi GGE** (73,74) (separació segons **mida**) o **en gel d'agarosa** (separació segons **càrrega**). En ambdues tècniques, es va determinar una banda de mobilitat més reduïda respecte de les

- INTRODUCCIÓ -

LDL corresponent a les LR. Les característiques bioquímiques d'aquesta banda mitjana, entre la VLDL i la LDL (75), presents en GGE, no es coneixen, però se sap que s'hi pot trobar IDLs,  $\beta$ -VLDL i Lp(a).

**Taula 4.** Criteris bioquímics per separar i quantificar LR. Adaptació de Cohn et al. (67)

Críteris de separació	Tècnica metodològica	Fracció romanent	Paràmetre
Densitat	Ultracentrifugació convencional	Colesterol IDL, comprès entre les densitats salines 1.006 g/mL i 1.019 g/mL; Sf <sup>0</sup> 12-20	IDLc
Densitat i càrrega	Electroforesi	Migració Pre- $\beta$ o $\beta$ ( $d < 1.006$ g/mL) en gel de poliacrilamida o agarosa	Pre- $\beta$ -VLDL o $\beta$ -VLDL
Mida	RMN	Nombre de partícules IDL	IDL-P
Immunespecificitat per les apolipoproteïnes	Cromatografia d'immunoafinitat	Concentració del colesterol de les lipoproteïnes eluïdes del gel cromatogràfic: lipoproteïnes que no han interaccionat amb els anticossos monoclonals apoAI i apoB presents en el gel	RLPc

IDL: *Intermediate density lipoprotein*; IDLc: colesterol transportat per les *intermediate density lipoprotein*; ID-PL: Número de partícules *intermediate density lipoprotein*; RLPc: colesterol transportat per les *remnant like lipoprotein*; VLDL: *Very low density lipoprotein*.



A més, si la fracció VLDL, obtinguda per ultracentrifugació, la sotmetem a una separació electroforètica en gel d'agarosa, podem separar LR amb flotabilitat VLDL segons la seva càrrega i obtindrem un conjunt heterogeni de VLDL i quilomicrons romanents. Aquestes partícules són més petites, amb menor contingut en TG i menys carregades negativament; és per això que tenen una menor mobilitat electroforètica comparada a la de les VLDL (73,76), que pot arribar a ser, fins i tot, la mateixa que la de les LDL, anomenades llavors  **$\beta$ -VLDL**. Aquestes partícules tenen un diàmetre de 33 a 38 nm (una mica més grans que les IDL obtingudes per ultracentrifugació), i són compostes per un 41% de TG, 26% de colesterol, 18% de fosfolípids i 15% de proteïna, de la qual, aproximadament el 60% és apoB100 o apoB48, 8% apoE, i la resta apoCs (77). Aquesta tècnica, però, determina les LR de manera qualitativa, més que no pas quantitativament, ja que la determinació de les bandes no deixa de ser subjectiva i tant el cost econòmic com la manipulació requerida és alta.

La determinació de certes **apos** circulants pot ser un paràmetre indicador d'LR. Trobem tres tipus d'apos interessants, atesa la seva relació amb les partícules romanents: l'apoE, l'apoCIII i l'apoB48. Com hem pogut veure, l'apoE té un paper molt important en el metabolisme lipídic, ja que participa en la conversió de les IDL en



## - INTRODUCCIÓ -

LDL, i actua com a lligand específic perquè el fetge pugui captar lipoproteïnes. Encara que no és un marcador específic de romanents, atès que també són presents en les VLDL, l'enriquiment amb apoE és una característica comuna en les LR determinades per diferents tècniques que s'han descrit fins ara. També, l'apoCIII, en inhibir els enzims LPL i HL, genera partícules poc catabolitzades que per al fetge són difícils d'eliminar, característica de les LR; d'aquesta manera, altes concentracions d'apoCIII es podrien relacionar amb major presència d'LR. Per últim, la quantificació no postprandial de l'apoB48, característica dels quilomicrons, pot ser d'interès per a la determinació dels romanents de quilomicrons que no han estat eliminats de circulació durant l'estat postprandial. La tècnica més comuna per determinar, quantitativament, aquestes apos és l'immunoabsorció lligada a enzims o ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*). D'aquesta manera, podem determinar la concentració de les apos, o la concentració de lipoproteïnes que contenen aquestes apos (78,79). Cap d'aquests paràmetres, però, poden considerar-se exclusius d'LR, perquè, al llarg del catabolisme de les partícules, aquestes tenen diferent composició d'apos que pot coincidir amb la de les partícules romanents, però no té per què determinar que restin en circulació.



Com s'ha comentat anteriorment, l'última tècnica desenvolupada per a la caracterització de les diferents subclasses de lipoproteïnes és l'**RMN**, basada en la captació del senyal que emeten els grups metil dels lípids que componen cada lipoproteïna, i que permet determinar el nombre de fins a 11 subclasses de lipoproteïnes diferents en mida i existents en una mostra (figura 9). Entre aquestes subclasses, trobem la IDL, i per tant mitjançant aquesta tècnica podem determinar el **nombre de partícules IDL (IDL-P)**.

Totes aquestes metodologies, però, no són específiques d'LR, tenen poca sensibilitat per determinar canvis en les seves concentracions i no es poden portar a terme en la rutina clínica atesa la seva laboriositat i el seu cost. El mètode de cromatografia d'immunoafinitat desenvolupat per Nakajima et al. (80) resol aquestes limitacions, i representa un mètode específic per determinar les LR. La cromatografia d'**immunoafinitat** és l'única tècnica específica per determinar LR (vegeu annex III). Aquesta tècnica determina les lipoproteïnes segons la seva composició d'apos en superfície, i està basada en la immunoafinitat de les apos per determinats anticossos monoclonals (80). Consta d'una columna de gel de Sepharose 4B, on es troben units els anticossos anti-apoB100 per captar les LDL i VLDL, i anti-apoAI, que reté al gel les HDL i els quilomicrons presents. La raó per la qual l'anticòs anti-

## - INTRODUCCIÓ -

apoB100 no reconeix les partícules romanents sembla ser que és la competència que hi ha entre l'apoB100 i l'apoE per l'anticòs, ja que l'apoB100 conté una seqüència d'aminoàcids de l'epítot homòloga a una regió amfipàtica helicoïdal de l'apoE. Aquesta tècnica requereix una quantitat molt petita de mostra (5µL) i permet determinar LR que quedarien fora de rang en altres tècniques. La fracció eluïda del gel conté les anomenades **remnant like lipoproteins (RLP)**, de les quals es determina el colesterol contingut (RLPc). Les característiques d'aquesta fracció no són ben conegudes; així, segons Nakajima et al. (80), es tracta, bàsicament, de quilomicrons i VLDL de mida gran amb enriquiment d'apoE (81), però en altres estudis se'n determinen mides que oscil·len de les VLDL a les HDL. Se sap que la fracció RLP no inclou les IDL (82), malgrat que s'ha vist que, en pacients amb DM o disbetalipoproteïnèmia, en la fracció RLP també es poden trobar partícules de la mida de les IDL (83,84). Per tant, sembla que dins d'aquesta fracció es troben lipoproteïnes amb característiques diferents. D'altra banda, la quantitat relativa de lípids i apos varia, considerablement, d'un individu a un altre, amb més contingut en TG i apoCIII, i menys apoE per partícula en hipertrigliceridèmics comparat amb normolipèmics (85). A títol orientatiu, les concentracions plasmàtiques del colesterol que



transporten les RLP en homes sans, entre 35 a 54 anys nord-americans, és de 5.9 mg/dL i de 4,6 mg/dL en dones (81).

Com veiem, cada tècnica de separació mesura les LR basant-se en les diferents propietats fisicoquímiques que posseeixen (resumit en la taula 4). Tanmateix, tots aquests paràmetres no poden considerar-se equivalents, perquè, com veiem, alguns representen partícules més grans i menys catabolitzades com les  $\beta$ -VLDL, mentre que d'altres reflecteixen partícules més petites i riques en colesterol com les IDL, o partícules enriquides amb apoE com les RLP. Per això és molt important una precisa definició d'aquestes quan en descrivim les característiques, les funcions i les accions.

## IV. DISLIPÈMIA ATERÒGENA

---

Les **dislipoproteïnèmies** són alteracions qualitatives i quantitatives del metabolisme lipídic i lipoproteic. Mentre que les qualitatives es caracteritzen per ser alteracions estructurals o de composició de les lipoproteïnes, en les quantitatives hi ha una disminució o augment de les seves concentracions respecte de les considerades normals (hipolipoproteïnèmies o hiperlipoproteïnèmies respectivament).

Aquestes alteracions poden tenir un origen genètic (dislipoproteïnèmies primàries) o ser conseqüència d'altres factors o malalties (dislipoproteïnèmies secundàries). Les principals **dislipoproteïnèmies primàries** són causa de defectes en: 1) el gen del receptor de l'LDL, de l'apoB o del PCSK9 (hipercolesterolèmia familiar), 2) el gen de l'apoE (disbetalipoproteïnèmia familiar, E2/E2), 3) el gen de l'LPL o l'apoCII (hiperquilomicronèmies) i 4) múltiples gens (hipercolesterolèmia poligènica i hipertrigliceridèmia familiar). A més, els factors que deriven en **dislipoproteïnèmies secundàries** són: 1) malalties com l'obesitat, la DM, el síndrome metabòlic, d'hipotiroïdisme i les malalties hepàtiques i renals, 2) relacionats amb l'estil de vida, com el sedentarisme i les dietes hipercalòriques



comunes en les societats actuals i 3) condicions fisiològiques, com l'embaràs o el consum de certs medicaments.

En aquest context, la **dislipèmia aterògena** explica aquelles alteracions en el metabolisme lipídic que donen lloc a un increment del risc per MCV, tot i presentar uns nivells d'LDL normals, i que solen presentar 1 de cada 6 pacients que són atesos en unitats de lípids a Espanya (86). Aquesta dislipèmia s'origina per un increment en els àcids grassos lliures circulants que s'associa a una disminució de la sensibilitat a la insulina (87). La menor sensibilitat a la insulina va lligada a la presència de teixit adipós visceral que és menys sensible a la insulina que el subcutani (88). El flux d'àcids grassos augmenta la síntesi hepàtica de TG, i es caracteritza per: 1) un increment en la síntesi de VLDL de mida més gran (VLDL<sub>1</sub>), donat un nucli amb major cúmul de TG (figura 3), que origina 2) nivells elevats d'LR i 3) sdLDL generades per l'acció de les CETP en les VLDL<sub>1</sub>, i 4) una disminució de la mida i el colesterol de les HDL. La concentració d'aquestes VLDL<sub>1</sub> està incrementada en individus amb obesitat abdominal o DM (89), individus que presenten aquest tipus de teixit adipós. La concentració de VLDL<sub>1</sub> determina, i en aquest cas, incrementa els nivells de TG circulants (90). L'increment del transport d'àcids grassos al fetge, a part d'estimular la síntesi de TG

## - INTRODUCCIÓ -

i VLDL, disminueix la degradació intracel·lular d'apoB, i n'augmenta la secreció i, consegüentment, la concentració extracel·lular.

A part d'una mida més gran, VLDL<sub>1</sub> presenta major proporció d'apoCIII que d'apoCII, fet que dificulta l'activació d'LPL. Com a conseqüència, té lloc una menor hidròlisi dels TG d'aquestes lipoproteïnes, i les partícules que se'n deriven les reconeixen amb menor afinitat els receptors LDLR i LRP, responsables de la seva eliminació. Aquest fet incrementa el temps de permanència de les lipoproteïnes en circulació, que, juntament amb l'acció d'HL i CETP, genera LR i sdLDL, més susceptibles a l'oxidació. A més, l'acció de CETP entre VLDL<sub>1</sub> i HDL fa que el contingut de colesterol de les HDL disminueixi, el que dona com a resultat l'enriquiment de les HDL amb TG, que les converteix en lipoproteïnes de ràpida eliminació, perquè 1) l'acció de l'HL en els TG forma HDL més petites, 2) la pèrdua d'apoAI durant la hidròlisi fa que l'HDL esdevingui inestable i/o 3) sota aquestes condicions l'activitat de l'LPL es veu reduïda, amb la qual cosa hi ha un dèficit en els components que formen les HDL. Això comporta que se sintetitzin menys partícules.

En resum, la dislipèmia aterògena genera partícules que, en condicions normals, no són abundants en circulació, com les LR i les



sdLDL, i no en genera d'altres que sí que són abundants, com les  
HDL.



## V. ARTERIOSCLEROSI

---

L'arteriosclerosi, sent la principal etiologia per a la majoria de malalties cardiovasculars (MCV), com són la malaltia arterial coronària (MAC), la isquèmia, l'aneurisma aòrtic, l'infart de miocardi o l'accident cerebrovascular (91,92), és un procés patològic de caràcter inflamatori i lipídic que afecta les grans artèries.

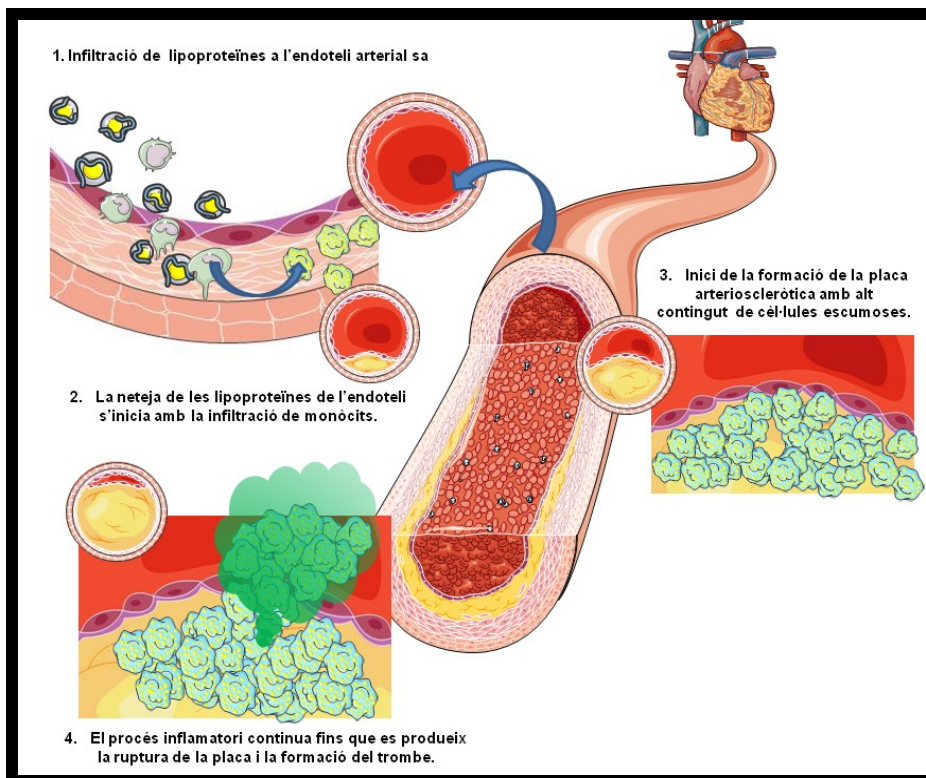
L'Organització Mundial de la Salut considera les malalties cardiovasculars la primera causa de mortalitat en el món. La mateixa organització estima que, l'any 2008, 17.3 milions de persones van morir com a conseqüència de les malalties cardiovasculars (un 25,6% del total), i calcula que, l'any 2030, fins a 23.6 milions de persones (un 36% més respecte del 2008) moriran com a conseqüència de l'MCV (93). A Catalunya, les MCV són també la primera causa de mort: 240,6 per cada 100.000 habitants (94), i representen un 12% dels prop de 980.000 ingressos o consultes hospitalàries que anualment es produeixen. La tendència de les darreres dècades en què aquesta malaltia afectava, majoritàriament, els països desenvolupats s'ha trencat, ja que s'observa, actualment, que fins al 80% de les morts tenen lloc en països pobres o països en vies de desenvolupament (95).



## V.I. PROCÉS PATOGENÈIC DE L'ARTERIOSCLEROSI

L'arteriosclerosi és un procés progressiu caracteritzat per la infiltració i l'acumulació a la paret vascular de lípids i components del sistema immunitari, la proliferació de cèl·lules del múscul llis i l'acumulació de components del teixit connectiu (figura 14). Aquest procés provoca un engruiximent i una pèrdua d'elasticitat de la paret dels vasos sanguinis, que pot donar lloc a lesions arterioscleròtiques. Encara que lesions avançades poden originar manifestacions clíniques com la isquèmia, resultat d'una progressiva oclusió de la llum vascular, la complicació clínica més important és una ruptura de la placa ateromatosa i la formació d'un trombe, que dona lloc a un infart de miocardi o accident cerebrovascular.

A l'inici de l'aparició de les lesions arterioscleròtiques, la permeabilitat, l'elasticitat i el gruix de la paret vascular pateixen alteracions motivades per la disfunció endotelial i la inflamació (97) causada per un increment del colesterol circulant. És, per tant, la disfunció endotelial el tret de sortida en l'inici del procés arterioscleròtic; és a dir, canvis en els mecanismes de control homeostàtic.



**Figura 14.** Procés etiotipic de l'arteriosclerosi. Composició d'imatges extreta de [www.servier.com/Powerpoint-image-bank](http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank) i adaptada de Libby et al. (96).

L'increment de l'expressió de molècules d'adhesió, citocines inflamatòries i factors protrombòtics, i de l'estrès oxidatiu, conjuntament amb una modulació anormal del to vascular, provoquen la retenció local de lipoproteïnes (LDL, Lp(a) i LR) en molècules adherides a la matriu extracel·lular de les cèl·lules endotelials, particularment els proteoglicans, que donen com a resultat un increment en la penetració de lípids a la paret arterial



(98). Aquestes lipoproteïnes retingudes sofreixen modificacions (agregació, lipòlisi i oxidació) que provoquen l'alliberament de fosfolípids i peròxids lipídics que activen la resposta inflamatòria en les cèl·lules circumdants (99). Aquest fet atreu diferents cèl·lules que es troben en circulació. En particular, els monòcits 1) entren al subendoteli, 2) es diferencien a macròfags, 3) activen l'expressió de receptors *scavenger* i *toll-like* per captar les lipoproteïnes retingudes i modificades, 4) es transformen en cèl·lules escumoses i 5) aquestes queden retingudes a la lesió en comptes de tornar a circulació. A més a més, les cèl·lules T, els mastòcits i altres cèl·lules inflamatòries s'incorporen a la lesió arterioscleròtica i, juntament amb els macròfags, contribueixen a aquesta resposta inflamatòria alterada. En les lesions ja establertes, es produeix un efecte *feedback* que amplifica l'augment de retenció de lipoproteïnes, ja que els receptors *scavenger* no estan controlats per *feedback* negatiu com l'LDLR, i això fa que el macròfag tingui una capacitat il·limitada d'acumular colesterol. Les cèl·lules musculars llises migren a la íntima i promouen la formació d'un tap de col·lagen i fibrinogen. A mesura que la lesió progressa, els macròfags moren, cosa que origina àrees necròtiques plenes de restes extracel·lulars, cristalls de colesterol, proteases i material procoagulant i protrombòtic. També, els receptors *toll-like* inicien una cascada de senyals dins dels

## - INTRODUCCIÓ -

macròfags que no han mort, cosa que fa que s'alliberi òxid nítric i enzims proteolítics que degraden la matriu i causen que la placa es desestabilitzi. En aquest punt del procés, les plaques poden erosionar-se o alliberar-se i donar lloc a un accident vascular trombòtic. En estadis inicials, el procés és reversible si es disminueixen les concentracions de lipoproteïnes que contenen apoB circulants en plasma. En estadis més avançats, els processos de retenció de les lipoproteïnes esdevenen més complexos i difícils de revertir (24).

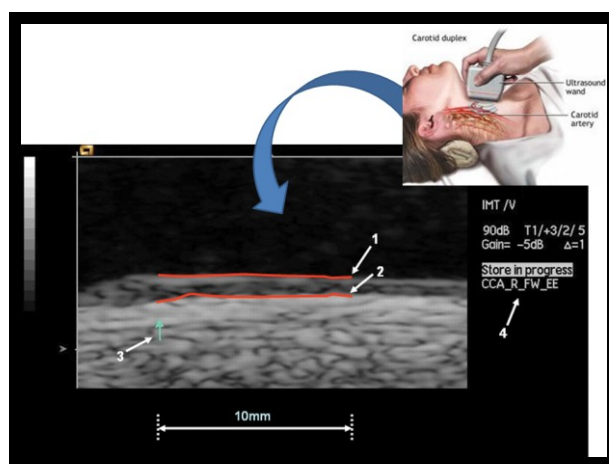
### V.II. ARTERIOSCLEROSI SUBCLÍNICA

L'avaluació clínica de l'arteriosclerosi és una eina que ajuda a estratificar el risc cardiovascular (100–106). D'aquesta manera, les tècniques d'imatge i de valoració de la funcionalitat de les artèries ens ajuden a una millor predicció del risc cardiovascular individual (107,108).

La determinació per ultrasons del **gruix íntima-mitjana (GIM) carotídia (GIMc)**, es basa en l'establiment de la distància entre la interfase llum-endoteli vascular i mitjana-adventícia, i és un mètode fiable, reproduïble i no invasiu per avaluar l'arteriosclerosi subclínica (109,110) (figura 15). El gruix de la íntima-mitjana augmenta a



mesura que una mateixa persona presenta factors de risc associats, com el tabaquisme, la hipertensió, la hipercolesterolèmia o la DM, entre d'altres (100). Les directrius epidemiològiques que tracten el risc de l'MCV en població general recomanen tant la valoració de la GIM com la presència de plaques en l'arteria carotídia (111).



**Figura 15.** Avaluació de l'arteriosclerosi subclínica mitjançant el mètode de GIM a l'artèria carotídia.

La placa carotídia es defineix entre un rang de GIM  $> 1.2-1.9$  mm, o un gruix focal major del 50% de l'àrea que l'envolta (112), tot i que no hi ha estandardització en la mesura. Per bé que se sap que la presència de placa és més determinant en reflectir un elevat risc cardiovascular (112,113), alguns estudis qüestionen que el GIM tingui eficàcia més enllà dels models SCORE i Framingham

## - INTRODUCCIÓ -

(114,115). En la pràctica clínica, es recomana GIM com a eina de cribratge d'arteriosclerosi subclínica en aquells individus amb risc cardiovascular moderat (101). Estudis clínics demostren que la determinació de GIM es relaciona de forma potent amb altres tècniques d'imatge que es poden utilitzar per avaluar l'arteriosclerosi subclínica com són l'RMN o la determinació de calci coronari.

### V.III. FACTORS DE RISC CARDIOVASCULAR

L'arteriosclerosi és una malaltia multifactorial on es veuen implicats tant factors genètics com ambientals. Els factors de risc cardiovascular determinen la probabilitat o el risc de tenir una MCV, i es relacionen amb un increment de la mortalitat cardiovascular.

Troben una sèrie de factors de risc **convencionals** que poden ser **modificables** o **no modificables**. Aquells que es poden modificar i provocar una disminució o un augment del risc són la hipertensió, la DM, la dislipèmia, l'obesitat, l'estil de vida sedentari i el tabaquisme. D'altra banda, aquells que no es poden modificar són l'edat, el gènere, la menopausa, la història personal d'accident cardiovascular, la història familiar d'MCV o els condicionants genètics. Paral·lelament, en els darrers temps estan sorgint factors de risc emergents o **no convencionals**, com poden ser la



determinació d'altres subclasses lipoproteiques, com les LR, la Lp(a) o les subclasses de les lipoproteïnes convencionals; malalties autoimmunes, com el lupus eritematós sistèmic (LES) o marcadors inflamatoris (homocisteïna, etc.), entre d'altres.

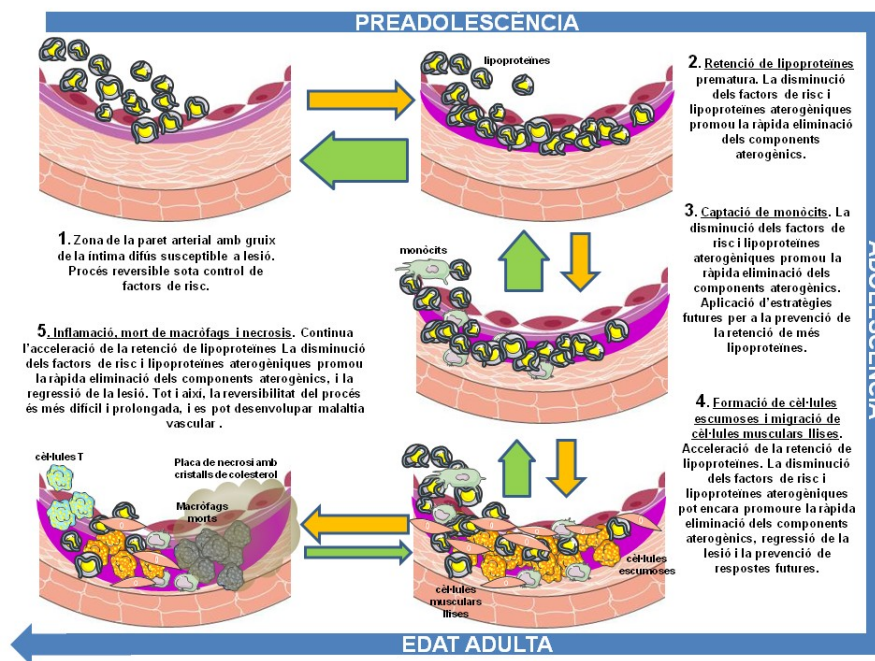
En la pràctica clínica, l'avaluació del risc cardiovascular es basa en càlculs sobre la presència de factors de risc convencionals, i fa referència a la probabilitat de tenir un accident cardiovascular major en els pròxims 10 anys de vida quan s'utilitzen les equacions de predicció del risc de Framingham (116), o de mortalitat als 10 anys quan s'utilitzen les equacions de predicció europees de l'Score (117). El control dels factors de risc cardiovascular es tradueix en una disminució significativa dels accidents cardiovasculars, i el 50% de les reduccions de mortalitat cardiovascular estan relacionades a canvis en els factors de risc (95).

És ben conegut que el principal factor de risc arterioscleròtic és l'**edat**. El procés arterioscleròtic s'inicia als primers anys de vida, i es desenvolupa al llarg de tota la vida (figura 16). Hi ha casos d'arteriosclerosi accelerada, com els nens amb hipercolesterolèmia familiar que dupliquen els nivells de colesterol en sang respecte als valors normals i desenvolupen, prematurament, malaltia coronària en edats molt primerenques (mitjana d'home heterozigot 45 anys i homozigot 2-10 anys) (118); o els pacients amb LES que en edats



- INTRODUCCIÓ -

joves presenten un risc arterioscleròtic x50 en relació amb la població general (119,120).



**Figura 16.** Evolució del procés arterioscleròtic amb l'edat. Adaptació de Tabas et al. (24)

Amb l'edat també es produeixen canvis en el perfil lipídic. L'increment de les necessitats energètiques durant l'adolescència genera una disminució dels TG circulants, com a conseqüència d'un increment en l'activitat LPL (121). D'altra banda, els nivells de colesterol total no varien dels trobats en adults (122). En població general, també s'observa un augment d'LDLc amb l'edat, tant en individus joves com en adults de mitjana edat (123–126), però, per



damunt de 65 anys, hi ha una reducció progressiva d'LDLc (127–130). El comportament de l'HDLc no queda clar, ja que trobem estudis on no hi ha variació amb l'edat (122,123,127) i d'altres on disminueix (125,126).

Els canvis en el perfil lipídic o **dislipèmies** també poden ser conseqüència altres factors, com la menopausa, la Diabètic Mellitus tipus 2 (DMT2), la resistència a la insulina, l'obesitat abdominal i el sedentarisme. Com hem vist, la dislipèmia pot afectar qualsevol paràmetre lipídic, però, des de la primera descripció de les subfraccions de lipoproteïnes mitjançant la ultracentrifugació (47), els dos principals paràmetres amb major associació amb el risc MCV arterioscleròtic es va constatar que eren LDLc i HDLc (positivament i negativament, respectivament). El control d'aquests paràmetres lipídics, mitjançant canvis en els estils de vida o fàrmacs, ha demostrat eficiència en la disminució del risc. L'evidència que la reducció d'LDLc en plasma redueix el risc MCV és inequívoca. Estudis epidemiològics i metanàlisis demostren que la reducció d'LDLc és clau en la prevenció d'MCV, i conclouen que la disminució de les concentracions de colesterol LDL, en 1 mmol/L (39mg/dl), es relaciona amb una reducció del risc relatiu de mortalitat cardiovascular del 28% i d'un 26.6% el risc de patir algun accident cardiovascular (117,131), el que significa que, en pacients amb risc,

## - INTRODUCCIÓ -

els nivells LDLc s'haurien de reduir  $\geq 50\%$  dels seus nivells basals. D'altra banda, l'HDL està emergint com una nova diana terapèutica, en ser considerats els seus nivells baixos factor de risc independent de malaltia coronària (132–134). En pacients tractats amb estatines, i per tant amb els nivells LDLc controlats, els nivells baixos d'HDLc -definits com a  $< 40$  mg/dL en ambdós sexes o  $< 40$  mg/dL en homes i  $< 50$  mg/dL en dones (135)- es troben associats, de manera independent i significativa, amb un elevat risc MCV (136). Encara que estudis epidemiològics han observat una relació inversa entre l'ictus, el grau i la progressió d'arteriosclerosi carotídia, la mortalitat cardiovascular i l'HDLc (133,134) -s'estima que un increment d'1 mg/dL d'HDLc s'associa a una reducció en el risc MCV del 2% en homes i el 3% en dones (135,137)-, els efectes beneficiosos de l'augment d'HDLc per a l'ús de tractaments amb fàrmacs disponibles en l'actualitat (com la niacina i fibrats) no són clars. Això es demostra en els resultats d'una metanàlisi on s'inclouen 108 assajos clínics d'intervenció i 299.310 participants amb risc cardiovascular, en la qual l'HDLc no dona cap associació significativa amb el risc per mort o accident de malaltia coronària després d'ajustar per LDLc (138). A més a més, la deficiència de CETP s'associa tant amb augment com amb reducció del risc d'MCV (3,4). D'aquesta manera sembla que, segons les mutacions genètiques, es pot alterar l'activitat de CETP



sobre altres paràmetres, tant de forma aterogènica com antiaterogènica. Actualment, el desenvolupament d'un nou grup de fàrmacs, els inhibidors de la CETP, i més concretament anacetrapib i evacetrapib (vegeu l'apartat I.II. Metabolisme exogen), pot donar lloc a una nova visió en aquest terreny. Els estudis publicats demostren que aquests fàrmacs incrementen els nivells d'HDLc i milloren de les seves propietats antiaterogèniques (6), tot i que els efectes sobre l'MCV no queden clars i els resultats dels assajos clínics no es preveuen fins a l'any 2017.

La importància dels TG com a factor de risc cardiovascular és un tema controvertit. Mentre que alguns estudis epidemiològics suggereixen que els TG són un factor de risc independent d'MAC (139–141), en d'altres perden el valor predictiu després d'ajustar per l'HDLc i altres factors de risc (142–144). En el *Framingham Heart Study*, els TG són un factor de risc independent en dones, però no en homes (145). Tanmateix, en una metanàlisi amb > 50.000 individus en 17 estudis prospectius s'indica que els TG són un factor de risc independent en qualsevol dels dos sexes en població general (146). Els TG varien al llarg del dia en resposta a la ingesta d'aliments i, per tant, és un paràmetre molt variable que, tot i determinar-se en dejú, presenta una variabilitat biològica del 23% respecte del 9,5% de l'LDLc (147). A causa d'aquesta variabilitat,

## - INTRODUCCIÓ -

incrementada en estat postprandial, tradicionalment els TG s'han determinat en dejú; tot i així hi ha estudis que demostren que els TG postprandials són tan informatius del risc com els de dejú (148–150). Una important limitació en la determinació dels TG totals en plasma és que no sabem on queden continguts aquests TG, si en lipoproteïnes, com els quilomicrons o VLDL, o en les més aterogèniques LR. Per tant, més important que la concentració de TG és saber com es transporten, atès que l'aterogènia dels TG depèn de les lipoproteïnes per les quals es transporta.

En individus amb **diabetis mellitus tipus 2** (DMT2), la dislipèmia també és un dels factors clau causants del seu elevat risc MCV. La incidència d'arteriosclerosi en pacients DMT2 és superior en individus sense DMT2 (151), a causa de la dislipèmia aterògena típica en aquests malalts, que es caracteritza -com hem dit- per nivells alts de TG, sdLDL i LR, i baixos d'HDLc. Cal pensar que la dislipèmia en DMT2 només afecta, moderadament, els nivells d'LDLc, amb la qual cosa la seva diana terapèutica ha de centrar-se en els TG, l'HDLc i les LR. De la mateixa manera, un **IMC** elevat genera la dislipèmia aterògena descrita en DMT2. Aquest perfil aterogènic es correlaciona amb un increment del risc cardiovascular en individus sans amb sobrepès (152,153), que es veu reduït quan l'IMC es troba entre 20-25 kg/m<sup>2</sup> (152,154,155), i es troba associat a



calcificacions coronàries en dones postmenopàusiques (156) i GIM en homes sans (157). L'increment en el pes també es troba associat a un perfil més aterogènic amb mides incrementades de les VLDL i reduïdes de les LDL i HDL en adolescents (158).

Molts estudis es porten a terme en població general on s'inclouen individus d'ambdós sexes, però cal tenir en compte les diferències entre els dos **gèneres** quan a risc arterioscleròtic. Tot i que l'MCV és la causa més gran de mortaldat en dones als Estats Units (159) i s'estima que, de cada dues dones, una mor per alguna malaltia relacionada amb el cor (160), és el sexe masculí aquell que presenta més risc de patir MCV (161). Els factors de risc convencionals que s'han trobat en dones són semblants als que s'han trobat en homes, però cal tenir present que hi ha diferències biològiques importants que són úniques de les dones. Mentre que trobem una diferència de 10 anys en la mortalitat general entre dones i homes, cada any el nombre de morts cardiovasculars en dones esdevé més similars al dels homes (162), i és en arribar a la **menopausa** quan el risc s'igualava entre els dos sexes. Un dels efectes adversos de la menopausa -com hem comentat anteriorment- són els canvis en el perfil lipídic que provoquen dislipèmies, i que incrementen el colesterol total, LDLc i TG, i redueixen el colesterol de les HDL però n'augmenten la mida (161). La causa d'aquest increment de risc

## - INTRODUCCIÓ -

després de la transició a la menopausa (163–165) no queda clar si és resultat de l'edat, la deficiència d'estrògens o ambdós factors (166). Tot i així, trobem poblacions específiques de dones, com les que pateixen LES, que no presenten protecció arterioscleròtica en edats joves. En aquest cas, un altre factor de risc, la **inflamació**, pot contribuir a l'augment del risc en aquestes pacients, encara que el procés pel qual presenten un major risc és més complex i l'explicarem amb més detall més endavant. És ben conegut que la inflamació té un rol molt important en el procés arterioscleròtic (167,168), i la rellevància que té en el desenvolupament d'MCV queda palesa en la relació que hi ha entre marcadors inflamatoris, com la proteïna C reactiva (PCR), i els accidents MCV (10-13). Les vies inflamatòries tenen un paper important en el desenvolupament i la propagació de l'arteriosclerosi, i en l'aparició de síndromes aguts coronaris (169,170). Malgrat que els mecanismes fisiopatològics no són clars, les proteïnes de fase aguda podrien desestabilitzar les plaques arterioscleròtiques i provocar-ne ruptures, activar el complement o facilitar canvis en el perfil lipídic (171). Aquests canvis es donen, principalment, en aspectes qualitius de certes lipoproteïnes. Diferents mediadors de la inflamació, com el factor de necrosi tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*, TNF $\alpha$ ) o la interleuquina 1, afavoreixen la unió d'LDL en circulació amb



l'endoteli vascular. L'LDL, en ser internalitzada, sofreix diferents modificacions (i.e. oxidació) que fan que els receptors *scavengers* situats en la superfície dels macròfags n'augmentin la captació. D'aquesta manera s'inicia la formació de les cèl·lules escumoses típiques del procés arterioscleròtic (167). D'altra banda, les HDL posseeixen qualitats antiinflamatòries que poden revertir o evitar aquests processos (172).

#### V.IV. DISLIPÈMIA ATERÒGENA, SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I ARTERIOSCLEROSI

Com s'ha comentat anteriorment, durant molts anys s'ha centrat l'atenció en les lipoproteïnes LDL i HDL per al maneig del risc cardiovascular, però avui en dia encara una part molt significativa dels infarts de miocardi es produeixen en persones amb un perfil lipídic normal -LDLc < 115 mg/dL , HDLc > 40 mg/dL en homes i > 45 mg/dL en dones, TG < 150 mg/dL- (95,173–175). Cal, doncs, la identificació de nous biomarcadors predictius de risc MCV, i la determinació de les subclasses de lipoproteïnes és un bon candidat.

Com acabem de veure, trobem diferents malalties considerades factor de risc MCV, com DMT2, les quals presenten el perfil lipoproteic característic de la dislipèmia aterògena. Diferents estudis



## - INTRODUCCIÓ -

a gran escala, com el *Malmö Diet and Cancer Study Cardiovascular Cohort* (176) o el *Women's Health Study* (177), on es determinen les subclasses lipoproteiques segons mida i nombre de partícules mitjançant mobilitat iònica i RMN respectivament, mostren que aquest perfil dislipèmic s'associa a major risc cardiovascular.

En la dislipèmia aterògena veiem que l'alteració del perfil lipídic es dona, sobretot, en la mida de les partícules -increment en mida de VLDL i reducció d'LDL i HDL- i no només en la quantitat de colesterol o TG transportat. La mida de les partícules lipoproteiques és una característica que reflecteix l'activitat dels factors que regulen tant les seves vies metabòliques com el potencial aterogènic que presenten; sent un factor que pot contribuir a iniciar el procés arterioscleròtic, és a dir, la retenció de les lipoproteïnes per les cèl·lules subendotelials. L'estratificació de les lipoproteïnes segons la mida dona lloc a les subfraccions lipoproteiques, que poden ser determinades per diferents tècniques, com ja hem vist. Com més petita és la partícula, més facilitats té per traspasar la paret arterial i ser retinguda. Ja, en estats no patològics, es poden observar diferents distribucions en la mida de les lipoproteïnes segons gènere: les dones sanes presenten les HDL i les LDL més grans que els homes (178–180). Tot i així, en alguns casos no és la mida el que, directament, fa que una partícula sigui més aterogènica. En la



## - INTRODUCCIÓ -

dislipèmia aterògena podem observar com la VLDL presenta una mida superior, un fet que la transforma en més aterogènica. En aquest cas, l'aterogènia de la partícula no ve donada per la capacitat a ser captada per la paret arterial o els macròfags, sinó pels canvis en el metabolisme lipídic que provoca, el que genera partícules més aterogèniques: LDL i HDL més petites, i LR.

Com hem comentat anteriorment, durant les últimes dècades el focus d'interès s'ha centrat en les partícules LDL. És per això que trobem un extens nombre d'estudis, tant cas-control com prospectius i en diferents poblacions, en què s'examina l'efecte de la mida d'aquestes partícules amb el risc cardiovascular. Els resultats mostren, majoritàriament, associacions de les partícules LDL petites amb el risc cardiovascular (37,181–183). Cal tenir en compte altres canvis qualitius que sofreixen aquestes lipoproteïnes que les fan més aterogèniques, com és la facilitat de ser oxidades, agregar-se entre si i ser captades per monòcits i macròfags, o tenir una major afinitat pels proteoglicans de la paret arterial; o la capacitat d'augmentar els nivells d'LR en estats postprandials (184). Contràriament, però, també es troben estudis on no apareixen aquestes associacions amb el risc cardiovascular (185–187), o s'observen correlacions molt fortes amb altres paràmetres convencionals lipídics i les LDL petites (188), el que dificulta,

## - INTRODUCCIÓ -

d'aquesta manera, la determinació de la seva contribució independent al risc cardiovascular davant de les aproximacions convencionals (189). Tot i que sembla prou establert que les sdLDL són més aterogèniques que les LDL grans (156,190–195), es troben alguns estudis on es descriu un paper aterogènic de les LDL grans (196). En aquesta línia, s'ha descrit que pacients amb malaltia coronària presenten predominança d'LDL grans respecte de les altres subclasses (197), i que algunes poblacions d'homes sans presenten les LDL grans com a determinants independents de GIMc (198). En l'estudi multiètnic MESA, les LDL grans correlacionen amb la GIM de la mateixa manera que ho fan les petites, tot i així l'estudi conclou que les petites són més aterogèniques (199). Aquesta divergència de resultats es podria explicar pels nivells basals de TG, ja que, quan aquests són baixos, les LDL grans poden esdevenir predictives de risc coronari (35).

De la mateixa manera que les sdLDL, les HDL més petites presents en la dislipèmia aterògena mostren modificacions qualitatives respecte de les HDL més grans. Encara que en estats metabòlics normals les HDL més petites (HDL<sub>3</sub>) sembla ser que presentin majors propietats antiarterioscleròtiques que les grans, sota certes condicions o estats metabòlics aquestes partícules poden perdre les seves funcions antiarterioscleròtiques, esmentades anteriorment, i



convertir-se en HDL disfuncionals (200). La implicació de la mida de les HDL com a factor predictiu d'MCV no queda clara (36,201). Trobem nombrosa bibliografia on s'associen les HDL petites amb MCV, malaltia cerebrovascular i GIM (202–208), de manera independent a HDLc; i les HDL grans, a una major capacitat antiarterioscleròtica (51,156,176,177,190,203,209–216), que, en alguns casos, fins i tot millora la predicció dels factors de risc convencional (132,217,218) i s'associa de manera inversa a les LDL petites (176). En contraposició a aquestes dades, trobem estudis que associen, positivament, les HDL petites amb factors inhibidors d'arteriosclerosi (219,220), o que no discriminen segons la mida de les partícules els efectes aterogènics o antiaterogènics donats (176,221,222).

La discordança de totes aquestes dades pot produir-se a causa de la complexa relació que hi ha entre les subclasses determinades per diferents tècniques, com ja hem comentat, i que fa que no hi hagi una correlació entre les subclasses de lipoproteïnes que s'obtenen de les diverses tècniques. D'aquesta manera, la comparació de resultats és complicada. D'altra banda, l'estandardització metodològica és difícil d'establir, atès que els principis de cada tècnica són molt diferents.

## - INTRODUCCIÓ -

Un paràmetre molt relacionat amb la mida de les partícules és el nombre de lipoproteïnes present de cada fracció o subfracció. Com hem vist anteriorment, són paràmetres determinats per RMN o nivells d'apoB (en el cas d'LDL). Molts estudis que no mostren un increment de la capacitat aterogènica d'aquelles LDL més petites descriuen com a millor paràmetre vaticinador del risc cardiovascular el nombre de partícules LDL totals (LDL-P) (196,199,206,223–226). També el nombre de partícules HDL (HDL-P) sembla un millor valor predictiu de risc MCV (227). Tot i així, els dos paràmetres no són exclusius l'un de l'altre per a la predicció de risc MCV.

### **V.V. LIPOPROTEÏNES ROMANENTS I ARTERIOSCLEROSI**

#### **V.V.I. Característiques aterògenes de les LR**

Les LR, com hem vist, també es troben incrementades en la dislipèmia aterògena. Hi ha evidències directes que les LR es troben retingudes en zones que són susceptibles d'iniciar el procés arterioscleròtic i que pacients que tenen altes concentracions en sang augmenten marcadament el seu risc arterioscleròtic. També hem vist que hi ha diferents entitats en el grup de partícules



romanents, i cadascuna té característiques i propietats pròpies respecte de l'arteriosclerosi.

Però, quines són les característiques generals que fan a totes aquestes LR més aterogèniques?

■ **Mida.** Com ens mostra l'apartat anterior, la mida de les partícules lipoproteiques pot determinar una part del seu grau aterogènic. Les partícules romanents determinades per diferents tècniques presenten mides molt diverses (des de VLDL a HDL). De la mateixa manera que les altres lipoproteïnes, mentre que aquelles que presenten mides més petites poden tenir una millor difusió a la íntima arterial, aquelles més grans en queden excloses (228). L'influx d'LR a la íntima augmenta directament amb l'increment d'LR en plasma i decreix inversament amb l'increment del seu diàmetre, del qual també depèn la seva retenció a la íntima (229). Tot i així, Shirakawa et al. (54) van observar com pacients amb DMT2, o síndrome metabòlic, presentaven LR de mida més gran que els controls. Aquestes partícules de mida més gran podrien tractar-se de les VLDL<sub>1</sub> trobades en la dislipèmia característica de DMT2, origen de canvis aterogènics en el perfil lipídic. Prèviament, a més, en un estudi amb pacients diabètics no insulíndependents s'establien les partícules més petites d'LR, com les IDL, com a increment de risc (230).

## - INTRODUCCIÓ -

▣ **Nombre de partícules.** De la mateixa manera que en altres tipus lipoproteics, per bé que la mida és important, aproximadament el 70% de les diferències interindividuals són degudes al nombre d'LR en plasma i no pas a la mida d'aquestes (231). A més, l'acumulació de lípids a la paret arterial, el punt crític en l'inici del procés arterioscleròtic, es troba directament relacionat amb la quantitat de lipoproteïnes circulants (229). El mètode més fiable per a la determinació del nombre de partícules és l'RMN. Estudis recents, com el Women's Health Study, associen les concentracions d'IDL-P amb l'accident cardiovascular en dones sanes seguides durant 11 anys (177).

▣ **ApoE.** Com hem vist, un dels factors clau per a l'eliminació de les LR és l'apoE. D'aquesta manera, tant la quantitat d'apoE per partícula -a més apoE més probabilitat de quedar retingudes per HSPG a la paret arterial (232)-, com l'isoforma -apoE2 presenta menys afinitat per receptors- i la presència d'altres apos en les partícules -poden inhibir unions amb receptors o enzims- són factors determinants de l'eliminació de les partícules de circulació i de la captació d'aquestes per macròfags i formació de cèl·lules escumoses (233). S'ha determinat que un 20% de les lipoproteïnes que contenen apoB també contenen apoE en individus normolipèmics, percentatge que s'incrementa un 85% en pacients



amb disbetalipoproteïnèmia característics en alts nivells d'IDL (79). La falta d'apoE (ratolins *knockout* en apoE) o la presència de formes poc recognoscibles pels receptors (disbetalipoproteïnèmia) donen lloc a arteriosclerosi accelerada, ja que el fetge no elimina les partícules en circulació (234).

■ **Oxidació.** La captació que fan els macròfags de les LR també pot ser independent d'apoE (234), i això pot ser a causa de la unió no específica d'apoE a membrana o del reconeixement i la captació de molècules oxidades dels macròfags. La lipòlisi de les lipoproteïnes n'incrementa la susceptibilitat a l'oxidació, i en les lipoproteïnes oxidades els macròfags incrementen la seva captació (235). Ratolins *knockout* per apoE presenten elevats nivells de partícules romanents ( $\beta$ -VLDL) i arteriosclerosi accelerada, que pot ser revertida amb antioxidants. Per tant, l'aterogènia de les partícules romanents independent d'apoE es pot explicar per l'oxidació (236).

■ **Estructura.** Les lipoproteïnes aïllades de placa arterioscleròtica són estructuralment més semblants a les lipoproteïnes riques en TG (237).

■ **Lipòlisi.** En la formació de les LR a través de l'acció de l'LPL sobre les lipoproteïnes, es generen productes lipolítics citotòxics per als macròfags que poden incrementar la permeabilitat endotelial



## - INTRODUCCIÓ -

(238–240), que faciliten la difusió endotelial de les LR. A més, la lipòlisi de les LR pot induir l'increment de l'agregació plaquetària en sang (241).

### V.V.II. Arteriosclerosi i paràmetres de les LR

Les propietats esmentades en l'anterior apartat són les que aporten el caràcter aterogènic a les LR, i fan que les seves concentracions en sang siguin marcadors de risc arterioscleròtic. Atesa l'existència de diferents entitats en el grup de LR amb propietats fisicoquímiques diferents, es pot donar una especificitat de població en la valoració de risc arterioscleròtic.

Com hem dit, el paràmetre més específic d'LR és l'**RLPc**. En la població del Framingham Heart Study és un factor de risc cardiovascular independent en dones (242), tot i que es determinen valors més elevats en homes (81,243), i s'incrementa en la dislipèmia aterògena. A més, trobem estudis en diferents poblacions de risc arterioscleròtic on s'han trobat concentracions elevades d'RLPc, com les dones postmenopàusiques (243), els pacients amb MAC (80,81,243,244), els diabètics (245,246) i els disbetalipoproteïnèmics (80,84). També s'ha vist que és millor



predictiu d'accidents cardiovascular que el colesterol no HDL en pacients amb MAC amb nivells  $<100$  mg/dL sota tractament hipolipemiant (247). El potencial aterogènic d'RLP queda enfortit per la capacitat que té en l'acumulació lipídica en macròfags (248,249), estimulació d'agregació plaquetària (250–253) i disfunció en la vasorelaxació dependent d'endoteli (254,255). A més, en pacients hipertrigliceridèmics, la seva reducció és important mitjançant diferents fàrmacs: 75.4 % (fenofibrats) (256). La determinació del RLPc pot predir la presència d'arteriosclerosi caròtida o coronària independentment dels nivells plasmàtics de TG (257). Un augment de TG no vol dir augment de l'RLPc en plasma en molts casos (258), encara que la relació entre LR i els nivells de TG fa previsible determinar majors concentracions en estats postprandials que en dejú (259).

La determinació del colesterol que transporten per les partícules IDL mitjançant ultracentrifugació va ser el primer paràmetre d'LR que es va estudiar; és per això que trobem nombrosa bibliografia sobre això. Estudis transversals han demostrat que pacients amb MAC tendeixen a tenir nivells plasmàtics d'IDLc elevats (73,260–264), i s'observen majors nivells en homes enfront de dones, en adults enfront de joves i diabètics enfront de no diabètics. A més, la IDL es

## - INTRODUCCIÓ -

relaciona de manera independent amb MAC (260), i amb la severitat i progressió de l'arteriosclerosi subclínica tant en estudis transversals (262,263,265) com longitudinals (205,264,266,267). D'entre aquests estudis, Watts GF et al. (268) determinen una relació inversa entre la millora de MAC i els nivells d'IDL i LDL, i una relació positiva amb HDL, tot i que no identifiquen IDL predictiu independent de MAC. D'altra banda, Phillips NR et al. determinen que un increment d'1 mg/dL d'IDL + VLDL incrementa un 2% la probabilitat de patir un accident cardiovascular (267).

Quant a la **IDL-P**, i no al colesterol contingut en aquestes, trobem estudis, com per exemple, en el *Women's Health Study*, on s'associen les concentracions d'IDL-P -juntament amb les LDL totals, LDL petites i les VLDL- amb accident cardiovascular en dones sanes seguides durant 11 anys (177). La GIMc també s'hi associa, en homes amb DM tipus 1, juntament amb VLDL grans, LDLc i apoB (269). De manera indirecta, també la dislipèmia aterògena s'associa a incidència de DMT2 (270). Per últim, la IDL-P es veu reduïda un 19% en homes i un 39% en dones que s'han sotmès a tractament amb estatines (37) i en individus hipertriglicèridèmics, un 62.8% mitjançant fenofibrats (256).



L'evidència clínica de l'habilitat de la  **$\beta$ -VLDL** com a promotora de l'arteriosclerosi és la proveeixen, bàsicament, els pacients amb disbetalipoproteïnèmia que tenen un increment en plasma de  $\beta$ -VLDL (71) i també un increment d'arteriosclerosi arterial i coronària, així com malaltia vascular perifèrica (271). També s'ha vist que animals alimentats amb dietes riques en colesterol tenen increment d'aquestes partícules en circulació (272). Les  $\beta$ -VLDL aïllades de pacients dislipèmics provoquen canvis morfològics a macròfags, i donen lloc a característiques morfològiques de les cèl·lules escumoses, sempre que aquestes partícules continguin apoE sense cap disfunció a la unió amb receptor (273,274). Cal tenir present, però, que els disbetalipoproteïnèmics són homozigots per apoE2 (275), la forma d'apoE menys afí per als receptors, i per tant els macròfags ni reconeixen ni capten, de manera eficient, aquestes partícules i, consegüentment, no es formen les cèl·lules escumoses (276). Tot i així, ratolins transgènics homozigots per apoE2 tenen  $\beta$ -VLDL incrementada en circulació i desenvolupen arteriosclerosi (277,278). Per tant, el potencial aterogènic de  $\beta$ -VLDL es creu que és per la seva susceptibilitat a ser oxidada, i promou la formació de cèl·lules escumoses pel mecanisme donat per les LDL oxidades (LDL<sub>ox</sub>) (235).

## - INTRODUCCIÓ -

### V.V.I. Arteriosclerosi, metabolisme postprandial i LR

Avui en dia augmenten les evidències que un metabolisme postprandial alterat juga un rol important en el desenvolupament de l'arteriosclerosi. El grau i la duració de la hipertrigliceridèmia postprandial està directament relacionat amb el fenomen de la dislipèmia aterògena, tal com la presència de les sdLDL o l'absència de les HDL (279). Els mecanismes pels quals la hipertrigliceridèmia postprandial pot resultar en arteriosclerosi els han revisat per Lopez-Miranda et al. (280), i les partícules romanents hi tenen un paper molt important.

- a) Els canvis postprandials produïts en l'endoteli indueixen a la disfunció endotelial. Incrementant les partícules romanents s'altera la vasodilatació de l'endoteli, i el paper secretor de l'endoteli i pot, per exemple, disminuir la secreció d'òxid nítric i induir la relaxació vascular.
- b) L'hipertrigliceridèmia postprandial indueix l'expressió de les citocines proinflamatòries i les molècules d'adhesió solubles.
- c) Atès que romanen més temps en circulació, competeixen per la unió a LPL, fet que pot provocar la formació d'sdLDL.



## V.VI. LUPUS ERITEMATÓS SISTÈMIC I ARTERIOSCLEROSI

Com s'ha comentat anteriorment, trobem alteracions del perfil lipídic secundàries a certes malalties, com és el cas de la DM, la síndrome metabòlica, d'hipotiroidisme o malalties hepàtiques i renals; però també hi ha altres patologies que, encara que no presentin una destacada dislipoproteïnèmia els individus que les pateixen també presenten un alt risc cardiovascular, com és el cas del Lupus Eritematós Sistèmic (LES).

Aquesta, juntament amb la DMT2 i individus sans, és objecte d'estudi en la present tesi.

El **LES** és una malaltia d'etiologia multifactorial en la qual es produeix lesió tissular i citològica pel dipòsit d'autoanticossos i complexos autoimmunitaris. LES, com el seu nom indica, és una malaltia sistèmica i, consegüentment, pot afectar diferents i múltiples òrgans. A més, en ser també una malaltia inflamatòria crònica, es produeix inflamació dels òrgans afectats de forma persistent durant un llarg període de temps. No obstant això, clínicament el LES es manifesta de manera fluctuant, alternant períodes de major activitat o més símptomes (exacerbació o brot) amb d'altres d'inactivitat (remissió).

### V.VI.I. Epidemiologia

El LES es pot manifestar en qualsevol edat, sexe i grup ètnic, tot i que domina en les dones i es comporta de forma especialment agressiva durant l'edat reproductiva. La incidència i la prevalença del LES varia en funció de l'àrea geogràfica i de l'ètnia analitzada. A Espanya, segons l'estudi EPISER que la *Sociedad Española de Reumatología* ha portat a terme, la prevalença de la malaltia és de 34-91 per cada 100.000 habitants (281), i la incidència de 2/100.000 habitants l'any. Juntament amb Suècia i Islàndia, Espanya presenta una de les prevalences més altes d'Europa (282).

Els **gènere** femení és més permissiu quant a LES, ja que la prevalença en les dones en edat fèrtil és de 7 a 9 vegades superior que en els homes, mentre que la relació entre dones i homes es redueix a 3:1 en els anys premenopàusics i postmenopàusics. Cal tenir en compte, però, que el gènere no es considera un factor pronòstic. Una possible explicació a aquesta major permissivitat de gènere femení deriva de la regulació hormonal. L'estradiol s'uneix als receptors dels limfòcits T i B, i n'amplifica l'activació i supervivència, amb la qual cosa s'afavoreix una resposta immunitària prolongada en les dones. En situacions d'alteració hormonal, com pot ser l'aparició prematura de la menstruació,



l'administració d'anticonceptius orals (283,284) o la substitució hormonal durant la menopausa, s'ha vist que les dones presenten major risc de patir LES (285,286), probablement a causa de l'alteració del metabolisme de les hormones sexuals en el LES, cosa que influeix en la tolerància immunitària.

Tot i que, com hem dit anteriorment, la majoria dels casos de LES corresponen a dones en **edat** reproductiva (15-45 anys), es té la predisposició en totes les edats. S'anomena "LES pediàtric" quan debuta abans dels 16 anys i representa entre el 8% i el 15% dels casos. El més habitual és la seva aparició després dels 10 anys i és extremadament infreqüent abans dels 5 anys. D'altra banda, quan el LES es presenta en pacients majors de 50 anys, s'anomena "lupus d'aparició tardana" i representa entre el 4% i el 39% de tots els casos. Tanmateix, aquest grup, a causa de l'envelliment progressiu de la població en els països occidentals, adquireix cada cop major importància.

Fins a la primera meitat del segle xx, el LES era descrita com una malaltia progressiva general amb terminació fatal, i amb un període de 3 mesos a 1 any entre les primeres manifestacions de la malaltia i la mort, principalment causada per malaltia renal i infeccions (287–291). Posteriorment, gràcies a la introducció de fàrmacs, com els



## - INTRODUCCIÓ -

esteroides o els immunosupressors per al tractament de LES, i una millora en el maneig del dany renal, la supervivència dels pacients, estimada a 5 anys, va passar del <50% al >95% dels temps actuals (292–295), iniciant-se així la inclusió de casos crònics de la malaltia. Paradoxalment, ha estat en les últimes dècades que la incidència del LES s'ha vist triplicada, fet que reflecteix, probablement, les millores aconseguides en el coneixement de la malaltia i una millora en la captació de casos.

Tot i les millores descrites, la mortalitat del LES és tres cops superiors a la de població general del mateix gènere i edat. Ja en els anys vuitanta, Urowitz et al. (296) i Rubin et al. (297) van descriure una corba bimodal de mortalitat en LES: un primer pic provocat per l'activitat/severitat o infeccions pròpies del LES (gairebé absent en l'actualitat gràcies a les millores esmentades) i un segon pic en superar els 5 anys de la diagnosi del LES, a causa, principalment, de MCV (298).

És ben conegut que l'activitat de la malaltia al llarg del temps és un predictor de mortalitat important, i que es relaciona, significativament, amb el dany present. És per això molt important la **mesura de l'activitat** de la malaltia i **el dany** produït. Es troba una gran varietat d'índexs per mesurar l'activitat de la malaltia (299), vàlids, fiables i comparables, tot i que el *Systemic Lupus*



*Erythematosus disease activity index* (SLEDAI) és, potser, l'eina avaluadora més fàcil d'utilitzar. En les darreres revisions d'aquest índex s'ha proposat emfatitzar la malaltia en curs, i no només les activitats noves o recurrents (SELENA-SLEDAI i SLEDAI 2001) (299). A més, hi ha un consens internacional en l'índex per determinar el dany de la malaltia: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology* (SLICC/ACR) *Damage Index* (SDI) (300,301).

#### **V.VI.II. Criteris de classificació de diagnosi de LES**

No hi ha proves de laboratori o un quadre clínic específic per al LES, per la qual cosa el seu diagnòstic es basa en uns criteris de classificació. Aquests es van establir el 1982 i els va revisar un comitè el 1997 (302). Recentment, però, el *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) va presentar els criteris de classificació SLICC 2012 que defineixen millor algunes característiques clíniques singulars: adjudica més valor a les alteracions hematològiques, afegeix alteracions bioquímiques no incloses anteriorment (com la hipocomplementèmia) i estableix que s'han de complir criteris clínics i també immunològics. L'aplicació dels nous criteris fa que es guanyi en sensibilitat i aquests permeten

## - INTRODUCCIÓ -

un diagnòstic més precoç, encara que perden, discretament, en especificitat respecte dels del 1997 (303) (vegeu annex IV). En els nostres estudis s'han aplicat els criteris de classificació consensuats del 1997.

### V.VI.III. Manifestacions clíniques de la malaltia

En el LES el dany cel·lular i tissular que provoquen els anticossos esdevé en un ampli espectre de manifestacions clíniques. Al principi, el LES sol afectar un o diversos òrgans o sistemes, però amb el temps apareixen més manifestacions. La freqüència i la severitat de les diferents manifestacions varia segons edat, gènere i grup ètnic.

Les manifestacions clíniques més freqüents en el LES són de caràcter general (95%); també n'hi ha d'articulars (95%), cutànies (80%), hematològiques (85%), cardiopulmonars (pericarditis, valvulopatia, cardiopatia isquèmica; 60%), renals (30-50%), digestives (40%), neuropsiquiàtriques (60%), vasculars (15%) i oculars (15%). Tant les manifestacions renals com les cardiovasculars són les que presenten més mortalitat.

Les **manifestacions renals** donen lloc a l'anomenada "nefropatia lúpica" (NL). Aquestes manifestacions solen ser les més greus i



generen una pronunciada reducció en la supervivència d'aquells pacients amb LES que la tenen respecte d'aquells que no. Tot i així, la supervivència actualment se situa entorn al 90% als 10 anys, malgrat que un 30% presentaran un altre episodi d'NL i un 25% acabaran precisant tractament renal substitutiu als 10 anys de diagnòstic. La proporció de pacients amb malaltia renal o nefritis es mou entre el 40% i el 60% dels pacients amb LES, per bé que hi ha grups ètnics específics, com els afroamericans, els caribenys i els zimbabuesos, que en tenen un major percentatge. Aquells pacients amb més risc de desenvolupar-la tenen nivells alts d'antiDNAs i hipocomplementèmia (C3, C4 i CH50). La nefritis és asimptomàtica en gairebé tots els pacients amb lupus, i es troba fortament associada a hipertensió.

Les **manifestacions cardiovasculars**, les seves causes i les seves conseqüències les exposarem àmpliament a continuació.

#### **V.VI.IV. Arteriosclerosi en LES**

Està àmpliament acceptat que els pacients amb LES tenen una alta mortalitat cardiovascular (290,297,304–311). Com s'ha comentat anteriorment, és, en superar els 5 anys de la diagnosi de LES, quan, a causa sobretot d'MCV, es genera un segon pic de mortalitat (298).

## - INTRODUCCIÓ -

La prevalença d'MCV en LES s'incrementa amb l'edat i la duració de la malaltia (297,311–314). Tanmateix, l'augment del risc vascular en LES és particularment alarmant en dones joves, ja que el tenen més de cinquanta cops incrementat si es compara amb població general amb el mateix rang d'edat (119,120). Aquest fet és sorprenent, perquè en població general és amb l'edat que s'augmenta la probabilitat d'arteriosclerosi, i són precisament les dones joves el grup més protegit contra l'arteriosclerosi gràcies a l'efecte protector dels estrògens (315). D'altra banda, en grups de major edat, el risc entre pacients LES i controls no presenta diferències significatives (316).

Fins a la data, hi ha molt pocs estudis que comparin la incidència d'MCV en LES amb la població general, però s'ha observat que entre el 6% i el 37% de les morts de LES, que s'han estudiat en diferents cohorts en les darreres quatre dècades, són degudes a MCV, la qual és la principal causa de mort (290,297,304–311).

La patogènesi de l'MCV prematura en LES probablement és deguda a un origen multifactorial, i com a resultat de tot això es presenten diferents manifestacions clíniques, incloses l'artritis, la trombosi, l'embòlia i el flux anormal coronari, i subclíniques, com l'arteriosclerosi (91). En la morbiditat de les manifestacions clíniques veiem que la malaltia isquèmica coronària té una prevalença que



oscil·la entre el 8% i el 16% en diferents estudis (120,310,317–321), i que la malaltia cerebrovascular presenta percentatges força semblants (92,322–324).

Quant a l'arteriosclerosi, s'observa moderada o severa en el 52% de les autòpsies que s'han dut a terme en pacients amb LES (309,325,326). També, per mitjà de diferents mètodes no invasius, s'ha pogut detectar que la prevalença d'arteriosclerosi subclínica és un 40% superior en LES que en població general (319,327), sobretot en edats més joves i iniciant-se en gruixos de placa inferiors a grup control (328). A més, entre un 40% i un 54% de dones amb LES presenta placa carotídia, que en un 76% és calcificada. La prevalença es reparteix, segons edat, en un 21% en menors de 35 anys i en un 100% en majors de 65 (319,329,330). Paradoxalment, les dones joves amb menor prevalença de placa carotídia són les que, com hem comentat anteriorment, tenen un major risc d'MCV. A més, no és només que l'arteriosclerosi sigui més freqüent en LES que en població general, sinó que també es troba accelerada, desenvolupant-se o progressant  $0.011 \pm 0.03$  mm l'any (331). Tant la placa com la GIM són predictives de futurs accidents cardiovasculars en pacients sense història prèvia d'MCV (318).

En addició als canvis estructurals que produeix l'arteriosclerosi en els vasos, cal també tenir en compte els efectes del LES en la funció

## - INTRODUCCIÓ -

vascular, ja que, com s'ha descrit anteriorment, la disfunció endotelial predisposa a l'arteriosclerosi (332,333). Es tenen evidències que els pacients LES presenten disfunció endotelial prematura (334) i que, a més, aquesta es correlaciona amb l'arteriosclerosi subclínica (335). A més a més, en diferents estudis el nombre de les cèl·lules endotelials progenitores (EPC) circulants - que intervenen en la reparació de l'endoteli i estan relacionades amb l'arteriosclerosi en població general- es troba reduït en comparació amb el grup control (336). Tot i així, encara que en molts estudis es consideri el LES com a risc independent de patir disfunció endotelial (335,337), aquesta no juga, per si sola, un paper propi dins el desenvolupament de l'arteriosclerosi, perquè la disfunció endotelial, juntament amb l'estrès oxidatiu i la inflamació crònica, és el que afavoreix l'increment del gruix de la paret vascular, és a dir, l'inici de l'arteriosclerosi.

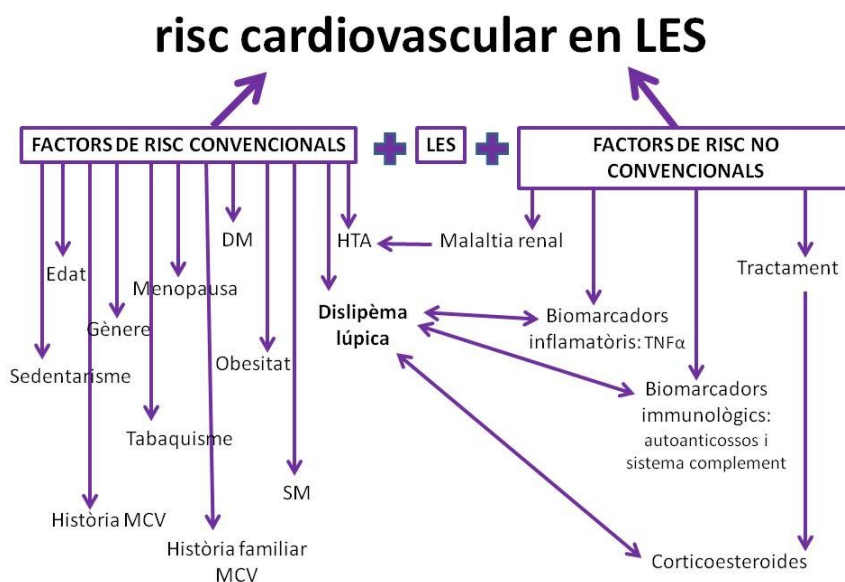
El LES és, per tant, considerat un factor de risc independent del desenvolupament d'arteriosclerosi (91,338–340).

### **V.VI.V. Factors de risc cardiovascular en LES**

L'arteriosclerosi en LES s'ha vist que té un origen multifactorial, i estudis clínics epidemiològics suggereixen que hi ha diferents



mecanismes que podrien promoure l'acceleració d'aquest procés en aquests pacients (341) (figura 17). En aquesta línia, i com veurem més endavant, s'ha descrit el "perfil de dislipèmia lúpica", que caracteritza de manera més concreta la dislipèmia pròpia del LES, i que comparteix alguns trets amb el factor de risc tradicional "dislipèmia aterògena", ja conegut i comentat amb anterioritat. En aquests perfils no només és un factor important el colesterol que contenen les lipoproteïnes, sinó que també ho és la seva mida i el nombre de partícules.



**Figura 17.** Factors de risc cardiovascular en LES. DM: Diabetis Mellitus; HTA: hipertensió arterial; LES: Lupus Eritematos Sistèmic; MCV: malaltia cardiovascular; SM: Síndrome Metabòlica; TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . Adaptació de Sinicato et al. (342)



## - INTRODUCCIÓ -

### a) Factors de risc convencionals

Els factors de risc convencionals d'MCV que s'han descrit anteriorment no mostren el mateix efecte en el LES.

En el LES, ni l'**edat** ni el **gènere** masculí no són un factor de risc arterioscleròtic, ja que, com s'ha descrit anteriorment, fins a un 90% de casos de LES són dones i són les dones joves les que tenen major risc arterioscleròtic. En canvi, en la població general són les dones joves les que tenen menor risc arterioscleròtic gràcies a l'efecte protector dels estrògens (315). El 10% que resta són homes que acostumen a presentar altres manifestacions clíniques de la malaltia, com serositis i simptomatologia neurològica.

La bibliografia actual presenta dades contraposades sobre la prevalença dels altres factors de risc convencionals d'MCV en LES. Trobem estudis on es presenta una alta prevalença d'aquests factors, però cal tenir present la seva associació amb raça/grup ètnic o nivell socioeconòmic cultural que es dona en molts casos (317,343). Alguns apunten el tabaquisme com el principal factor de risc tradicional que promou el risc d'MCV en LES (321,344); d'altres, el síndrome metabòlic, considerat un factor de risc independent i la prevalença del qual es troba incrementada en LES (345–347). No obstant això, atesa l'alta incidència de nefritis en pacients LES, la



hipertensió és un dels factors més comuns que pot contribuir al desenvolupament d'MCV. Avui en dia, molts pacients que presenten LES i història d'MCV estan tractament amb hipotensors, i en línia amb aquest fet trobem estudis que indiquen que la hipertensió és un factor de risc important en el LES (310).

Anteriorment, ja hem destacat el paper de la dislipèmia aterògena en el risc arterioscleròtic. En el LES s'ha descrit un perfil lipídic moderadament alterat anomenat "**perfil de dislipèmia lúpica**" (348–351), i de gran semblança amb la dislipèmia aterògena. Aquest perfil és especialment present en moments de brot i es caracteritza per nivells baixos d'HDLc (-15.1%), alts nivells de TG (+62.4%) i Lp(a) (+61.5%), i lleugers increments o canvis absents en LDLc (+2.8%) respecte de la població general (298,348,349). Els mecanismes no són ben coneguts i hi ha diferents interpretacions. En el cas dels TG, s'ha observat que són elevats fins i tot en aquells pacients que no es estan sotmesos a tractament amb corticosteroides (associats al seu increment), i que encara augmenten més en presència de brot (348). D'altra banda, les partícules HDL no només presenten canvis quantitativs, sinó també qualitativs, ja que diferents estudis demostren que un 40% de LES tenen les HDL disfuncionals, atès que han perdut la seva capacitat antioxidant i antiinflamatòria, i incrementen fins a disset cops la presència d'arteriosclerosi

## - INTRODUCCIÓ -

subclínica (352–356). La composició lipoproteica podria tenir un paper important en aquestes disfuncions, perquè s'han descrit disminució en l'activitat enzimàtica de PON1 (357,358) i en els nivells d'apoA1 (359). Aquests canvis provoquen una disminució de l'adhesivitat endotelial (360,361) i promouen dany endotelial (355). A més, es troben associacions d'aquests factors lipídics amb paràmetres indicadors d'inflamació (presentes en LES), com TNF $\alpha$ , que correlaciona amb alts nivells de TG i baixos d'HDLc (350,362). Així doncs, se sap que les HDL tenen influència en la immunitat innata humoral mitjançant la modulació de l'activació del sistema complement, alterat també en aquests pacients (363).

Tots aquests paràmetres, però, no expliquen per si sols l'excés de risc d'aquests pacients, ja que: 1) després d'ajustar pels factors de risc de Framingham, encara hi ha un increment de 7.5 de malaltia coronària (338), 2) els models de predicció d'MCV sempre presenten una barreja de paràmetres convencionals i no convencionals i 3) els pacients LES amb MAC tenen menor prevalença i menor nombre de factors de risc tradicionals comparat amb pacients no-LES amb MAC prematura (364). Cal tenir present, a més, les limitacions de la qualificació dels factors de risc de Framingham en aquesta població, que es poden explicar pel fet que l'arteriosclerosi en LES es dona en



dones joves, i en la puntuació de Framingham el pes de l'increment de l'edat i el gènere masculí és molt important.

### **b) Factors de risc no convencionals**

Tenint en compte que el LES és considerat un factor de risc independent del desenvolupament d'arteriosclerosi (91,338–340), i que, com s'ha vist, els factors de risc convencionals no poden explicar per si sols l'excés de risc d'MCV prematura que es troba entre els LES, se suggereix que hi ha factors relacionats amb la fisiopatologia de la malaltia que cal tenir en compte, com la malaltia renal, la inflamació, els biomarcadors immunològics i el tractament propi de LES (figura 17). Curiosament, tots aquests factors intervenen en els canvis produïts en el perfil lipídic del LES.

El LES és una malaltia inflamatòria crònica, i, com hem vist anteriorment, la **inflamació** és un factor de risc d'arteriosclerosi. A més a més, la presència de cèl·lules immunes activades és tan típica en lesions arterioscleròtiques (167) com d'inflamació sistèmica (365,366). En el LES, com a resultat de la inflamació crònica, s'alliberen citocines proinflamatòries, algunes de les quals estan relacionades amb MCV (367,368), com **TNF $\alpha$** , que es troba

## - INTRODUCCIÓ -

incrementat en pacients LES (369). En població general, l'apoA1 de l'HDL disminueix la producció de TNF $\alpha$  (370), però sembla ser que en el LES aquesta funció es veu alterada i no disminueixen els nivells de TNF $\alpha$ . Per tant, la reducció dels nivells d'HDLc sembla que hagi de ser una conseqüència de la fisiopatologia de LES, però pot també contribuir, indirectament, a la potenciació de la inflamació. D'altra banda, la TNF $\alpha$  en el LES es correlaciona tant amb baixos nivells d'HDLc com amb alts nivells de TG (298,350,362). Això es pot explicar per l'activitat de la TNF $\alpha$  com a inhibidor d'LPL, atès que en pacients LES s'ha observat que l'activitat de les LPL es redueix fins a un 50% (371). La inhibició d'LPL és un mecanisme ben conegut a través del qual TNF $\alpha$  pot induir canvis en les lipoproteïnes observats en LES. Llavors, és per tant possible que l'activitat del sistema TNF $\alpha$  contribueixi al perfil de dislipèmia lúpica característic de LES. A més a més, s'han trobat variants genètiques de TNF $\alpha$  en altres malalties autoimmunes, com l'artritis reumatoide, que s'associen amb LDL més petites que tenen una major afinitat per la matriu extracel·lular i major susceptibilitat a oxidar-se (372). Tot i així, sobre la seva relació directa amb arteriosclerosi subclínica no es disposen de dades concloents (340,373). Altres citocines, com ara la interleuquina-6 (374) o la interleuquina-17, o altres mediadors de la inflamació, com serien la PAF-acetilhidrolasa (PAF-AH) o la



fosfolipasa secretora A2 (PLA2) (375–377), o factors coaguladors, com l'homocisteïna (324,327,346), sembla que juguin algun paper en el LES i l'arteriosclerosi, però les dades presentades fins a la data no són concloents per determinar-ne la implicació en el procés (317).

L'activitat autoimmunitària, tan activa en el LES, també intervé en el remodelatge del perfil lipídic present en el LES. Com hem vist, la presència d'**autoanticossos** és característica del LES, però no específica (annex IV). La seva participació en el desenvolupament i la progressió de l'arteriosclerosi, com a causants de lesions a l'endoteli i alterant el metabolisme de les lipoproteïnes, ha estat llargament investigada (378–381). Un clar exemple són els **anticossos anti $\beta_2$ glicoproteïna 1** ( $\alpha\beta_2$ GP1 o apoH), coneguts pel seu paper patogènic de la síndrome antifosfolípica, un estat protrombòtic sovint associat al LES, i inductors d'un fenotip aterogènic mitjançant la reducció de l'activitat de la PON de les HDL en LES (358), que, com hem comentat anteriorment, produeix l'increment de l'oxidació de les LDL en reduir l'efecte anti-oxidant de la PON. D'altra banda, la proteïna  $\beta_2$ GP1 també s'uneix a les oxLDL, incrementant-ne la captació dels receptors Fc dels macròfags (382) i inhibint-ne la dels receptors *scavenger* (383).

## - INTRODUCCIÓ -

D'aquesta manera, s'aconsegueix afavorir i perjudicar, alhora, la formació de cèl·lules escumoses.

Aquesta acció d'a $\beta$ 2GP1 incrementant l'oxidació d'LDL, juntament amb un augment de l'estrès oxidatiu, la peroxidació de lípids (384,385) i altres processos inflamatoris propis del LES, podria promoure l'estimulació de la síntesi dels **anticossos anti-LDLoxidades** (aOxLDL) (298,386,387), sobretot en aquells pacients amb història d'MCV (298,388,389). S'ha vist que, en pacients amb malalties no autoimmunes i en persones sanes, els nivells d'aOxLDL als inicis del procés arterioscleròtic són baixos (390–392) i incrementen en estadis posteriors (298,393–395). Sembla que aOxLDL pot generar tant un efecte protector sobre l'arteriosclerosi com un d'aterogènic (396,397). Evidenciant les seves propietats protectores, funcionarien com a factors de protecció que promouen l'eliminació dels lípids oxidats en les cèl·lules apoptòtiques (393). En canvi, en aquells estudis on es correlaciona la presència dels aOxLDL amb arteriosclerosi subclínica (398), aOxLDL provocaria una major internalització de les LDLox produïda pels macròfags, el que acceleraria la formació de les cèl·lules escumoses i provocaria un increment en la síntesi d'aOxLDL (399) que incrementaria exponencialment el procés. Tot i les implicacions dels autoanticossos en el metabolisme lipídic del LES explicades, les



seves associacions amb el risc arterioscleròtic no s'han demostrat en estudis prospectius (400). Així doncs, però, l'acció autoimmunitària dels anticossos dóna lloc a la formació de complexos immunes, els quals activen i consumeixen el **sistema complement**. En el LES són típics els desequilibris en els mecanismes del sistema del complement, que poden contribuir al desenvolupament d'MCV (401). En aquest sentit, la mesura del sistema complement pot generar confusió durant els brots característics de LES, ja que es genera hipocomplemenèmia – el consum del complement és superior a l'activació. A més, alguns pacients també presenten hipocomplementèmia sense brot, fet que pronostica una pitjor evolució de la malaltia. L'activació del complement en el LES contribueix en el procés arterioscleròtic de tres maneres: 1) estimulant les cèl·lules endotelials i millorant el reclutament dels limfòcits a les zones on s'està produint la inflamació, 2) inhibint l'enzim colesterol-27-hidrolasa, catalitzador de la hidroxilació del colesterol a 27-hidroxicolesterol (forma més soluble del colesterol que permet una eliminació de la paret arterial més fàcil i que contribueix al transport revers del colesterol) i 3) estimulant les molècules d'adhesió vascular que recluta monòcits a la paret arterial via complexos immunitaris.



## - INTRODUCCIÓ -

S'ha observat que fàrmacs com els **corticosteroides**, que redueixen l'activitat de la malaltia i la inflamació en pacients amb LES, poden tenir efectes en el risc arterioscleròtic. Diferents estudis associen l'ús d'un dels corticosteroides més comuns, la prednisona, amb la disfunció endotelial (402), la presència de placa carotídia (319), el risc arterioscleròtic (298,403) i la mortalitat (120,298,310,319,322,403–405) en aquells pacients que reben dosis més altes en períodes prolongats de temps. Els efectes en el metabolisme lipídic són un increment dels TG de fins a sis vegades, el que provoca hipertrigliceridèmia i un augment en circulació de les principals lipoproteïnes transportadores de TG, les VLDL (406,407). Així doncs, si les dosis són menors, se sap que els efectes poden ser protectors (404). Cal tenir en compte que el tractament s'implementa segons l'agressivitat i la transcendència del brot, i la història d'aquest tractament podria simplement reflectir una activitat inflamatòria alta que, *per se*, és un factor de risc (298,403). A més, trobem pacients naïf que també han acabat desenvolupant arteriosclerosi (408). D'altra banda, i amb un efecte contrari, els **antipalúdics** milloren el perfil lipídic, i



disminueixen el colesterol total (405), el LDLc i els TGs, i augmenten l'HDLc, sobretot si es prenen juntament amb els corticosteroides. A més, el seu ús s'associa negativament amb la placa carotídia (340) i amb una menor mortalitat.

La malaltia i la insuficiència renal, presents en la **nefritis lúpica** (*lupus nephritis*, LN), es troben fortament relacionades amb la hipertensió, risc convencional d'MCV, i, per tant és un dels factors importants que s'han de tenir en compte en l'arteriosclerosi accelerada en LES (296,325,409,410). Tot i que es troben perfils lipídics anormals en pacients LN (407), no es pot establir una relació entre les oxLDL i les manifestacions renals, tant en LES (388) com en població general (411), i la presència d'oxLDL en biòpsies renals de pacients amb malaltia renal crònica (412), ja que els resultats no són concloents. A més, cal tenir en compte que no hi ha exclusivitat de risc arterioscleròtic en els individus amb LES que presenten LN.

#### **V.VI.VI. Subclasses de lipoproteïnes i LRs en LES**

Com hem vist, diferents factors convencionals i no convencionals contribueixen a produir canvis en el perfil lipídic convencional, malgrat que aquests no poden explicar per si sols el risc incrementat

## - INTRODUCCIÓ -

d'arteriosclerosi en aquests pacients. També hem pogut veure que, estudiant la mida i el nombre de subclasses lipoproteiques o determinant les LR, podem obtenir informació extra i rellevant en l'estudi del risc cardiovascular. En el context del LES, trobem informació reduïda sobre les subclasses lipoproteiques i LR presents i l'efecte d'aquestes en l'arteriosclerosi.

S'ha descrit que pacients amb lupus cutani discoide tenen disminuïdes les concentracions de partícules HDL grans (HDL<sub>2</sub>) i petites (HDL<sub>3</sub>) respecte dels controls (413), i en LES pediàtric s'associa l'activitat de la malaltia amb altes concentracions de LDL petites (414). Un article que ha publicat el nostre grup de recerca determina que les HDL-P petites activen el complement en pacients LES (415), i l'activació d'aquest complement s'associa a la GIM. Aquests resultats aporten el *link* d'unió entre les subclasses de lipoproteïnes i la inflamació. Contràriament Chung et al. relacionen la inflamació en LES amb increments d'LDL-P petites i reduccions en HDL-P petites i grans, encara que les correlacions entre les subclasses i els marcadors inflamatoris són molt dèbils (416). Els mateixos autors, malgrat trobar que pacients amb LES presenten unes VLDL-P més grans i inferiors concentracions d'HDL-P grans que individus control, no troben associacions de les subclasses lipoproteiques amb l'arteriosclerosi arterial coronària. Així doncs,



Hua et al. (417) tampoc troben un perfil lipídic concret predictiu d'MCV. En pacients que presenten LES amb història d'MCV, les HDL-P, i més concretament les petites, es troben reduïdes i les VLDL-P mitjanes, augmentades respecte LES que no han patit MCV i respecte d'individus control no LES. A més, sorprenentment, les LDL-P petites són, significativament, menors en pacients LES que en individus no LES. Tot i les diferències entre els grups d'estudi i les tècniques emprades, Hua et al. i Chung et al. descriuen una reducció en les HDL-P petites en LES incrementada en aquells individus amb MCV, però sense associacions amb arteriosclerosi subclínica, a diferència de Parra et al., on són precisament aquestes partícules les que s'associen amb arteriosclerosi subclínica.

Tot i el destacat paper de les LR en la dislipèmia aterògena, en LES aquest paràmetre no s'ha estudiat gens. Hua et al. descriuen que hi ha el doble d'IDL-P en pacients LES amb història d'MCV respecte d'aquells sense MCV o d'individus control no LES, encara que no és estadísticament significatiu (417). De la mateixa manera, veiem com dones postmenopàusiques amb LES tenen incrementats els valors d'RLPc respecte de les premenopàusiques (418). Aquests resultats ens indiquen que en LES, de la mateixa manera que en població general, la presència d'un factor de risc tradicional, com és presentar història d'MCV o la menopausa, incrementa les LR, però no donen

## - INTRODUCCIÓ -

cap informació del seu valor predictiu en individus LES sense factors de risc convencionals.

Atesa la reduïda bibliografia present, calen més estudis per poder determinar tant el paper de les subclasses en LES com el de les LR en LES.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# HIPÒTESI i OBJECTIUS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



## HIPÒTESI

Sabent que la mida, el nombre i l'eliminació de les lipoproteïnes són importants en la patogènia de l'arteriosclerosi, llancem la hipòtesi que:

L'anàlisi avançat basat en la mida i el nombre de les lipoproteïnes, i les lipoproteïnes romanents, aporta informació addicional a la que s'obté en la rutina clínica fonamentada en el colesterol i els triglicèrids.

## OBJECTIUS

1. Determinar factors de risc no convencionals d'arteriosclerosi en pacients LES:
  - i. Quantificació de les subclasses de lipoproteïnes mitjançant RMN.
  - ii. Determinació de l'RLPc mitjançant cromatografia d'immunoafinitat.
  - iii. Determinació del genotip de l'apoE.
  - iv. Determinació del GIMc per identificar arteriosclerosi subclínica.
  - v. Establiment de les associacions que hi ha entre aquests paràmetres, tenint en compte els paràmetres lipídics convencionals.
  
2. Estudiar els canvis associats amb l'edat de paràmetres lipídics en individus sans sense factors de risc d'arteriosclerosi:
  - i. Quantificació de les subclasses de lipoproteïnes mitjançant RMN i ultracentrifugació.
  - ii. Determinació de l'RLPc mitjançant cromatografia d'immunoafinitat.



- HIPÒTESI I OBJECTIUS -

- iii. Establiment de les associacions que hi ha entre aquests paràmetres, tenint en compte els paràmetres lipídics convencionals.
3. Estudiar els canvis associats amb l'IMC de paràmetres lipídics en individus sans sense factors de risc d'MCV:
    - i. Quantificació de les subclasses de lipoproteïnes mitjançant RMN i ultracentrifugació.
    - ii. Determinació de l'RLPc mitjançant cromatografia d'immunoafinitat.
    - iii. Establiment de les associacions que hi ha entre aquests paràmetres, tenint en compte els paràmetres lipídics convencionals.
  4. Descriure la distribució en les subclasses de lipoproteïnes, de les LR obtingudes per immunocromatografia d'afinitat, en pacients amb DMT2 i individus control, determinant en aquests últims canvis en estat postprandial.
    - i. Determinació de paràmetres lipídics (colesterol, TG, HDLc, LDLc i RLPc) de pacients amb DMT2 i individus control en dejú.

## - HIPÒTESI I OBJECTIUS -

- ii. Separació de les fraccions lipoproteiques per ultracentrifugació seqüencial del plasma de pacients amb DMT2 i individus control en dejú.
- iii. Separació de 21 subfraccions de lipoproteïnes mitjançant gradient d'iodixanol, del plasma d'individus control en dejú i postprandial.
- iv. Determinació de l'RLPc mitjançant immunocromatografia d'afinitat, de les fraccions i subfraccions que s'han obtingut per ultracentrifugació seqüencial i gradient d'iodixanol.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# RESULTATS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



**Nuclear Magnetic Resonance Lipoprotein Subclasses and the APOE Genotype  
Influence Carotid Atherosclerosis in Patients with Systemic Lupus  
Erythematosus.**

Marta Gonzalez, Josep Ribalta, Glòria Vives, Simona Iftimie, Raimón Ferré, Núria Plana, Montse Guardiola, Geesje Dallinga-Thie, Lluís Masana i Antoni Castro.

J. Rheumatol. 2010;37(11):2259-2267

Els pacients amb LES presenten un alt risc d'MCV, tot i tenir, en general, un perfil lipídic mínimament alterat. És per això que en aquests pacients tant la mida com el nombre de lipoproteïnes podrien aportar informació addicional i determinant que permetria establir altres factors de risc cardiovascular propis d'aquesta població. Els resultats obtinguts són els següents:

- 1.** Tot i mostrar un perfil lipídic convencional normal, el 25% dels pacients amb LES presenten valors de GIMc per damunt del percentil 75 per edat, sexe i grup ètnic, que augmenta un 52.9% quan s'utilitzen valors de referència locals per a dones.
- 2.** En LES, el GIMc no es pot explicar pels paràmetres convencionals, però sí pel perfil donat per RMN, on els romanents de les VLDL, les IDL-P ens expliquen el 20.2% de la variabilitat del GIMc, amb el qual presenten una correlació positiva significativa important ( $R = 0.360$ ,  $p = 0.004$ ), que està enfortida per l'altra fracció d'LR, l'RLPc, que també correlaciona

## - RESULTATS -

amb el GIMc de manera significativa ( $R = 0.250$ ,  $p = 0.048$ ).

Tots els resultats es troben ajustats per edat, IMC, pressió arterial (sistòlica i diastòlica) i tabaquisme.

- 3.** Les pacients LES portadores de l'al·lel APOE2, amb major freqüència al·lèlica que en la població general, presenten un risc arterioscleròtic augmentat en trobar-se incrementada la seva freqüència al tercil més alt de GIMc; tercil amb l'acumulació més significativa d'IDL-P.
- 4.** Les correlacions entre el GIMc i les subclasses donades per RMN en LES presenten un patró comú: mentre que les partícules més petites (VLDL-P, HDL-P i LDL-P petites; HDL-P i LDL-P petites mitjanes; HDL-P molt petites) tendeixen a correlacionar-hi positivament, aquelles més grans ho fan negativament (HDL-P i LDL-P grans); és a dir, com més petita és la mida de la lipoproteïna el GIMc és més gran. Tots els resultats es troben ajustats per edat, IMC, pressió arterial (sistòlica i diastòlica) i tabaquisme.



**Changes in lipoprotein composition, density, particle size, and particle number during healthy ageing: the *Vitage* Project.**

Josep Ribalta, Rosa Solà, Joan Carles Vallvé, Josefa Girona, Gemma Godàs, Mercedes Heras, Roger Mallol, Marta González, Xavier Correig, Edmon Rock, Brigitte M Winklhofer-Roob, Montse Guardiola i Lluís Masana.

Under submission 2015

L'edat és el principal factor de risc arterioscleròtic, però en el LES la prevalença d'arteriosclerosi subclínica en edats joves és major que en la població general. D'aquesta manera, seguidament sorgeix l'interès en l'estudi dels canvis en paràmetres lipídics, incloent-hi les LR, segons l'edat en individus sans sense cap factor de risc cardiovascular, donant una visió del metabolisme lipídic en condicions de normalitat.

- 5.** El colesterol total s'incrementa, significativament, amb l'edat ( $R^2 = 0.203$ ,  $p < 0.0001$ ) en homes sans, sent-ne un 27% superior en homes d'entre 70 i 75 anys respecte d'aquells de 20 a 29 anys. Atès que amb l'edat s'observa una disminució en la ingesta de colesterol i que tots els resultats es troben ajustats per IMC, és, doncs, l'edat el principal determinant dels canvis en el colesterol en homes sans.

## - RESULTATS -

- 6.** L'augment del colesterol total en homes sans és conseqüència d'un augment del colesterol contingut en les lipoproteïnes IDL, LDL i HDL (+72%, +45% i +7%, respectivament).
- 7.** Amb l'edat, en homes sans, paral·lelament a l'augment del colesterol que transporten les LDL i les HDL, es produeix també un increment del seu nombre de partícules, que és degut, sobretot, a l'augment de les LDL grans (+42%,  $R^2 = 0.104$ ,  $p < 0.0001$ ) i les HDLs més petites (+14%,  $R^2 = 0.062$ ,  $p = 0.001$ ).
- 8.** Mentre que el colesterol total s'incrementa amb l'edat en homes sans, els TG totals no varien.
- 9.** Les LR presenten diferents tendències segons l'edat: mentre que les IDL mostren un increment amb l'edat (IDLc: +72%,  $p < 0.0001$ ; IDL-P: +200%,  $p = 0.053$ ), els nivells d'RLPc, de la mateixa manera que els TG, no varien.



**BMI correlates with atherogenic lipoprotein profile even in non-obese,  
normoglycemic, and normolipidemic healthy men.**

Montse Guardiola, Rosa Solà, Joan Carles Vallvé, Josefa Girona, Gemma Godàs,  
Mercedes Heras, Marta González, Edmon Rock, Brigitte M Winklhofer-Roob, Lluís  
Masana i Josep Ribalta.

J. Clin. Lipidol. 2015 In Press

Juntament amb l'edat, l'IMC és també un factor de risc arterioscleròtic important. Els canvis que aquest paràmetre produeix en el metabolisme lipídic en individus sans sense cap factor de risc cardiovascular s'exposen en aquest estudi.

- 10.** Tot i estar dins dels rangs de normalitat quant al perfil lipídic, els homes sans amb sobrepès ( $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) presenten un 30% més de TG ( $p < 0.001$ ) i menys HDLc ( $p < 0.001$ ) en comparar-los amb aquells amb normopès ( $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ ). Donat el pes de l'edat i la ingesta de lípids, tots els resultats presentats en aquest estudi es troben ajustats per aquests dos factors.
- 11.** Aquells homes sans que presenten sobrepès tenen incrementat el colesterol, els TG i l'apoB100 de les partícules VLDL ( $p=0.002$ ,  $p < 0.001$  i  $p=0.002$ , respectivament) i IDL

## - RESULTATS -

( $p=0.051$ ,  $p=0.004$  i  $p=0.037$ , respectivament), i disminuït el colesterol ( $p=0.001$ ) i l'apoA1 ( $p=0.002$ ) de les HDL.

**12.** Els individus sans amb sobrepès presenten un 27% més d'LDL-P ( $p<0.001$ ) com a resultat d'una disminució del 16% de les LDL-P grans ( $p<0.001$ ) i un 70% d'increment en les subclasses més petites i aterogèniques ( $p<0.001$ ). També s'observa una disminució del 30% de les HDL-P grans ( $p<0.001$ ) i un increment del 20% de partícules de quilomicrons i VLDL ( $p=0.016$ ), gràcies a les VLDL-P grans ( $p=0.001$ ), que en dupliquen el nombre, i a un augment del 30% de les VLDL-P mitjanes ( $p=0.020$ ).

**13.** Les LR en homes sans amb  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$  es troben incrementades, tant les IDL-P amb un augment del 70% de les seves partícules ( $p=0.010$ ) com les RLP amb un 39% més de colesterol ( $p=0.005$ ).



### **Increased presence of remnant lipoprotein cholesterol in the HDL of diabetic subjects**

Marta González, Mercedes Heras, Roser Rosales, Cristina López, Montse Guardiola, Joan Carles Vallvé, Lluís Masana, Josep Ribalta.

Ann. Clin. Lab. Sci. 2016;46(2). In Press

En els anteriors estudis, hem observat les associacions de les partícules romanents amb l'arteriosclerosi subclínica en LES, i canvis en el nombre d'aquestes partícules i el colesterol transportat segons l'edat i l'IMC en individus sans; tot i així, no coneixem bé la caracterització d'aquesta fracció d'LR obtinguda per immunocromatografia d'afinitat (RLP). D'aquesta manera, en l'últim estudi es descriu la fracció RLP trobada en les subclasses de lipoproteïnes que s'han obtingut per ultracentrifugació seqüencial i gradient d'iodixanol, tant en individus control com DMT2 en condicions de dejú i postprandials.

- 14.** Es detecta RLPC en la fracció d'HDL que s'ha obtingut per ultracentrifugació seqüencial, tant en controls com en pacients amb DMT2.
- 15.** En DMT2, encara que presenti menor concentració d'HDLc, la fracció HDL que s'ha obtingut per ultracentrifugació



## - RESULTATS -

convencional conté un 60% més d'RLPc que l'obtinguda en els controls.

- 16.** Les fraccions HDL, que s'han obtingut per gradient d'iodixanol en mostres d'individus control en estat postprandial, doblen el seu contingut en RLPc en les partícules més denses que en dejú.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# ARTICLES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



## **Nuclear Magnetic Resonance Lipoprotein Subclasses and the APOE Genotype Influence Carotid Atherosclerosis in Patients with Systemic Lupus Erythematosus.**

---

Marta Gonzalez, Josep Ribalta, Glòria Vives, Simona Iftimie,  
Raimón Ferré, Núria Plana, Montse Guardiola, Geesje  
Dallinga-Thie, Lluís Masana i Antoni Castro.

J. Rheumatol. 2010;37(11):2259-2267

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# The Journal of Rheumatology

The Journal of Rheumatology

Volume 37, no. 11

## Nuclear Magnetic Resonance Lipoprotein Subclasses and the APOE Genotype Influence Carotid Atherosclerosis in Patients with Systemic Lupus Erythematosus

MARTA GONZÁLEZ, JOSEP RIBALTA, GLÒRIA VIVES, SIMONA IFTIMIE, RAIMÓN  
FERRÉ, NÚRIA PLANA, MONTSE GUARDIOLA, GEESJE DALLINGA-THIE, LLUÍS  
MASANA and ANTONI CASTRO

J Rheumatol 2010;37;2259-2267  
<http://www.jrheum.org/content/37/11/2259>

1. Sign up for our monthly e-table of contents  
<http://www.jrheum.org/cgi/alerts/etoc>
2. Information on Subscriptions  
<http://jrheum.com/subscribe.html>
3. Have us contact your library about access options  
[Refer\\_your\\_library@jrheum.com](mailto:Refer_your_library@jrheum.com)
4. Information on permissions/orders of reprints  
<http://jrheum.com/reprints.html>

*The Journal of Rheumatology* is a monthly international serial edited by Earl D. Silverman featuring research articles on clinical subjects from scientists working in rheumatology and related fields.



# Nuclear Magnetic Resonance Lipoprotein Subclasses and the APOE Genotype Influence Carotid Atherosclerosis in Patients with Systemic Lupus Erythematosus

MARTA GONZÀLEZ, JOSEP RIBALTA, GLÒRIA VIVES, SIMONA IFTIMIE, RAIMÓN FERRÉ, NÚRIA PLANA, MONTSE GUARDIOLA, GEESJE DALLINGA-THIE, LLUÍS MASANA, and ANTONI CASTRO

**ABSTRACT. Objective.** Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have accelerated atherosclerosis. Since the conventional lipid profile (total plasma cholesterol, triglycerides, low and high density lipoprotein cholesterol) is not consistently altered in SLE, we hypothesized that investigation of lipoprotein subclasses would improve prediction of risk of atherosclerosis in these patients.

**Methods.** As a quantitative index of atherosclerosis, we measured the carotid intima-media thickness (IMT) in 68 patients with SLE and related the atherosclerosis to a detailed lipoprotein profile generated using nuclear magnetic resonance (NMR). We measured the cholesterol transported by the pool of remnant lipoproteins (RLPc) and evaluated the modulatory effect of the APOE genotype on the lipoprotein subclass profile and atherosclerosis associated with SLE.

**Results.** Circulating lipoprotein remnant particles [RLPc and intermediate density lipoprotein (IDL)] were positively correlated with IMT, and among them, the indicator that explained 20.2% of the variability in carotid atherosclerosis measured in these patients was IDL, as assessed by NMR. Carriers of the APOE2 allele were at increased risk due to a significant accumulation of IDL particles.

**Conclusion.** Lipoprotein subclasses are more associated with subclinical atherosclerosis in patients with SLE than the lipid variables that are routinely measured. The IDL fraction, which is significantly modulated by the APOE genotype, is the most strongly, significantly, and positively correlated with IMT. (First Release August 1 2010; J Rheumatol 2010;37:2259–67; doi:10.3899/jrheum.091175)

*Key Indexing Terms:*

LUPUS

REMNANTS

APOE GENOTYPE

INTIMA-MEDIA THICKNESS

NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic inflammatory disease that mainly affects women and that is characterized by the production of autoantibodies of different specificities. Patients with SLE have accelerated atherosclerosis and its sequelae<sup>1</sup>. Women with SLE present with 50-fold increased risk of cardiovascular disease<sup>2</sup>. In patients with SLE, the risk of cardiovascular disease cannot be fully

explained by the traditional Framingham risk factors alone and recent studies suggest that a combination of traditional and nontraditional risk factors better characterize SLE<sup>2,3</sup>. These include markers of inflammation, dyslipidemia, enhanced low density lipoprotein (LDL) oxidation, antiphospholipid antibodies, and high levels of homocysteine<sup>4</sup>.

*From the Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina, Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigacions Sanitàries Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Reus; Unitat de Malalties Autoimmunes del Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; and the Laboratory of Experimental Vascular Medicine, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. Supported by the Instituto Salud Carlos III project from CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas.*

*M. González, BSc, Post-Graduate Research Student; J. Ribalta, PhD, Associate Professor, Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina, Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigacions Sanitàries Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili; G. Vives, MD, Resident; S. Iftimie, MD, Resident, Unitat de Malalties Autoimmunes del Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili; R. Ferré, MD, Clinical Associate; N. Plana, MD, PhD, Clinical*

*Associate; M. Guardiola, PhD, Post-Doctoral Research Fellow, Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina, Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigacions Sanitàries Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili; G. Dallinga-Thie, PhD, Research Associate, Laboratory of Experimental Vascular Medicine, Academic Medical Center; L. Masana, MD, PhD, Professor Head of Department, Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina, Servei de Medicina Interna de l'Hospital Universitari de Sant Joan, Institut d'Investigacions Sanitàries Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili; A. Castro, MD, PhD, Associate Professor; Head of Internal Medicine, Unitat de Malalties Autoimmunes del Servei de Medicina Interna, Hospital Universitari de Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili Institut d'Investigacions Sanitàries Pere Virgili.*

*Address correspondence to J. Ribalta, Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Departament de Medicina i Cirurgia, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. E-mail: josep.ribalta@urv.cat*

*Accepted for publication June 3, 2010.*

Cardiovascular risk as in SLE is common to other autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis or type I diabetes mellitus<sup>5,6</sup>. Dyslipidemia is a well established risk factor in the general population and in these latter diseases<sup>7</sup>. The lipid profile in SLE, described as the “lupus pattern of dyslipoproteinemia,” is characterized by decreased high density lipoprotein (HDL), elevated triglycerides, unchanged or only slightly elevated LDL, and raised lipoprotein(a) [Lp(a)]; the underlying mechanisms remaining poorly described<sup>7,8,9</sup>. Routine lipid measurements [total plasma cholesterol and triglycerides, LDL cholesterol (LDLc), and HDLc] may not be sensitive enough to differentiate patients at risk for atherosclerosis<sup>1,10</sup>. This may be explained, at least in part, by additional lipid measures of this atherogenic dyslipidemia, e.g., high triglycerides (TG), low HDL, and small dense LDL particles, accompanied by moderately elevated or normal cholesterol concentrations. Elevated circulating TG are the driving force of increased remodeling of lipoproteins involving cholesteryl ester transfer protein (CETP), which generates a pool of atherogenic smaller lipoprotein particles. These remnant particles are more likely to enter the subendothelial space, are more prone to oxidation, and are more difficult to clear from the circulation, clearance being modulated by the apolipoprotein E genotype<sup>11,12</sup>.

More detailed lipid information would improve our ability to predict the risk of atherosclerosis in these patients. We measured carotid intima-media thickness (IMT) in patients with SLE, determined the complete lipoprotein profile using nuclear magnetic resonance (NMR), isolated and measured the cholesterol transported by the pool of remnant lipoproteins (RLPc), and assessed the influence of the APOE genotype on these measures, and on concomitant atherosclerosis.

Our results indicated that lipoprotein subclasses correlate much better with carotid atherosclerosis than traditional routine lipid indicators and, in contrast to observations in the general population, the APOE2 allele, which is linked to the accumulation of remnant lipoproteins, is a significant risk factor for atherosclerosis in patients with SLE.

## MATERIALS AND METHODS

**Subjects.** Sixty-eight patients with lupus erythematosus were recruited from the systemic autoimmune diseases unit of the Hospital Universitari de Sant Joan de Reus. Patients fulfilled at least 4 classification criteria of the American College of Rheumatology, as revised in 1997<sup>13</sup>. None had active disease, and all had a SLE Diseases Activity Index (SLEDAI)  $\leq 4$  points. No diabetes mellitus, nephrotic syndrome, or hypertension had been evident in these patients, and none had had any ischemic or adverse cardiovascular event. Subjects had been prescribed prednisone therapy ( $< 10$  mg/day) but none were receiving hypolipemic agents.

All patients provided informed consent to participate, and the Ethics Committee of the Hospital Universitari de Sant Joan de Reus approved the study.

**Biochemical analyses.** Fasting venous blood samples were collected in EDTA tubes and centrifuged immediately for 15 min at 4°C at 1500 g. Samples were then divided into aliquots and stored at -80°C until the determination of analytical variables.

Standard laboratory methods were used to quantify glucose, HbA1c, total cholesterol, TG, and HDL cholesterol. LDL cholesterol measures were calculated by the Friedewald formula<sup>14</sup>. Measurement of apolipoproteins was by immunoturbidimetry using antisera specific for apoA-1 and apoB (Hoffman-La Roche) and Lp(a) (Inctar Corp., Stillwater, MN, USA). High-sensitivity CRP (hs-CRP) was measured with a high sensitivity near-infrared particle immunoassay (NIPIA) rate method (Beckman Coulter) on a Synchron LXi PRO System automated autoanalyzer (Beckman Coulter).

**Carotid intima-media thickness.** IMT was measured in the Hospital Universitari Sant Joan de Reus on the same day the blood samples were obtained.

The ultrasound IMT procedure is a noninvasive, relatively inexpensive, safe, and reproducible method for detection of early atherosclerosis. We used a My Lab 50 X-Vision sonograph (Esaote SpA, Barcelona, Spain) with a linear array ultrasound probe small parts broadband transducer (5–12 MHz) to identify and digitally record the far wall of the common carotid artery (1 cm proximal to the bifurcation), the carotid bulb (in the bifurcation), and the internal carotid artery (1 cm distal to the bifurcation) of the left and right carotid arteries. Measurements of IMT were performed at the predefined points using the ThickSoft image processing software<sup>15</sup>.

The images were obtained and measured by a single operator to reduce observer variability. We averaged the measurements of 3 static images of left and right carotid arteries to obtain the mean IMT (mIMT). Maximum IMT (maxIMT) was the maximum value of IMT from all measures in each subject<sup>16</sup>.

Pathological IMT values were defined as the 75th percentile of the general population mIMT values, banded with respect to age and sex. Thus, in the lupus population (according to tertiles of mean age and based on the Consensus Statement from the American Society of Echocardiography<sup>17</sup>), the age-adjusted pathological mIMT tertile values for the mean-age tertiles of 29.23 years, 43.91 years, and 65.87 years were 0.612 mm, 0.713 mm, and 0.852 mm, respectively. According to our regional reference data, the pathological mIMT values for the same mean-age tertiles were 0.530 mm, 0.580 mm, and 0.820 mm<sup>18</sup>.

**NMR lipoprotein profile.** Total plasma lipids and the distribution of subclasses of lipoproteins were analyzed by NMR spectroscopy (NMR LipoProfile; LipoScience, Raleigh, NC, USA), which simultaneously quantifies subclasses of lipoproteins, lipid content, and average particle size. This technique allows determination of very low density lipoprotein (VLDL), intermediate density lipoprotein (IDL), LDL, and HDL. Further, the VLDL fraction is quantified in 3 discrete subclasses, LDL in 4 subclasses, and HDL in 3 subclasses, all according to increasing molecular weight. NMR was performed with EDTA plasma stored at -80°C and thawed just prior to the analysis.

**Separation and quantification of remnant lipoprotein.** Remnant lipoprotein cholesterol (RLPc) was measured in plasma using the method described by Nakajima, *et al*, using RLP-Cholesterol Assay Kits (Jimro-II, Japan Immunoresearch Laboratories, Tokyo, Japan)<sup>19</sup>.

Remnant lipoprotein particles were separated from plasma by immunoaffinity chromatography with a gel containing monoclonal antibodies raised against epitopes of apoB100 and apoA1. The anti-apoA1 recognized apoA1-containing lipoproteins, whereas the anti-apoB100 recognized all apoB100-containing lipoproteins except the partially lipolyzed apoE-enriched triglyceride-rich remnants<sup>20</sup>. The gel retains HDL, LDL, and the majority of VLDL, while the unbound fraction consists of remnant lipoproteins of intestinal (apoB48) and hepatic origin (apoB100). Briefly, the technique involves plasma EDTA (5  $\mu$ l) added to 300  $\mu$ l of gel suspension of anti-human apoA-I and apoB-100 mouse monoclonal antibodies bound to Sepharose<sup>®</sup>. The suspension is gently mixed for 2 h at room temperature with a vertical magnetic-bead oscillator (RLP Mixer J-100A, Photal; Otsuka Electronics, Osaka, Japan). The mixture is allowed to settle for 30 min, and 200  $\mu$ l of the supernatant containing unbound fraction is measured by sensitive cholesterol assay on a Cobas Mira centrifugal analyzer (Roche, Laval, Quebec, Canada). All

RLP assays were performed with samples stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and thawed just prior to analysis.

**APOE genotyping.** DNA was isolated from a 10 ml EDTA blood sample following standard procedures. For DNA amplification, we used a 25  $\mu\text{l}$  reaction volume containing 1.25 mM dNTP, 100 nM of each primer, and 1.5 mM MgCl. Polymerase chain reaction amplifications and genotype determinations were conducted as follows: forward: 5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC AC-3'; reverse: 5'-TAA GCT TGG GCA CGG CTG TCC AAG GA-3'. Thermal cycling conditions were denaturation  $94^{\circ}\text{C}$  for 4 min and 33 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  for 1 min,  $52^{\circ}\text{C}$  for 1 min, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 3 min. Digestion was performed using the HhaI restriction enzyme, and the fragments obtained were resolved using 2% agarose gel electrophoresis.

To evaluate the effect of the APOE genotype, patients were categorized into 3 groups: apoE3/3 homozygotes; apoE2/3 heterozygotes or apoE2/2 homozygotes; and apoE3/4 heterozygotes or apoE4/4 homozygotes.

**Statistical analysis.** Correlations between mIMT and continuous variables were performed with partial correlations adjusted for age, body mass index (BMI), blood pressure (systolic and diastolic), and tobacco consumption. Spearman's correlation coefficient was performed for variables not normally distributed, the variables being adjusted for age, BMI, systolic and diastolic blood pressure, and tobacco use before the test was applied.

Comparisons of means (mIMT tertiles and APOE genotype) were performed with ANCOVA using age, BMI, blood pressure (systolic and diastolic), and tobacco use as covariates, with log-transformed data for variables that were not normally distributed.

Backward linear regression was performed with all the variables included in order to identify the best predictor of high mIMT values. Differences between allele frequencies were evaluated with the chi-square test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$  level. All statistical analyses were evaluated with SPSS (version 17.0; SPSS, Chicago, IL, USA).

## RESULTS

Although conventional lipids are not elevated in SLE, we assessed the contribution of these conventional lipids to the carotid intima-media thickness, focusing as well on NMR subclasses and RLPc. Despite a slightly elevated mean value of LDLc and BMI, the 68 patients diagnosed with SLE had normal glucose and lipid concentrations (Table 1) according to the definitions of the National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III and the International Diabetes Federation<sup>21,22</sup>. No patient had disease activity (flare) at the time of the study. Despite their normal lipid profile (Table 1) and their low cardiovascular risk score (score 1%), 25% of our patients had pathological age-adjusted IMT values<sup>17</sup>. This increased to 52.9% when we used regional reference values for women<sup>18</sup>.

**Correlation between conventional lipids and IMT.** None of the routine biochemical indicators correlated significantly with mIMT, except for apoA1 ( $R = -0.254$ ,  $p = 0.044$ ). However, the tendencies were as expected, i.e., plasma TG, total cholesterol, and LDLc tended to correlate positively ( $\rho = 0.154$ ,  $R = 0.015$ ,  $R = 0.049$ , respectively) with mIMT, while HDLc was the only measure that correlated inversely with mIMT ( $R = -0.213$ ). In a model of multiple linear regression analyses, conventionally measured lipids were unable to explain the carotid IMT to any significant extent.

**Correlation between NMR lipoprotein subclasses and IMT.** Chylomicrons (Qm) and all VLDL subclasses (total, large, medium, small) were positively correlated with mIMT ( $R =$

Table 1. Characteristics of the study population. Data are mean (SD) unless otherwise indicated.

Characteristic	
Female/male, %	91/9
Smokers/ex-smokers/nonsmokers, %	31/3/66
Systolic blood pressure, mmHg	118.94 (17.81)
Diastolic blood pressure, mmHg	74.78 (10.36)
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	26.34 (5.70)
Age, yrs	46.59 (16.52)
Age at disease onset, yrs	37.22 (17.18)
Glucose, mg/dl	4.88 (0.55)
HbA1c, %	4.75 (0.60)
Cholesterol, mmol/l	4.92 (1.10)
HDLc, mmol/l	1.64 (0.40)
Friedewald LDLc, mmol/l	2.83 (0.81)
ApoA1, mg/dl	145.31 (13.44)
ApoB100, mg/dl	87.28 (22.71)
Ratio apoB100/A1	0.60 (0.17)
IMT mean, mm	0.67 (0.17)
IMT maximum, mm	1.00 (0.33)
Triglycerides, mmol/l, median (IQR)	0.90 (0.54–1.23)
Lp(a), mg/dl, median (IQR)	13.85 (6.55–37.33)
hsCRP, mg/dl, median (IQR)	1.47 (0.61–3.86)

HbA1c: glycosylated hemoglobin; HDLc: high density lipoprotein cholesterol; LDLc: low density lipoprotein cholesterol; ApoA1: apolipoprotein A1; ApoB100: apolipoprotein B100; IMT: intima-media thickness; IQR: interquartile range; Lp(a): lipoprotein(a); hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein.

0.335,  $R = 0.154$ ,  $R = 0.243$ ,  $R = 0.360$ , respectively) and maxIMT. These correlations were statistically significant for total VLDL and Qm ( $p = 0.007$  for both) and small VLDL particles ( $p = 0.004$ ).

While total LDL particle concentration tended to correlate positively with mIMT ( $R = 0.184$ ; nonsignificant), not all LDL NMR subclasses showed the same trend. Of note, while the small ( $R = 0.247$ , NS), medium-small ( $R = 0.184$ , NS), and very small ( $R = 0.260$ ,  $p = 0.039$ ) subclasses were positively correlated with mIMT, the large LDL subclass was inversely correlated ( $R = -0.193$ , NS), suggesting distinctly different functional roles of the lipoprotein class (Figure 1).

Similarly, while the largest HDL subclass showed the expected tendency toward inverse correlation with mIMT ( $R = -0.189$ , NS) and maxIMT ( $R = -0.239$ , NS), the smaller HDL subclasses tended to correlate positively with mIMT ( $R = 0.103$ , NS) and maxIMT ( $R = 0.020$ , NS).

Lipoprotein particle size clearly indicated that the smaller the lipoproteins, the greater the intima-media thickening, with inverse correlation with the VLDL ( $R = -0.285$ ,  $p = 0.024$ ), LDL ( $R = -0.265$ ,  $p = 0.036$ ), and HDL ( $R = -0.190$ , NS).

**Correlation of RLPc and IDL and IMT.** Remnants of VLDL (IDL) showed the strongest correlation between NMR subclasses and mIMT ( $R = 0.360$ ,  $p = 0.004$ ) and maxIMT ( $R = 0.430$ ,  $p < 0.0001$ ). RLPc also correlated positively with mIMT ( $R = 0.250$ ,  $p = 0.048$ ).

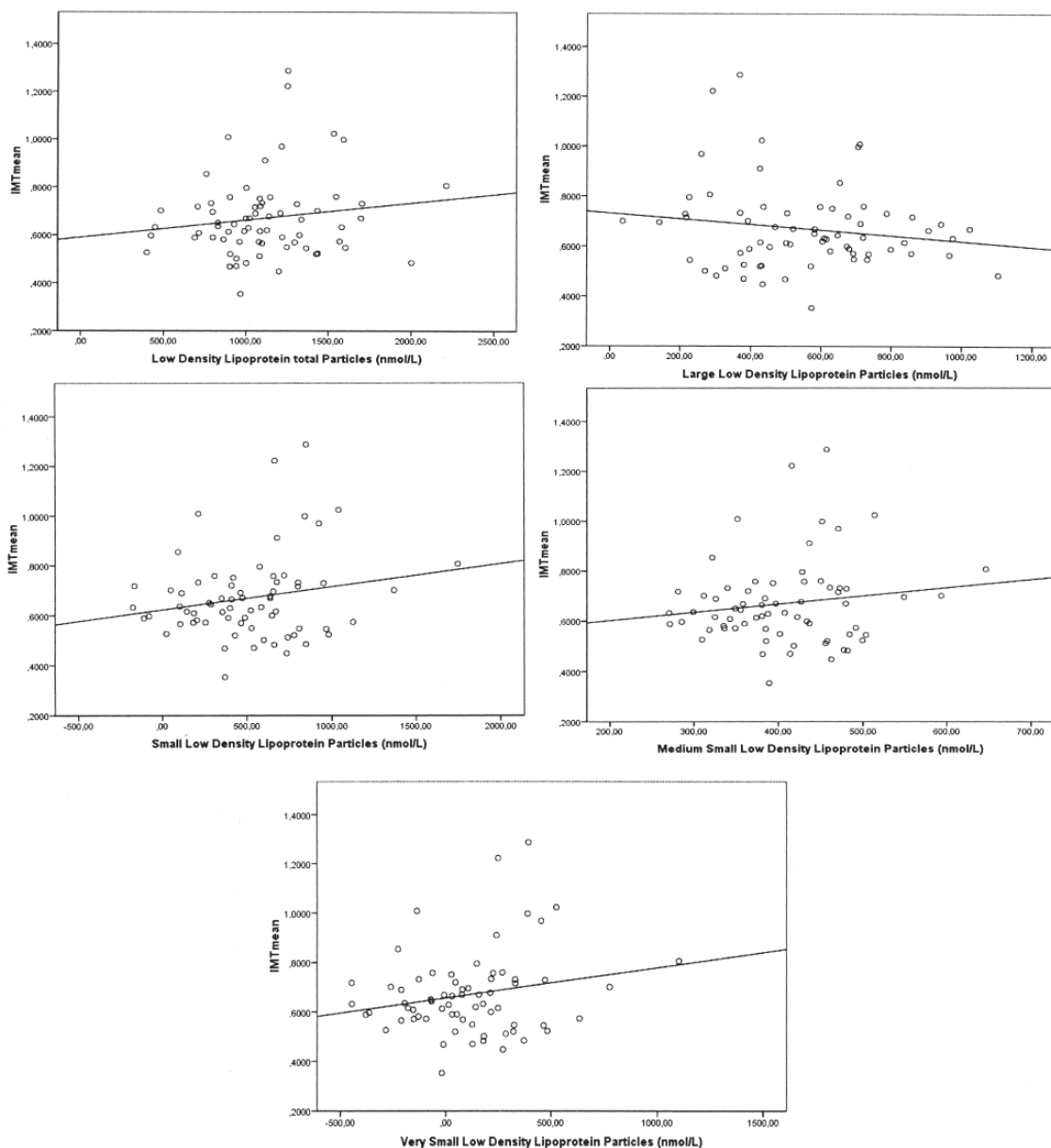


Figure 1. Total LDL particles correlate positively with mean IMT ( $R = 0.184$ , NS). For the largest particles (large LDL) the correlation becomes negative ( $R = -0.193$ , NS) and, as expected, the smaller subclasses correlate positively with mean IMT (small LDL:  $R = 0.247$ ,  $p = 0.051$ ; medium-small LDL:  $R = 0.184$ , NS; very small LDL:  $R = 0.260$ ,  $p = 0.039$ ). The  $p$  values are adjusted for age, body mass index, blood pressure, and tobacco use.

Concentration of conventional lipids, remnant lipoproteins, and NMR lipoprotein profile according to mIMT tertiles. To assess the clinical relevance of the lipid measurements that correlated with IMT, we compared their concentrations according to low, medium, and high mIMT tertiles, that is,

0.52 (0.06) mm, 0.64 (0.06) mm, and 0.84 (0.16) mm ( $p < 0.0001$ ; Table 2).

Among the measures that significantly correlated with mIMT, the small VLDL, IDL, large LDL, small LDL, medium-small LDL, and very small LDL showed significantly

Table 2. Lipid and lipoprotein concentrations by nuclear magnetic resonance, segregated by tertiles of mean intima-media thickness (IMT).

Variable	Mean IMT Tertiles			p
	1	2	3	
n	22	23	23	
Mean IMT, mm*	0.522 (0.055)	0.639 (0.034)	0.843 (0.167)	< 0.0001
Rank mean IMT, mm	0.353–0.589	0.590–0.696	0.701–1.287	
Lipid concentrations				
Triglycerides, mmol/l†	0.780 (0.498–1.063)	0.820 (0.460–1.100)	1.110 (0.760–1.380)	NS
Chol total, mmol/l*	4.876 (1.306)	4.870 (1.074)	5.005 (0.936)	NS
LDLc, mmol/l*	2.820 (0.935)	2.784 (0.808)	2.895 (0.724)	NS
HDLc, mmol/l*	1.650 (0.509)	1.676 (0.377)	1.598 (0.288)	NS
Apo A1, mg/dl*	144.909 (16.130)	146.783 (13.987)	144.217 (10.117)	NS
Apo B100, mg/dl*	85.636 (24.279)	86.130 (23.137)	90.000 (21.471)	NS
Ratio apoB100/A1*	0.595 (0.172)	0.589 (0.165)	0.629 (0.162)	NS
hsCRP, mg/dl†	1.280 (0.488–5.280)	1.450 (0.580–3.180)	1.490 (0.920–2.060)	NS
Lp(a), mg/dl†	14.250 (8.275–31.100)	14.000 (6.800–50.400)	10.100 (6.100–44.400)	NS
VLDL and chylomicron (Qm) particle concentrations				
VLDL and Qm, nmol/l*	44.645 (38.653)	41.587 (47.086)	61.648 (37.873)	NS
Large VLDL and Qm, nmol/l*	0.977 (2.324)	1.043 (1.541)	1.170 (1.619)	NS
Medium VLDL, nmol/l*	13.923 (19.799)	17.957 (26.592)	22.243 (18.193)	NS
Small VLDL, nmol/l*	29.750 (23.295)	22.574 (20.924)	38.230 (23.447)	0.030
IDL particle concentrations				
IDL, nmol/l*	29.136 (39.723)	19.000 (20.872)	85.522 (80.071)	0.003
LDL particle concentrations				
LDL total, nmol/l*	1052.000 (397.340)	1072.261 (366.892)	1210.652 (399.428)	NS
Large LDL total, nmol/l*	538.091 (269.711)	613.304 (230.839)	510.696 (244.153)	0.029
Small LDL total, nmol/l*	484.636 (416.035)	440.087 (356.970)	617.609 (481.133)	0.022
Medium small LDL, nmol/l*	102.273 (82.319)	95.174 (84.209)	127.174 (96.097)	0.050
Very small LDL, nmol/l*	382.409 (335.349)	344.826 (279.856)	490.435 (385.911)	0.019
HDL particle concentrations				
HDL total, $\mu$ mol/l*	30.114 (5.463)	31.826 (6.787)	32.909 (4.032)	NS
Large HDL, $\mu$ mol/l*	9.377 (4.668)	9.913 (3.078)	9.013 (3.204)	NS
Medium HDL, $\mu$ mol/l*	2.014 (2.268)	2.661 (2.776)	2.770 (2.659)	NS
Small HDL, $\mu$ mol/l*	18.732 (4.213)	19.248 (6.210)	21.117 (4.817)	NS
Mean particle size				
VLDL, nm*	52.091 (12.986)	55.309 (10.756)	45.787 (7.966)	0.002
LDL, nm*	21.586 (0.855)	21.804 (0.707)	21.370 (0.994)	0.006
HDL, nm*	9.377 (0.596)	9.470 (0.457)	9.213 (0.463)	NS
Remnant lipoprotein cholesterol (RLPc)				
RLPc, mg/dl†	3.515 (3.148–5.893)	4.260 (3.585–5.605)	4.595 (3.585–6.885)	NS

\* Values are mean (SD). † Values are median (IQR). IMT: arterial intima-media thickness; chol total: total plasma cholesterol; LDLc: low density lipoprotein cholesterol; HDLc: high density lipoprotein cholesterol; ApoA1: apolipoprotein A1; ApoB100: apolipoprotein B100; hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein; Lp(a): lipoprotein(a); VLDL: very low density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; IDL: intermediate density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein. NS: nonsignificant. All p values adjusted for age, BMI, blood pressure (systolic and diastolic), and tobacco use.

different concentration distributions in relation to the mIMT tertiles. Of note, when a statistical test for multiple comparisons was applied, the only measure that was significantly different among the 3 mIMT tertiles was IDL particle concentration (1st tertile to 3rd tertile  $p = 0.004$ , 2nd tertile to 3rd tertile  $p < 0.0001$ ).

Cholesterol transported by remnant particles tended to increase with the degree of IMT, but did not reach statistical significance.

Patients in the 3rd mIMT tertile had VLDL and LDL particles of significantly smaller size.

*Multiple linear regression models.* As noted, multiple linear regression analyses using conventional lipids as variables

did not generate a model able to explain a significant amount of variance in the carotid thickening. However, IDL was able to explain 20.2% of the IMT variability ( $p < 0.0001$ ).

*Interaction between lipoproteins and APOE genotype.* For the purpose of statistical analysis and because of the limited sample size, the study population was subdivided into 3 APOE genotype subgroups depending on their apoE allele. Thus,  $\epsilon 2$  allele group contained the genotypes E2/E2 and E2/E3,  $\epsilon 3$  allele group contained E3/E3 genotype, and  $\epsilon 4$  allele group contained E3/E4 and E4/E4 genotypes. Carriers of E2/E4, if any, would have been excluded from this analysis.



The allele frequencies of  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ , and  $\epsilon 4$  alleles were 0.10, 0.81, and 0.09, respectively. The  $\epsilon 2$  and  $\epsilon 3$  alleles tended toward higher and the  $\epsilon 4$  toward lower frequencies than normally observed in the general population<sup>23</sup>.

The  $\epsilon 2$  allele was significantly associated with the indicators previously linked to subclinical atherosclerosis. For example, carriers of the  $\epsilon 2$  allele presented significantly higher concentrations of the atherogenic subclasses IDL, small LDL, medium-small LDL, and very small LDL, as well as significantly lower concentrations of the protective particles such as large LDL, together with significantly smaller LDL and HDL particle size (Table 3).

The frequency distribution of the  $\epsilon 2$  allele increased with the degree of mIMT. By chi-square test, statistical significance was achieved comparing  $\epsilon 2$  and  $\epsilon 4$  distribution

against the common  $\epsilon 3$  allele ( $\epsilon 2$  against  $\epsilon 3$ ,  $p = 0.003$ ;  $\epsilon 4$  against  $\epsilon 3$ , NS; Figure 2).

## DISCUSSION

We investigated conventional lipid indicators, NMR lipoprotein subclasses, and RLPc in relation to carotid intima-media thickness in patients with SLE. Our results showed the following: (1) IDL particle concentration, analyzed by NMR, was a more powerful predictor of carotid atherosclerosis than the routinely measured lipids. (2) The  $\epsilon 2$  allele was associated with increased mIMT in these patients due to accumulation of IDL resulting, probably, from decreased receptor-mediated uptake and catabolism of the lipoprotein remnant related to this allele. (3) Remnant lipoproteins correlated significantly and positively with

Table 3. Lipid and lipoprotein concentrations by nuclear magnetic resonance, segregated by APOE genotype.

Variable	E2	Genotype E3	E4	p
n (%)	12 (17.65)	44 (64.70)	12 (17.65)	
Mean IMT, mm*	0.774 (0.198)	0.646 (0.149)	0.652 (0.180)	NS
Max IMT, mm*	1.216 (0.473)	0.962 (0.276)	0.923 (0.251)	0.041
Lipid concentrations				
Tryglicerides, mmol/l <sup>†</sup>	1.040 (0.738–1.638)	0.845 (0.493–1.225)	0.940 (0.630–1.098)	NS
Chol total, mmol/l*	4.625 (0.978)	4.952 (1.120)	5.084 (1.163)	NS
LDLc, mmol/l*	2.583 (0.633)	2.843 (0.824)	3.046 (0.930)	NS
HDLc, mmol/l*	1.511 (0.280)	1.682 (0.436)	1.622 (0.323)	NS
ApoA1, mg/dl*	141.670 (10.500)	146.430 (13.881)	144.830 (14.727)	NS
ApoB100, mg/dl*	82.000 (18.616)	87.550 (23.371)	91.580 (24.678)	NS
Ratio apoB100/A1*	0.580 (0.132)	0.604 (0.177)	0.630 (0.157)	NS
hsCRP, mg/dl <sup>†</sup>	1.785 (1.193–5.858)	1.370 (0.533–3.885)	1.185 (0.575–3.415)	NS
Lp(a), mg/dl <sup>†</sup>	6.300 (2.100–40.975)	14.100 (7.300–31.900)	22.000 (10.125–72.225)	NS
VLDL and chylomicron (Qm) particle concentrations				
VLDL and Qm, nmol/l*	64.092 (42.228)	47.148 (44.538)	42.750 (28.292)	NS
Large VLDL and Qm, nmol/l*	1.842 (2.390)	0.871 (1.796)	1.000 (1.010)	NS
Medium VLDL, nmol/l*	25.117 (20.527)	17.409 (24.157)	13.625 (10.747)	NS
Small VLDL, nmol/l*	37.150 (22.910)	28.861 (24.311)	28.108 (19.186)	NS
IDL particle concentrations				
IDL, nmol/l*	93.917 (92.534)	31.800 (39.257)	37.500 (60.089)	0.005
LDL particle concentrations				
LDL total, nmol/l*	1221.583 (295.917)	1080.523 (395.368)	1120.750 (452.542)	NS
Large LDL total, nmol/l*	324.750 (123.302)	597.614 (241.853)	624.833 (249.356)	< 0.0001
Small LDL total, nmol/l*	803.167 (268.524)	451.159 (403.012)	458.333 (516.187)	0.029
Medium small LDL, nmol*	170.167 (59.165)	94.636 (84.334)	96.500 (101.928)	0.023
Very small LDL, nmol/l*	633.083 (211.933)	356.455 (323.084)	361.917 (414.583)	0.033
HDL particle concentrations				
HDL total, $\mu$ mol/l*	33.958 (4.137)	31.336 (5.765)	30.425 (5.902)	NS
Large HDL, $\mu$ mol/l*	7.392 (2.962)	9.930 (3.847)	9.667 (3.118)	NS
Medium HDL, $\mu$ mol/l*	4.458 (2.615)	2.048 (2.560)	2.133 (1.571)	0.009
Small HDL, $\mu$ mol/l*	22.100 (4.046)	19.359 (5.143)	18.625 (6.014)	NS
Mean particle size				
VLDL, nm*	45.108 (6.113)	52.218 (12.344)	52.692 (9.913)	NS
LDL, nm*	20.733 (0.425)	21.768 (0.823)	21.775 (0.882)	< 0.0001
HDL, nm*	8.900 (0.283)	9.457 (0.500)	9.425 (0.512)	0.002
Remnant lipoprotein cholesterol (RLPc)				
RLPc, mg/dl <sup>†</sup>	4.059 (3.515–10.219)	4.295 (3.219–5.706)	3.688 (2.543–5.673)	NS

\* Values mean (SD). <sup>†</sup> Values are median (IQR). All p values adjusted for age, BMI, blood pressure (systolic and diastolic), and tobacco use. For definitions see Table 2.

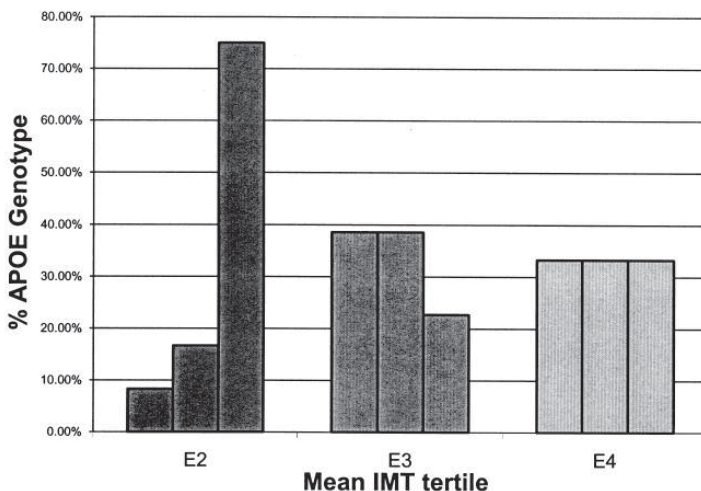


Figure 2. APOE genotype frequency organized by IMT tertiles. APOE2 genotype frequency tended to increase with degree of IMT, and for mean and maximum IMT values, but reaching statistical significance only with mean IMT values; 1st tertile (n = 1): 8.3%, 2nd tertile (n = 2): 16.7%, 3rd tertile (n = 9): 75%. Conversely, subjects carrying the  $\epsilon 3$  and  $\epsilon 4$  alleles did not show this tendency; 1st tertile (n = 17): 38.6%, 2nd tertile (n = 17): 38.6%, 3rd tertile (n = 10): 22.7%; and 1st tertile (n = 4): 33.3%, 2nd tertile (n = 4): 33.3%, 3rd tertile (n = 4): 33.3%, respectively. Statistical significance was reached (chi-square test) comparing  $\epsilon 2$  and  $\epsilon 4$  distribution against the common  $\epsilon 3$  allele;  $\epsilon 2$  vs  $\epsilon 3$ ,  $p = 0.003$ ;  $\epsilon 4$  vs  $\epsilon 3$ , NS.

mIMT and maxIMT independently of diastolic or systolic blood pressure, smoking habit, age, and BMI.

Our study population was composed mainly of women between the ages of 17 and 81 years, who were normolipidemic. However, despite the normolipidemia, up to 20% of them had pathological values of mIMT adjusted for age and sex.

Conventionally measured lipids showed nonsignificant correlations with mIMT. The correlations were positive for total cholesterol, TG, and LDLc, and negative for HDLc. Of note, the only traditional lipid measure that was almost significantly associated with atherosclerosis in this population was plasma TG, and this finding supports the notion that TG-driven atherogenic dyslipidemia is important in this disease. All VLDL and Qm subclasses correlated positively with IMT (mean as well as maximal values), and this supports the proposition that TG-rich lipoproteins make an important contribution to the atherosclerotic process in these patients.

Lipoproteins that are more difficult to clear from circulation, particularly in the presence of hypertriglyceridemia, are termed “remnants” and have been well documented as being associated with atherosclerosis<sup>24</sup>. We measured TG-rich lipoprotein remnants (IDL) and the cholesterol transported by lipoprotein remnants (RLPc) isolated by immunoaffinity separation. Both measurements were positively and statistically significantly associated with mIMT.

Lipoprotein subclasses of LDL and HDL have different roles in atherosclerosis and were reflected as such in our patient population<sup>25,26,27,28</sup>. While the small, medium-small, and very small subclasses were positively associated with mIMT, the large LDL subclass showed an inverse correlation.

A similar trend was observed for HDL; the large HDL subclass was inversely associated with atherosclerosis while the smaller and denser subclasses tended to correlate positively with mIMT. It has been well documented that small HDL may become proinflammatory and proatherogenic in certain environments<sup>29,30,31</sup>.

These results are in good agreement with current understanding of the role of lipoprotein subclasses, in which the importance of these subclasses as a proatherogenic or a protective factor in SLE has been proposed<sup>25,26,27,28</sup>. Overall, our results suggest that the smaller the particles, the more atherogenic they are. This is confirmed by the inverse correlation between VLDL, LDL, and HDL subclasses and IMT — mIMT as well as maxIMT.

To translate these associations into potential clinical value, we divided study patients into tertiles of mIMT values, and compared particle concentration for each subclass. The only indicator that was able to differentiate subjects in each category of mIMT was the IDL subclass, or remnants of the VLDL particles, which reportedly play an important role in the progression of atherosclerotic

plaques<sup>32,33</sup>. This is in agreement with the results of multiple linear regression analyses that showed that the model that best explained IMT progression included IDL particles.

In a similar study, Chung and colleagues concluded that NMR lipoprotein subclasses do not correlate with the degree of coronary atherosclerosis<sup>34</sup>. This is not necessarily in contradiction to our findings. While Chung, *et al* compared these measures between SLE patients and control individuals or between patients with and without coronary atherosclerosis, we compared our NMR findings with the more subtle indicators of atherosclerosis, i.e., IMT of the carotid artery. While most subclasses of one type or another may relate to atherosclerosis in SLE patients and controls, we have shown that the concentrations of IDL particles do differentiate SLE patients with low, medium, or high degree of atherosclerosis.

Since the removal of lipoproteins from the circulation, particularly TG-rich lipoproteins, is mediated by apolipoprotein E, and IDL appears to be the most potent lipoprotein risk factor in atherogenesis in these patients, we hypothesized that the APOE genotype could be a significant modulator of this process. We observed that carriers of the  $\epsilon 2$  allele had significantly elevated concentrations of the IDL subclasses, as well as small, medium-small, and very small LDL, and also had significantly lower concentrations of the protective large LDL. This suggests that the  $\epsilon 2$  allele may be an atherosclerosis risk factor in these patients. This was confirmed by the increasing frequency of the allele in the IMT tertiles, an aspect that did not occur with the  $\epsilon 3$  or  $\epsilon 4$  alleles. These findings confirm those of a study by Orlicchio, *et al*, in which the  $\epsilon 2$  allele in SLE patients was associated with more rapid development of cardiovascular disease (CVD)<sup>35</sup>, as would occur in other conditions of accelerated atherosclerosis linked to accumulation of IDL in the presence of  $\epsilon 2$  homozygosity<sup>36</sup>. However, this is contrary to what is found in the general population, i.e., the  $\epsilon 4$  allele is associated with increased cholesterol concentrations and CVD risk. Thus, considering that apoE2 isoform has less affinity to LDL receptor (LDLR) family members (LDLR, LDLR-related protein 1, VLDLR) under high remnant concentration conditions, it is feasible that in patients with SLE this isoform is more closely associated with atherosclerosis<sup>37,38</sup>.

One limitation of our study was the small patient population, which may account for statistical significance not achieved in some of the correlations. However, the trends observed were internally consistent; their associations with IMT were confirmed in the comparisons within the IMT tertiles and by multiple regression analysis.

Another limitation could be the lack of control individuals. However, the study was designed to investigate the lipid and lipoprotein measures that were more informative in relation to subclinical atherosclerosis, i.e., thickening of carotid artery in this normolipidemic population. Com-

paring these lipoprotein measures in patients with low and high degree of IMT, the objective consisted of identifying probable mechanisms that promote atherosclerosis in patients with SLE.

We have shown that lipoprotein subclasses are more informative than the routinely measured lipid indicators when assessing atherosclerosis risk in patients with SLE. Remnant lipoproteins correlated significantly and positively with median IMT. The IDL fraction had the highest correlation with IMT and was strongly modulated by the APOE genotype.

## REFERENCES

1. Asanuma Y, Oeser A, Shintani AK, Turner E, Olsen N, Fazio S, et al. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349:2407-15.
2. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, Conte CG, Medsger TA Jr, Jansen-McWilliams L, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1997;145:408-15.
3. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, du Berger R, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;44:2331-7.
4. Frostegård J. Atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1776-85.
5. Dhawan SS, Quyyumi AA. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease. *Curr Artheroscler Rep* 2008;10:128-33.
6. Dahl-Jørgensen K, Larsen JR, Hanssen KF. Atherosclerosis in childhood and adolescent type 1 diabetes: early disease, early treatment? *Diabetologia* 2005;48:1445-53.
7. Borba EF, Bonfá E. Dyslipoproteinemias in systemic lupus erythematosus: influence of disease, activity, and anticardiolipin antibodies. *Lupus* 1997;6:533-9.
8. Borba EF, Santos RD, Bonfa E, Vinagre CG, Pileggi FJ, Cossermelli W, et al. Lipoprotein(a) levels in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994;21:220-3.
9. Svenungsson E, Gunnarsson I, Fei GZ, Lundberg IE, Klareskog L, Frostegård J. Elevated triglycerides and low levels of high-density lipoprotein as markers of disease activity in association with up-regulation of the tumor necrosis factor alpha/tumor necrosis factor receptor system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003;48:2533-40.
10. Roman MJ, Shanker BA, Davis A, Lockshin MD, Sammaritano L, Simantov R, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349:2399-406.
11. Tribble DL, Krauss RM, Lansberg MG, Thiel PM, van den Berg JJ. Greater oxidative susceptibility of the surface monolayer in small dense LDL may contribute to differences in copper-induced oxidation among LDL density subclasses. *J Lipid Res* 1995; 36:662-71.
12. Mahley RW, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest* 2007;117:94-8.
13. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
14. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma,



- without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
15. Polak JF, O'Leary DH, Kronmal RA, Wolfson SK, Bond MG, Tracy RP, et al. Sonographic evaluation of carotid artery atherosclerosis in the elderly: relationship of disease severity to stroke and transient ischemic attack. *Radiology* 1993;188:363-70.
  16. Coll B, Parra S, Alonso-Villaverde C, Aragonés G, Montero M, Camps J, et al. The role of immunity and inflammation in the progression of atherosclerosis in patients with HIV infection. *Stroke* 2007;38:2477-84.
  17. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al; American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr* 2008;21:93-111.
  18. Junyent M, Gilabert R, Nunez I, Corbella E, Vela M, Zambon D, et al. Ecografía carotídea en la evaluación de aterosclerosis preclínica. Distribución de valores del grosor íntima-media y frecuencia de placas de ateroma en una cohorte comunitaria española. *Med Clin (Barc)* 2005;125:770-4.
  19. Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunoaffinity mixed gels. *Clin Chim Acta* 1993;223:53-71.
  20. Campos E, Nakajima K, Tanaka A, Havel RJ. Properties of anapolipoprotein E-enriched fraction of triglyceride-rich lipoproteins isolated from human blood plasma with a monoclonal antibody to apolipoprotein B-100. *J Lipid Res* 1992;33:369-80.
  21. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
  22. Silink M, Mbanya JC. Global standarization of the HbA1c assay — the consensus committee recommendations. *Diabetes Voice* 2007;52:33-4.
  23. Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000;1:507-37.
  24. McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, et al. Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2001;154:229-36.
  25. Superko HR, Gadesam RR. Is it LDL particle size or number that correlates with risk for cardiovascular disease? *Curr Atheroscler Rep* 2008;10:377-85.
  26. Cromwell WC, Otvos JD. Low-density lipoprotein particle number and risk for cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2004;6:381-7.
  27. Sacks FM, Campos H. Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: A reappraisal. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4525-32.
  28. Jia L, Wu X, Fu M, Xu Y, Tian Y, Tian H, et al. Relationship between apolipoproteins and the alteration of HDL subclasses in hyperlipidemic subjects. *Clin Chim Acta* 2007;383:65-72.
  29. Jahangiri A. High-density lipoprotein and the acute phase response. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:156-60.
  30. McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace DJ, Thong BY, et al. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:2541-9.
  31. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, et al. The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:831-42.
  32. Steiner G, Schwartz L, Shumak S, Poapst M. The association of increased levels of intermediate-density lipoproteins with smoking and with coronary artery disease. *Circulation* 1987;75:124-30.
  33. Nordestgaard BG, Agerholm-Larsen B, Mortensen A, Fischer Hansen B, Fischer Hansen J, Ibsen P, et al. Intermediate density lipoprotein cholesterol as the best lipoprotein predictor of atherosclerosis severity in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis* 1997;132:119-22.
  34. Chung CP, Oeser A, Raggi P, Solus JF, Avalos I, Linton MF, et al. Lipoprotein subclasses and particle size determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008;27:1227-33.
  35. Orlacchio A, Bruce IN, Rahman P, Kawarai T, Bernardi G, St George-Hyslop PH, et al. The apolipoprotein E2 isoform is associated with accelerated onset of coronary artery disease in systemic lupus erythematosus. *Med Sci Monit* 2008;14:CR233-7.
  36. Smelt AH, de Beer F. Apolipoprotein E and familial dysbetalipoproteinemia: clinical, biochemical, and genetic aspects. *Semin Vasc Med* 2004;4:249-57.
  37. Ruiz J, Kouivskaia D, Migliorini M, Robinson S, Saenko EL, Gorlatova N, et al. The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J Lipid Res* 2005;46:1721-31.
  38. Lee SJ, Grosskopf I, Choi SY, Cooper AD. Chylomicron remnant uptake in the livers of mice expressing human apolipoproteins E3, E2 (Arg158—>Cys), and E3-Leiden. *J Lipid Res* 2004;45:2199-210.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



## Changes in lipoprotein composition, density, particle size, and particle number during healthy ageing: the *Vitage* Project.

---

Josep Ribalta, Rosa Solà, Joan Carles Vallvé, Josefa  
Girona, Gemma Godàs, Mercedes Heras, Roger Mallol,  
Marta González, Xavier Correig, Edmon Rock, Brigitte M  
Winklhoffer-Roob, Montse Guardiola i Lluís Masana.

Under submission 2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

## **Changes in lipoprotein composition, density, particle size, and particle number during healthy ageing: the *Vitage* Project**

Josep Ribalta<sup>1</sup>, Rosa Solà<sup>1</sup>, Joan Carles Vallvé<sup>1</sup>, Josefa Girona<sup>1</sup>,  
Gemma Godàs<sup>1</sup>, Mercedes Heras<sup>1</sup>, Roger Mallol<sup>2</sup>, Marta González<sup>1</sup>,  
Xavier Correig<sup>2</sup>, Edmond Rock<sup>3</sup>, Brigitte M Winklhofer-Roob<sup>4</sup>,  
Montse Guardiola<sup>1</sup>, Lluís Masana<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina,  
Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, Universitat Rovira i  
Virgili, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, CIBERDEM, Reus,  
Spain

<sup>2</sup>Center for Omic Sciences (COS) - Institut d'Investigació Sanitària  
Pere Virgili (IISPV) - Universitat Rovira i Virgili (URV), Tarragona,  
Spain

<sup>3</sup> UMMM, INRA-Theix, St. Genes Champanelle, France

<sup>4</sup> Human Nutrition & Metabolism Research and Training Center,  
Institute of Molecular Biosciences, Karl-Franzens University, Graz,  
Austria

**For correspondence:**

Josep Ribalta, PhD

Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi,

Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili

Sant Llorenç, 21,

43201 Reus,

Spain

Tel: +34 977 759367, Fax: +34 977 759322

E-mail. [josep.ribalta@urv.cat](mailto:Josep.ribalta@urv.cat)

Keywords: Remnant lipoprotein, age, lipoprotein subclasses

## **ABSTRACT**

### Background

We hypothesize that lipid and lipoprotein changes associated with ageing in healthy subjects may be different from those reported in the general population.

### Methods

Healthy non-smoking males (n=299) between 20 and 75 years were selected to avoid any chronic disease or factor known to significantly alter lipid metabolism. We analyzed the age effect on total lipids and apolipoproteins, lipoproteins isolated by sequential preparative ultracentrifugation, NMR subclass distribution, and the cholesterol content of remnant-like particles.

### Results

Total cholesterol and LDLc significantly increased with age ( $R^2=0.203$ ,  $p<0.0001$ ;  $R^2=0.172$ ,  $p<0.0001$ ; respectively) whereas triglycerides did not vary significantly. HDLc had a very modest increase ( $R^2=0.045$ ,  $p<0.001$ ). Increased of total LDL particles was confined to the largest (and protective) LDL subclass ( $R^2=0.104$ ,  $p<0.0001$ ), while increase of HDL particles was confined to the



smallest and less efficient HDL subclass ( $R^2=0.062$ ,  $p=0.001$ ).  
Remnant particles showed different trends, while IDL (VLDL  
remnants) significantly increased with age (IDLc: +72%,  $p<0.0001$ ;  
IDL particle: +200%,  $p=0.053$ ), RLPc remained unchanged.

### Conclusions

In healthy males, total cholesterol increased with age while triglycerides did not vary. Compared with published data from general populations, HDL did not decrease with age while LDL increased progressively up to the age of 75 years. Lipoprotein remnants showed different trends: IDL doubled their particle number with age, while RLPc did not vary significantly. NMR analysis of particle number and size highlighted important size-related differences that were not observed using ultracentrifugation for the separation of lipoproteins.

## INTRODUCTION

Lipids have critical functions in cellular energy storage, structure and signaling, and play key roles in several human diseases. Many studies (1,2) have indicated that elevated total cholesterol and, particularly, LDL cholesterol (LDLc) are risk factors for atherosclerosis and coronary heart disease (CHD) in the general population. HDL cholesterol (HDLc) has a protective role and triglycerides (TGs) are key in atherogenic changes such as the generation of smaller particles that are difficult to clear from circulation (lipoprotein remnants) (3). Whether TG *per se* are an independent risk factor, is a matter of debate (4).

What is known about lipoprotein changes during ageing? For more than 30 years evidence has existed that total and LDLc increase with age in young and middle-aged adults in the general population (5–8). In those over 65 years of age, however, total and LDLc decrease with progressive age (9–13). HDL, on the other hand, does not vary much in cross-sectional studies (5,9,11) whereas it decreases with age in most prospective, longitudinal studies (7,8,14). BMI changes are a strong predictor of age-related lipid changes (14) and, since BMI also increases with age, it is difficult to distinguish the individual contribution of each of these components.

Most studies are conducted in general populations containing healthy as well as diseased members, or in specifically diseased sub-populations. To the best of our knowledge the present study is the first to assess the effect of ageing alone in an ostensibly healthy population, without the interference of any chronic disease condition. Of note is that in an otherwise normal population, lipid abnormalities are often not evident in routine analysis or even when more specialized methods such as sequential ultracentrifugation are used. Conditions such as obesity, diabetes mellitus (DM) and the metabolic syndrome (MetS) with “apparently normal” lipid profiles may obscure atherogenic lipoprotein abnormalities such as small LDL, small HDL or lipoprotein remnants. We have previously confirmed these “abnormal” lipoproteins in various sub-populations such as young people (15), patients with HIV (16), SLE (17), and RA (18).

In the present study we assessed the influence of age on lipids and lipoproteins by performing 4 different sets of analyses: 1) Routine clinical analyses of total cholesterol, total TG, calculated LDLc, HDLc isolated by precipitation, and total apolipoproteins; 2) Cholesterol, TG and apolipoprotein content as well as density of lipoproteins (Sequential ultracentrifugation); 3) Particle number and size of lipoproteins using NMR (19); 4) Cholesterol content of the difficult-to-clear-from-circulation remnant-like particles (RLP) (3). The aim of the

present study was to analyze systematically the changes in lipids and lipoproteins of healthy individuals at different ages selected from the general population, in the absence of any chronic disease or condition known to alter the concentrations of the circulating lipoproteins.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects**

In this cross-sectional study, 299 healthy, non-smoking males (0 cigarettes/day for >6 months), aged 20–75 years (stratified by age), were recruited in Clermont-Ferrand, France (n=98), Graz, Austria (n=101), and Reus, Spain (n=100) as part of a European Commission-funded research and technology development project of the 5th Framework Program [details in (20)]. All ages were proportionally represented and reflected the age distributions in the population (See Supplemental Figure 1).

Methodology was standardized between recruitment centers. A physician conducted a personal interview with the potential recruit to gather anthropometric data, personal history, lifestyle, use of medications, physical activity, smoking habits, and use of dietary supplements containing vitamins or trace elements. Exclusion criteria were familial hypercholesterolemia, chronic diseases (including

diabetes, cancer, cardiac insufficiency, neurological diseases, inflammatory diseases and chronic diseases of the liver, lung, or thyroid, unstable hypertension, dementia, and infectious diseases known to affect the immune system such as human immunodeficiency virus and hepatitis C), vaccination during the previous 2 months, alcohol abuse or drug addiction, competitive sports activities, and the consumption of special diets or dietary supplements in the previous 3 months. The study protocol was approved by the Ethics Committees of the three recruiting centers, and written informed consent was obtained from all participants.

### **Standard lipid profile and biochemical analyses**

Standard laboratory methods were used to quantify glucose, HbA<sub>1c</sub>, total cholesterol, TG and HDLc. LDLc was calculated by the Friedewald formula (21). Apolipoproteins were measured with immunoturbidimetry using antisera specific for apoA-1 and apoB (Hoffman-La Roche) and lipoprotein (a) (Incstar Corporation, Stillwater, MN, USA). High-sensitive CRP (hs-CRP) was measured with a high sensitive near-infrared particle immunoassay (NIPIA) rate methodology (Beckman Coulter) on a SYNCHRON LXi PRO System automated autoanalyzer (Beckman Coulter).

### **Sequential preparative ultracentrifugation**

Lipoproteins were separated by sequential preparative ultracentrifugation, using a Kontron 45.6 fixed-angle rotor in a Centrikon 75 (Kontron Instruments, Italy). The lipoprotein fractions isolated were very low density lipoprotein (VLDL;  $d < 1.006$  g/ml), intermediate density lipoprotein (IDL;  $d = 1.006-1.019$  g/ml) and low density lipoprotein (LDL;  $d = 1.019-1.063$  g/ml). Total HDLc was measured subsequent to the precipitation of the apoB-containing lipoproteins with polyethylene glycol (Immuno AG, Austria).

### **NMR lipo-profile**

Total plasma lipids and the distribution of subclasses of lipoproteins were analyzed by NMR spectroscopy (NMR Lipo-Profile, Raleigh, USA). The procedure simultaneously quantifies subclasses of lipoproteins, lipid content, and average particle size. This technique allows for the determination of VLDL, IDL, LDL, and HDL. Further, the VLDL fraction is quantified as three discrete subclasses, LDL as four subclasses and HDL as three subclasses, all according to increasing molecular weight (19). The NMR was performed with EDTA plasma stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and thawed just prior to the analyses which were conducted on a subset of 198 samples from the Spanish and French recruitment centers.

## **Separation and quantification of remnant lipoprotein (RLP)**

Remnant lipoprotein cholesterol (RLPc) was measured in plasma using the method described by Nakajima et al., using RLP-Cholesterol Assay Kits (Jimro-II, Japan Immunoresearch Laboratories, Japan) (22).

The remnant-lipoprotein particles were separated from plasma by immuno-affinity chromatography with a gel containing monoclonal antibodies raised against epitopes of apoB100 and apoA1. The anti-apoA1 recognized apoA1-containing lipoproteins while the anti-apoB100 recognized all apoB100-containing lipoproteins except the partially-lipolyzed apoE-enriched triglyceride-rich remnants. The suspension was gently mixed for 2h at room temperature with vertical magnetic-bead oscillator (RLP Mixer J-100A, Photal, Otsuka Electronics, Japan). The mixture was allowed to settle for 30 min, and 200  $\mu$ l of the supernatant containing unbound fraction was taken for the measurement of cholesterol in a sensitive assay developed for a Cobas Mira centrifugal analyzer (Roche, Laval, Quebec).

## **Statistical analyses**

Except when otherwise stated, all data are presented as mean and standard deviation in parenthesis. Normal distribution was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. Variables were log-transformed

when non-normally distributed. Comparisons of means between variables were performed with ANCOVA, following adjustment for potentially confounding variables. Partial correlations between continuous variables were with the Pearson's correlation coefficient, following adjustment for BMI. Backward stepwise multiple linear regression analyses were performed to determine the contributions of age, BMI and energy intake to the variability in lipids and lipoproteins. Statistical significance was set at the  $p < 0.05$  level. The SPSS (version 19.0) was used for all statistical analyses.

## **RESULTS**

### **STUDY SUBJECTS**

We studied a total of 299 non-smoking, ostensibly healthy, males aged 20-75 years from the areas of Clermont-Ferrand (France), Graz (Austria), and Reus (Spain). There were no significant differences in mean age, BMI, plasma cholesterol or TG levels between countries. Hence, data from all subjects were pooled for the statistical analyses (Table 1).

Since in the healthy males, BMI positively correlated with age ( $R^2=0.072$ ,  $p < 0.001$ ), being the oldest group (70-75 years) 9% higher compared to the youngest (20-29 years) (25.9 vs. 23.7 kg/m<sup>2</sup>;



$p=0.022$ ); all the results are adjusted by BMI. BMI increased by an average of  $0.05 \text{ kg/m}^2$  per year.

### LIPID CHANGES WITH AGE

Table 2 summarizes the lipid and lipoprotein differences segregated by age groups.

#### Age-related changes in routinely-measured lipid variables

Total cholesterol and LDLc (calculated by the Friedewald formula) significantly increased with age ( $R^2=0.203$ ,  $p<0.0001$ ;  $R^2=0.172$ ,  $p<0.0001$ ; respectively; adjusted for BMI). Mean plasma cholesterol concentration was 27% higher in healthy males aged 70-75 years compared to those aged 20-29 years; such an increase being of 48% in the LDLc at a rate of increase of  $0.9 \text{ mg/dL/y}$  ( $p<0.0001$ ). This increase was not explained by an increase in dietary cholesterol intake, which was observed to decrease with age ( $R^2=-0.013$ ,  $p=0.098$ ). In this group of healthy men, total cholesterol and calculated LDLc concentration significantly increased up to the age of 75 years. This is contrary to the decrease observed in the general population after the 5<sup>th</sup> or 6<sup>th</sup> decades of life (Table 2, Figure 1).

In contrast, total TG concentration did not vary with age ( $R^2=0.0001$ , NS, adjusted for BMI) (Figure 1), despite the concentration of

circulating free fatty acids being significantly increased ( $R^2=0.053$ ,  $p<0.0001$ , adjusted for BMI). This, as well, was not explained by dietary intake i.e. intake of fatty acids whether saturated ( $R^2=-0.038$ ,  $p=0.001$ ), monounsaturated ( $R^2=-0.004$ , NS) or polyunsaturated ( $R^2=-0.033$ ,  $p=0.002$ ) decreased with age.

HDLc concentration moderately, but significantly, increased with age ( $R^2=0.045$ ,  $p<0.0001$ , adjusted for BMI) (Figure 1); albeit at a lower proportion than calculated LDLc (3% higher in the oldest group compared with the youngest). This represents an average increase of 0.027 mg/dL per year and, reflects a moderate, but highly significant, increase in the LDLc/HDLc ratio ( $R^2=0.023$ ,  $p=0.006$ , adjusted for BMI).

Apolipoproteins AI, B-100, C-III and E followed the same pattern of changes of those lipoproteins in which they constitute the major components (Figure 1, Table 2).

#### Sequential ultracentrifugation: age-related lipoprotein changes in lipid content and density

Routine clinical chemistry analyses showed an increase in cholesterol with age, while TG remained relatively constant. Since cholesterol and TG are differentially distributed among lipoproteins,

we explored changes in the cholesterol, TG and apolipoprotein content of VLDL, IDL, LDL and HDL, isolated by ultracentrifugation.

Increase in total cholesterol was due mostly to IDLc elevation (72%) followed by LDLc (45%) and a modest, but significant, increase in HDLc (7%). The non-variability of TG was due to the lack of change in VLDL-TG. With respect to apoB100 particles, as with particle number, the elevation was due to LDL (45%), and IDL (48%) (See Supplemental Figure 2).

Although neither VLDL cholesterol nor triglycerides increased with age (Table 2), IDL (VLDL remnants) continued to accumulate in circulation over the years ( $R^2=0.060$ ,  $p<0.0001$ , adjusted for BMI). Conversely, RLPc remained relatively unchanged over the years; almost 60% of its individual variability being explained by VLDLc concentration. Approximately 15% of the volunteers, of all ages, had high RLPc concentrations ( $>10$  mg/dL).

We performed linear regression analysis to identify the factors influencing cholesterol and TG variability in our study populations. While age was the strongest, and the only significant, predictor of cholesterol changes, BMI was the only significant predictor of TG concentrations (See Supplemental Table 1). Consistent with this was that VLDL and RLPc concentrations were determined mainly by BMI,

while LDLc was determined mainly by age. Variations in HDL and IDL concentrations were explained by both age and BMI.

### Nuclear magnetic resonance: age-related changes in lipoprotein particle number and particle size

Age changes assessed by standard routine analyses and ultracentrifugation provide information on cholesterol and TG content whereas, in relation to atherosclerosis, particle number and size are important characteristics of lipoproteins; data which can be gathered by NMR analyses.

Lipid content of VLDL separated by ultracentrifugation does not vary with age. However, when evaluated in relation to NMR subclasses, VLDL particle numbers in the smallest VLDL subclass increases 43% with age ( $R^2=0.060$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 2). IDL particles were doubled in healthy males aged 70-75 years compared to those aged 20-29 years despite not reach statistical significance ( $p=0.053$ ). There is a significant increase in LDL particles (43%;  $R^2=0.047$ ,  $p=0.004$ ) which appears to be confined to the largest LDL subclass (42%;  $R^2=0.104$ ,  $p<0.0001$ ) (Figure 3), while the moderate, but significant, increase in HDL particles (12%;  $R^2=0.080$ ,  $p<0.0001$ ) is confined to the smallest HDL subclass (14%,  $R^2=0.062$ ,  $p=0.001$ ) (Figure 4).

## DISCUSSION

Age-related changes in lipids and lipoproteins are well described in the general population but, to the best of our knowledge of the literature, no study has described these changes in healthy subjects.

The aim of the EU-supported VITAGE project was to assess vitamin and lipid changes in a population of ostensibly healthy men aged 20 to 75 years recruited with a strict selection criteria to avoid any chronic disease (20).

BMI change is a strong predictor of age-related lipid changes (14) and, since BMI increases with age, all lipid and lipoprotein age-variations have been corrected for BMI changes in the current statistical analyses.

In our healthy male population, total plasma cholesterol increased significantly with age; the increase being more pronounced in older ages. Total plasma TGs did not vary significantly while HDLc had a very modest, but statistically significant, increase. Total cholesterol increase with age was due, mainly, to an elevation of LDLc unrelated to dietary intake of cholesterol which, incidentally, decreased with advancing years. Such a cholesterol increase is in agreement with previous data (5–8). With respect to HDL, published cross-sectional studies indicate very little variation (5,9,11), whereas most prospective studies indicate a decrease with age (7,8,14). Contrary

to these data, we observed a modest, albeit highly significant, increase of HDL with age. This might be a distinctive metabolic feature of healthy ageing, or be related to other characteristics of this population such as being more physically active or having a higher alcohol intake, both factors known to elevate HDLc (23) but which had not been assessed in the current study. Being non-smokers could also contribute to the maintenance of HDLc concentrations despite increasing age.

Studies that systematically analyzed TGs changes with age are lacking. In our study, total TG remained unchanged through all age-ranges, in contrast to circulating FFA which increased with age. Whether TGs are an independent cardiovascular disease risk factor continues to be debated (24). However, there is consensus that they are the predisposing factor in atherogenic lipoprotein remnants such as IDL or RLP, which are known to play a particularly relevant role in pathologies associated with cardiovascular risk such as Type 2 Diabetes and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) (17,25), despite normal LDL concentrations. Of considerable note was that IDLc and RLPc showed different trends i.e. while IDLc significantly increased with age, RLPc did not vary significantly with the years. The immediate conclusion could be that although IDLc and RLPc are both regarded as “remnant” lipoproteins they behave differently *in*

*vivo*. While IDL is well characterized as a VLDL remnant in terms of density and composition, the RLP pool obtained by immunoaffinity chromatography is likely to be more heterogeneous and is far from being well characterized. That RLPc remains unchanged with age supports the notion that these particles are TG-driven since the concentrations of TG, as well, do not vary with age.

The changes in the lipoprotein fractions with age i.e. steady levels of VLDL and increased IDL and LDL (See Supplemental Figure 2) suggest that lipoprotein metabolism in healthy ageing results in a delayed catabolism of IDL and LDL, while the endogenous synthesis of VLDL remains relatively unchanged. Another observation of note in our study was that, in healthy men, the concentrations of total cholesterol and/or LDLc do not decline after the 6<sup>th</sup> decade. This finding is contrary to the well-reported decline in individuals in the population above 65 years of age (9–13). This, as well, could be a characteristic of healthy ageing and could indicate a more active metabolism in these subjects.

Age affects BMI, and these variables, in turn, affect the concentrations of circulating lipids and lipoproteins. Since they are related, we performed multiple regression analyses to discriminate between the factors (age, BMI and energy intake) influencing cholesterol and TG variability in our healthy populations. The results

were clear. While age was the strongest, and only significant, predictor of cholesterol changes, BMI was the only significant predictor of TG concentrations (See Supplemental Table 1). According to this, we have recently described that BMI correlates with an atherogenic lipoprotein profile in this same cohort (26). These findings have considerable practical implications with regards to lipid alterations associated with obesity and MetS. Since the effect of ageing alone on TG is negligible, the implication is that if an individual ages but controls his weight, he could avoid the atherogenic lipoprotein changes accruing from high TG; namely RLPc, smaller LDL particles, and low HDL.

As we have shown previously in conditions such as SLE (17), supposedly normal lipid profiles show alterations in lipoprotein subclasses when evaluated using nuclear magnetic resonance spectrometry, in the course of measuring VLDL, LDL, IDL and HDL subclasses and particle sizes (19). In applying NMR in the analyses of subclasses in our healthy male individuals, we sought to evaluate alterations related to particle number and size, possibly related to healthy ageing. NMR provided additional information to that from ultracentrifugation i.e. lipid composition of particles of a given density range. There appeared to be no change in VLDL (separated by ultracentrifugation), while NMR identified a significant increase in the



particle number of the smallest VLDL. This implies a shift towards a beneficial profile since the smaller VLDL particles (or VLDL2) do not predispose to an atherogenic profile as do VLDL1 particles (27). Similarly, the increase in LDL is confined to the largest (athero-protective) pattern B LDL subclass (28). Conversely, the elevation of HDL is confined to the smaller, and less athero-protective, HDL subclass (29). Unexpectedly, the metabolically related to VLDL, IDL, presents the higher increase, doubling their particle number between the 20-25 and 70-75 years old men. Despite not reach statistical significance, the tendency was clear ( $p=0.053$ ). Of note, IDLc has the mayor increase cholesterol fraction among all the lipoproteins, and although their cholesterol content is not as significant as the transported by the LDL particles, the increases of their particle number could be of special interest in the atherosclerosis process related to ageing. In this line, the Women's Health Study found an association between IDL particle and cardiovascular events in healthy women followed during 11 years (30); and there are found mechanisms through the IDL contribute to atherosclerotic lesion, probably due to a retention process of these lipoproteins in certain areas of intima, as suggested by Öorni et al. (31).

To place our findings in relation to those in the published literature is difficult because of an absence of comparable studies. However, it is

clear that NMR subclass analysis provides more “fine tuning” in the interpretation of lipoprotein changes in normal ageing.

In summary, the conclusions of our study in healthy men are:

- Total and LDLc increased with age while total and VLDL triglycerides did not vary significantly.
- Compared with published data from general populations, HDL did not decrease with age while LDL increased progressively up to the age of 75 years.
- Cholesterol concentrations were influenced mainly by age, while those of TG were affected by BMI.
- Lipoprotein remnants showed different trends; IDL doubled their particle number with age (20 to 75 years), while RLPc did not vary significantly.
- NMR analysis of particle number and size highlighted important size-related differences that were not observed using ultracentrifugation for the separation of lipoproteins.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

EU FP5 Program Quality of Life and Management of Living Resources, Key Action 1, Food, Nutrition, and Health, entitled Vitamin A, Vitamin E, and Carotenoid Status and Metabolism during Ageing: Functional and Nutritional Consequences, acronym VITAGE (Contract QLK1-CT- 1999-00830).

Project PI081579, *Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación*; CIBER in Diabetes and Associated Metabolic Diseases, *Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación*

## **FIGURE LEGENDS**

### Figure 1

Correlations between plasma lipids and age adjusted for BMI. Total cholesterol, calculated LDLc and HDLc significantly increased with the age. Plasma TGs did not vary significantly.

### Figure 2

Correlations between NMR-evaluated VLDL subclasses and age. Although total VLDL did not vary significantly with age, the evaluation of subclasses with NMR revealed an increase in numbers of the smallest VLDL particles.

### Figure 3

Correlations between NMR-evaluated LDL subclasses and age. While total LDL increased significantly with age, the evaluation with NMR indicated that this was more pronounced in the large LDL subclass.

### Figure 4

Correlations between NMR-evaluated HDL subclasses and age. The modest increase in HDL was confined to an increase in particle number of the smallest HDL subclass.

### Supplementary Figure 1

Study subjects recruited to represent all ages in proportion to the general population

### Supplementary Figure 2

Cholesterol, TG and apolipoprotein content of VLDL, IDL, LDL and HDL subclasses isolated by sequential preparative ultracentrifugation, and their relationship with age.

## REFERENCES

1. Peeters A, Mamun AA, Willekens F, Bonneux L. A cardiovascular life history. A life course analysis of the original Framingham Heart Study cohort. *Eur Heart J*. 2002 Mar;23(6):458–66.
2. Menotti A, Blackburn H, Kromhout D, Nissinen A, Adachi H, Lanti M. Cardiovascular risk factors as determinants of 25-year all-cause mortality in the seven countries study. *Eur J Epidemiol*. 2001 Jan;17(4):337–46.
3. Twickler TB, Dallinga-Thie GM, Cohn JS, Chapman MJ. Elevated remnant-like particle cholesterol concentration: a characteristic feature of the atherogenic lipoprotein phenotype. *Circulation*. 2004 Apr 27;109(16):1918–25.
4. Goldberg IJ, Eckel RH, McPherson R. Triglycerides and heart disease: still a hypothesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Aug;31(8):1716–25.
5. Heiss G, Tamir I, Davis CE, Tyroler HA, Rifkind BM, Schonfeld G, et al. Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the lipid research clinics program prevalence study. *Circulation*. 1980 Feb;61(2):302–15.
6. Mouloupoulos SD, Adamopoulos PN, Diamantopoulos EI, Nanas SN, Anthopoulos LN, Iliadi-Alexandrou M. Coronary heart disease risk factors in a random sample of Athenian adults. The Athens Study. *Am J Epidemiol*. 1987

Nov;126(5):882–92.

7. Hershcopf RJ, Elahi D, Andres R, Baldwin HL, Raizes GS, Schocken DD, et al. Longitudinal changes in serum cholesterol in man: an epidemiologic search for an etiology. *J Chronic Dis.* 1982 Feb;35(2):101–14.
8. Anderson KM, Wilson PW, Garrison RJ, Castelli WP. Longitudinal and secular trends in lipoprotein cholesterol measurements in a general population sample. The Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis.* 1987 Nov;68(1-2):59–66.
9. Abbott RD, Garrison RJ, Wilson PW, Epstein FH, Castelli WP, Feinleib M, et al. Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes. The Framingham study. *Arteriosclerosis.* 1983 Jan;3(3):260–72.
10. Ettinger WH, Wahl PW, Kuller LH, Bush TL, Tracy RP, Manolio TA, et al. Lipoprotein lipids in older people. Results from the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group. *Circulation.* 1992 Sep;86(3):858–69.
11. Laurenzi M, Mancini M. Plasma lipids in elderly men and women. *Eur Heart J.* 1988 Mar;9 Suppl D:69–74.
12. Newschaffer CJ, Bush TL, Hale WE. Aging and total cholesterol levels: cohort, period, and survivorship effects. *Am J Epidemiol.* 1992 Jul 1;136(1):23–34.

13. Carroll MD, Lacher DA, Sorlie PD, Cleeman JI, Gordon DJ, Wolz M, et al. Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002. *JAMA*. 2005 Oct 12;294(14):1773–81.
14. Ferrara A, Barrett-Connor E, Shan J. Total, LDL, and HDL cholesterol decrease with age in older men and women. The Rancho Bernardo Study 1984-1994. *Circulation*. 1997 Jul 1;96(1):37–43.
15. Ribalta J, Halkes CJM, Salazar J, Masana L, Cabezas MC. Additive effects of the PPARgamma, APOE, and FABP-2 genes in increasing daylong triglycerides of normolipidemic women to concentrations comparable to those in men. *Clin Chem*. 2005 May;51(5):864–71.
16. Negredo E, Ribalta J, Paredes R, Ferré R, Sirera G, Ruiz L, et al. Reversal of atherogenic lipoprotein profile in HIV-1 infected patients with lipodystrophy after replacing protease inhibitors by nevirapine. *AIDS*. 2002 Jul 5;16(10):1383–9.
17. González M, Ribalta J, Vives G, Iftimie S, Ferré R, Plana N, et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein subclasses and the APOE genotype influence carotid atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2010 Nov;37(11):2259–67.
18. Hurt-Camejo E, Paredes S, Masana L, Camejo G, Sartipy P, Rosengren B, et al. Elevated levels of small, low-density lipoprotein with high affinity for arterial matrix components in patients with rheumatoid arthritis: possible contribution of phospholipase A2 to this atherogenic profile. *Arthritis Rheum*. 2001 Dec;44(12):2761–7.



19. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab Med.* 2006 Dec;26(4):847–70.
20. Rock E, Winklhofer-Roob BM, Ribalta J, Scotter M, Vasson MP, Brtko J, et al. Vitamin A, vitamin E and carotenoid status and metabolism during ageing: functional and nutritional consequences (VITAGE PROJECT). *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2001 Aug;11(4 Suppl):70–3.
21. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972 Jun;18(6):499–502.
22. Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunoaffinity mixed gels. *Clin Chim Acta.* 1993 Dec 31;223(1-2):53–71.
23. Katcher HI, Hill AM, Lanford JLG, Yoo JS, Kris-Etherton PM. Lifestyle approaches and dietary strategies to lower LDL-cholesterol and triglycerides and raise HDL-cholesterol. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2009 Mar;38(1):45–78.
24. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation.* 2007 Jan 30;115(4):450–8.

25. Schaefer EJ, McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Ordovas JM, et al. Elevated remnant-like particle cholesterol and triglyceride levels in diabetic men and women in the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 2002 Jun;25(6):989–94.
26. Guardiola M, Solà R, Vallvé JC, Girona, PhD J, Godàs G, Heras M, et al. Body mass index correlates with atherogenic lipoprotein profile even in nonobese, normoglycemic, and normolipidemic healthy men. *J Clin Lipidol*. Elsevier; 2015 Aug;
27. Adiels M, Borén J, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, et al. Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Aug;25(8):1697–703.
28. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 1988;260(13):1917–21.
29. Asztalos BF, Tani M, Schaefer EJ. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol*. 2011 Jun;22(3):176–85.
30. Mora S, Otvos JD, Rifai N, Rosenson RS, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation*. 2009 Mar 24;119(7):931–9.

31. Oörni K, Posio P, Ala-Korpela M, Jauhiainen M, Kovanen PT. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion of small very low-density lipoprotein and intermediate-density lipoprotein particles and increases their retention to human arterial proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Aug;25(8):1678–83.

**Table 1.** Characteristics of the individuals recruited into the study

Characteristic	All	France	Austria	Spain	p
	N = 299	N = 98	N = 101	N =100	
Age; years	46.13 (15.37)	46.50 (15.19)	45.58 (15.07)	46.33 (15.98)	NS
BMI; kg/m <sup>2</sup>	24.97 (2.66)	24.61 (2.60)	25.18 (2.71)	25.10 (2.66)	NS†
Systolic blood pressure; mmHg	130.27 (13.41)	136.60 (14.40)	130.05 (13.41)	124.35 (9.04)	<0.001
Diastolic blood pressure; mmHg	81.33 (9.07)	80.12 (9.00)	86.01 (8.48)	77.88 (7.77)	<0.001
Plasma glucose; mmol/L	5.13 (0.63)	4.69 (0.55)	5.38 (0.53)	5.31 (0.58)	<0.001

Plasma cholesterol; mmol/L	4.87 (0.93)	4.95 (0.95)	4.89 (1.00)	4.76 (0.83)	NS
Plasma triglycerides; mmol/L	1.08 (0.54)	0.98 (0.53)	1.12 (0.60)	1.12 (0.48)	NS
LDL cholesterol; mmol/L	2.71 (0.72)	2.79 (0.79)	2.69 (0.72)	2.65 (0.63)	NS
HDL cholesterol; mmol/L	1.33 (0.30)	1.32 (0.28)	1.40 (0.31)	1.27(0.30)	0.001
Plasma FFA; $\mu$ mol/L	10537.89 (2332.57)	10197.13 (2397.96)	10599.92 (2215.25)	10802.99 (2366.45)	NS
Plasma APOA1; mg/dL	133.85 (18.71)	136.13 (18.17)	135.65 (18.41)	129.80 (19.05)	0.031
Plasma APOB100; mg/dL	71.72 (17.38)	72.69 (18.23)	70.30 (17.87)	72.20 (16.07)	NS

---

Values are presented as means (standard deviation)

BMI: body mass index; LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein; FFA: free fatty acids; APO: apolipoprotein

All p values were adjusted by age and BMI

† Adjusted for age.

**Table 2.** Lipoprotein variables segregated by age

	20-29 y	30-39 y	40-49 y	50-59 y	60-69 y	70-75 y	Total	p
	n=59	n=52	n=58	n=53	n=55	n=19	n=299	
<b>Plasma total lipids*</b>								
Plasma cholesterol; mmol/L	4.19 (0.68)	4.63 (0.69)	4.85 (0.88)	5.16 (0.94)	5.37 (0.96)	5.33 (0.92)	4.86 (0.93)	<0.0001
Plasma triglycerides; mmol/L	0.96 (0.42)	1.03 (0.55)	1.17 (0.59)	1.20 (0.68)	1.03 (0.45)	1.09 (0.43)	1.08 (0.54)	NS
Plasma LDLc (Friedewald formula); mmol/L	2.53 (0.65)	2.92 (0.62)	3.12 (0.68)	3.30 (0.73)	3.65 (0.88)	3.76 (0.90)	3.14 (0.82)	<0.0001
Plasma HDLc ; mmol/L	1.26 (0.28)	1.26 (0.27)	1.17 (0.30)	1.34 (0.36)	1.33 (0.29)	1.30 (0.24)	1.27 (0.30)	0.049
Lipoprotein(a); mg/dL	19.54 (18.55)	25.33 (23.77)	22.97 (20.82)	26.03 (27.46)	22.21 (16.56)	28.16 (19.37)	23.47 (21.51)	NS

Plasma APOAI; mg/dL	129.47 (17.63)	131.69 (16.96)	128.57 (17.64)	139.77 (21.23)	138.56 (18.33)	137.84 (15.88)	133.76 (18.68)	<0.0001
Plasma APOB100; mg/dL	59.31 (14.07)	68.02 (13.36)	71.34 (14.66)	74.94 (16.06)	80.51 (18.78)	85.32 (16.56)	71.60 (17.30)	<0.0001
Plasma APOCIII; mg/dL	14.63 (2.89)	15.15 (3.97)	16.19 (3.53)	16.08 (3.82)	16.02 (2.85)	16.72 (2.93)	15.68(3.44)	NS
Plasma APOE; mg/dL	3.28 (0.61)	3.44 (0.81)	3.32 (0.71)	3.65 (1.13)	3.66 (0.68)	3.76 (0.62)	3.48 (0.80)	NS; 0.054
Plasma total FFA; µmol/l	9422.7 (1676.5)	10389.0 (2659.9)	10429.7 (2287.1)	11219.9 (2483.6)	11001.7 (2189.0)	11314.2 (2194.0)	10527.2 (2336.0)	0.012
<b>Ultracentrifugation-generated lipoprotein subclasses*</b>								
HDL APOAI; mg/dL	110.22 (16.59)	112.48 (16.74)	107.86 (16.18)	117.36 (19.00)	116.16 (17.17)	114.84 (15.01)	112.84 (17.23)	0.008
HDL cholesterol; mmol/L	1.29 (0.27)	1.31 (0.29)	1.24 (0.31)	1.40 (0.37)	1.39 (0.29)	1.38 (0.23)	1.33 (0.31)	0.005

HDL triglycerides; mmol/L	0.087 (0.034)	0.094 (0.031)	0.097 (0.038)	0.104 (0.036)	0.095 (0.025)	0.103 (0.021)	0.096 (0.033)	NS
IDL APOB; mg/dL	2.27 (1.03)	2.50 (1.21)	2.93 (1.49)	3.00 (1.54)	3.11 (1.56)	3.37 (1.34)	2.80 (1.41)	0.037
IDL cholesterol; mmol/L	0.145 (0.063)	0.173 (0.077)	0.204 (0.120)	0.232 (0.133)	0.223 (0.111)	0.249 (0.080)	0.198 (0.107)	<0.0001
IDL triglycerides; mmol/L	0.078 (0.025)	0.087 (0.032)	0.097 (0.036)	0.101 (0.040)	0.104 (0.039)	0.118 (0.031)	0.095 (0.036)	0.002
LDL APOB; mg/dL	45.42 (12.44)	50.65 (11.31)	54.95 (11.14)	57.62 (13.58)	63.44 (15.74)	65.95 (13.53)	55.06 (14.47)	<0.0001
LDL cholesterol; mmol/L	2.23 (0.60)	2.52 (0.53)	2.63 (0.54)	2.82 (0.65)	3.16 (0.79)	3.24 (0.81)	2.70 (0.72)	<0.0001
LDL triglycerides; mmol/L	0.147 (0.038)	0.161 (0.044)	0.176 (0.048)	0.488 (2.172)	0.195 (0.057)	0.208 (0.056)	0.229 (0.921)	NS
VLDL APOB; mg/dL	2.76 (1.79)	3.17 (2.43)	3.95 (2.68)	3.43 (2.39)	3.18 (2.09)	3.47 (1.61)	3.31 (2.27)	NS
VLDL cholesterol; mmol/L	0.258 (0.193)	0.298 (0.254)	0.378 (0.306)	0.350 (0.318)	0.295 (0.215)	0.293 (0.178)	0.314 (0.258)	NS



VLDL triglycerides; mmol/L	0.536 (0.341)	0.557 (0.452)	0.682 (0.481)	0.671 (0.558)	0.553 (0.365)	0.612 (0.445)	0.600 (0.445)	NS
-------------------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	---------------	----

---

**Nuclear Magnetic Resonance-evaluated lipoprotein subclasses†**

---

Total VLDL & Chylomicron particles; nmol/L	56.90 (28.09)	61.72 (20.14)	69.78 (29.89)	63.78 (24.16)	69.76 (33.15)	65.96 (12.13)	64.13 (26.96)	NS
Large VLDL & Chylomicron particles; nmol/L	1.148 (1.710)	1.481 (2.062)	2.121 (2.342)	1.931 (2.840)	1.009 (1.275)	1.044 (2.136)	1.503 (2.132)	NS
Medium VLDL particles; nmol/L	20.05 (14.74)	17.61 (11.83)	24.27 (18.66)	19.21 (12.37)	20.93 (17.86)	13.99 (9.81)	20.04 (15.06)	NS
Small VLDL particles; nmol/L	35.70 (16.35)	42.63 (13.00)	43.38 (15.63)	42.64 (15.08)	47.83 (19.16)	50.93 (11.80)	42.58 (16.18)	0.050
Total LDL particles; nmol/L	985.79 (278.46)	1052.64 (401.27)	1231.56 (358.15)	1105.86 (307.46)	1239.64 (450.60)	1415.91 (316.95)	1133.23 (371.51)	NS; 0.068

IDL particles; nmol/L	22.86 (27.56)	24.80 (28.82)	35.85 (30.71)	38.55 (29.80)	42.08 (55.27)	68.50 (49.43)	34.52 (37.50)	NS; 0.053
Large LDL particles; nmol/L	401.62 (143.85)	477.81 (187.09)	394.07 (178.76)	487.96 (209.43)	561.14 (235.76)	572.12 (246.78)	467.44 (202.59)	<0.0001
Small LDL particles; nmol/L	561.31 (277.02)	550.03 (431.25)	801.64 (435.75)	579.36 (344.73)	636.42 (467.89)	775.28 (231.36)	631.26 (390.48)	NS
Medium-small LDL particles; nmol/L	116.76 (57.01)	112.97 (84.10)	165.20 (86.57)	119.76 (72.94)	129.33 (96.07)	160.56 (53.45)	130.07 (79.41)	NS
Very small LDL particles; nmol/L	444.54 (221.70)	437.06 (349.97)	636.44 (350.32)	459.60 (272.80)	507.10 (372.71)	614.72 (180.79)	501.19 (312.57)	NS
Total HDL particles; nmol/L	29.85 (4.25)	29.66 (3.66)	30.41 (4.17)	31.12 (4.43)	33.21 (6.54)	33.51 (3.19)	30.96 (4.76)	0.009
Large HDL particles; nmol/L	6.80 (3.09)	6.96 (3.02)	4.87 (3.53)	6.88 (3.44)	7.16 (2.56)	7.38 (2.78)	6.59 (3.20)	NS; 0.076

Medium HDL particles; nmol/L	3.73 (3.24)	3.42 (3.12)	3.53 (2.79)	3.69 (4.44)	3.03 (3.11)	3.99 (2.67)	3.53 (3.34)	NS
Small HDL particles; nmol/L	19.32 (5.15)	19.27 (3.70)	22.00 (4.04)	20.54 (5.07)	23.01 (5.86)	22.14 (2.60)	20.84 (4.92)	0.026
VLDL size; nm	47.43 (9.44)	45.49 (6.13)	45.92 (5.55)	45.60 (8.74)	45.07 (7.47)	44.42 (9.95)	45.89 (7.82)	NS
LDL size; nm	21.24 (0.60)	21.47 (0.83)	20.95 (0.84)	21.35 (0.71)	21.41 (0.69)	21.19 (0.48)	21.28 (0.73)	NS
HDL size; nm	9.02 (0.47)	9.13 (0.54)	8.76 (0.45)	9.11 (0.51)	9.13 (0.35)	9.04 (0.22)	9.03 (0.47)	0.040
<b>Immuno-chromatography lipoprotein subclass (RLPc)†</b>								
RLPc; mg/dL	6.30 (4.80)	6.32 (3.59)	10.23 (10.23)	7.66 (5.97)	6.39 (2.91)	6.58 (2.49)	7.31 (6.01)	NS

Values are presented as mean (standard deviation). BMI: body mass index; VLDL: very low density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; IDL: intermediate density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein; FFA: free fatty acids; APO: apolipoprotein; RLPc: remnant lipoprotein particle cholesterol. All p values adjusted for BMI. \* n = 295. † n = 178

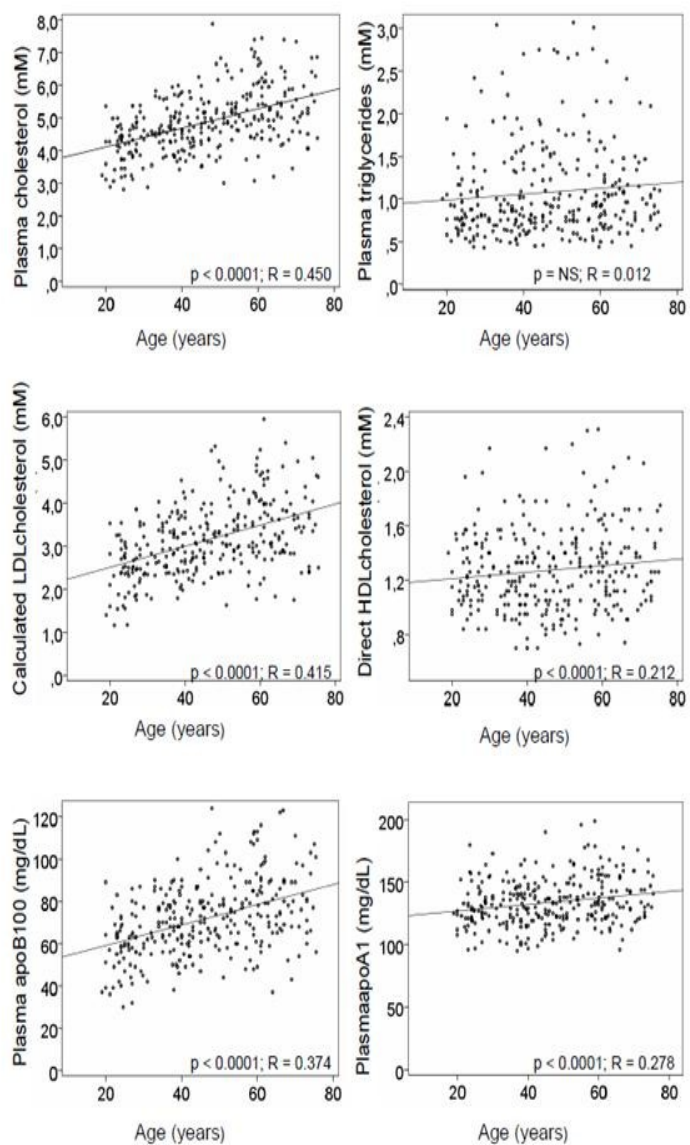


Figure 1  
Correlations between plasma lipids and age adjusted for BMI. Total cholesterol, calculated LDLc and HDLc significantly increased with the age. Plasma triglycerides did not vary significantly

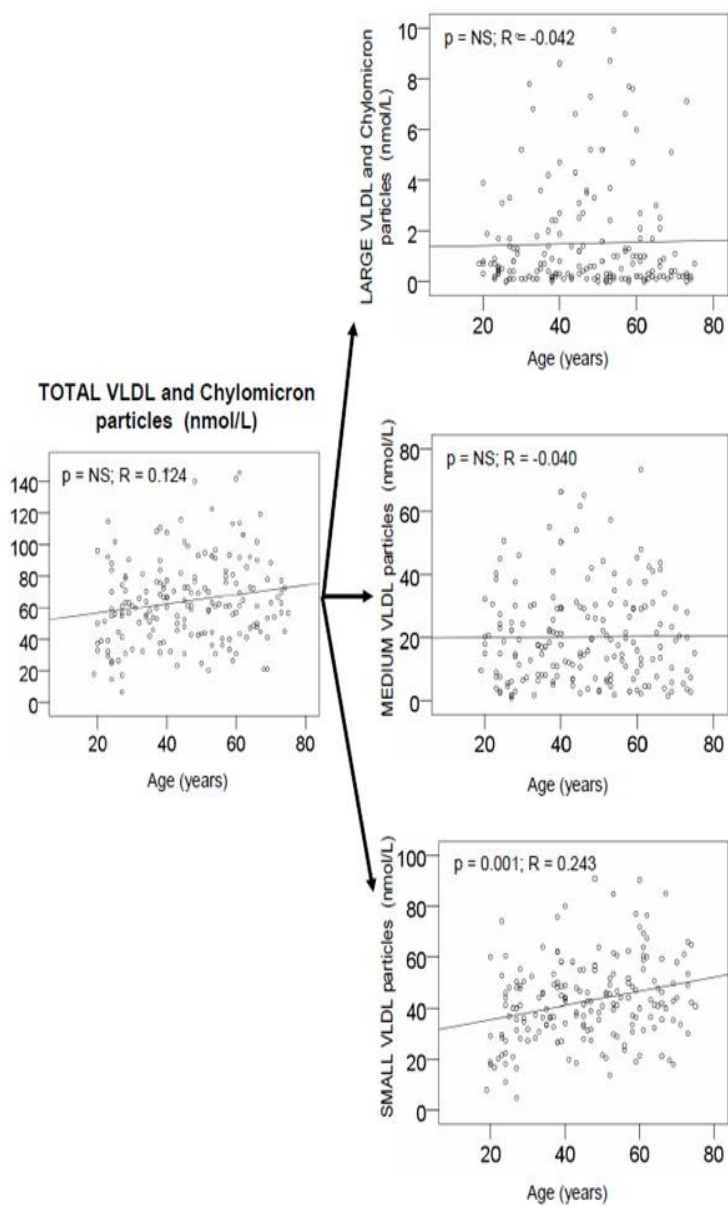


Figure 2  
Correlations between NMR-evaluated VLDL subclasses and age. Although total VLDL did not vary significantly with age, the evaluation of subclasses with NMR revealed an increase in numbers of the smallest VLDL particles.

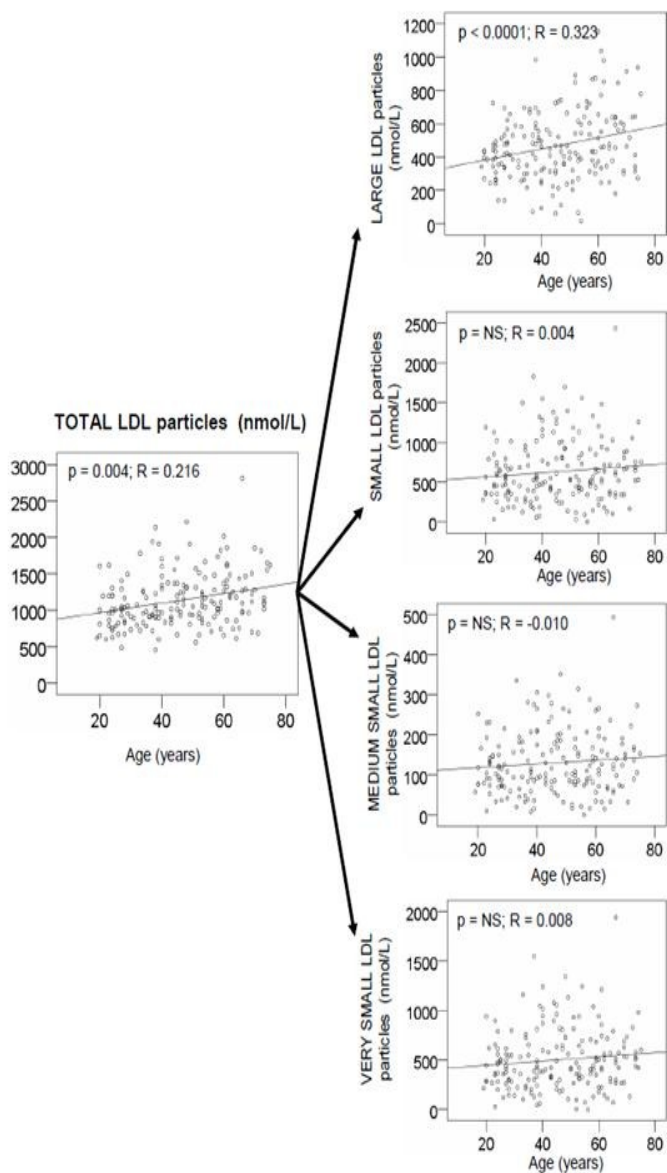


Figure 3  
Correlations between NMR-evaluated LDL subclasses and age. While total LDL increased significantly with age, the evaluation with NMR indicated that this was more pronounced in the large LDL subclass.

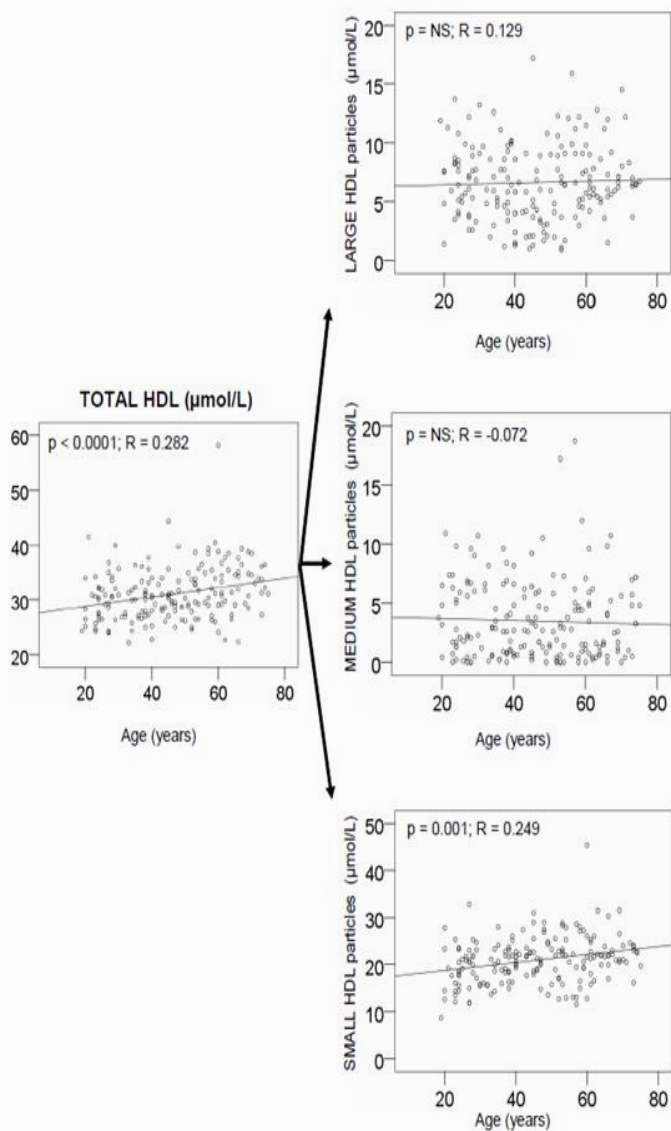
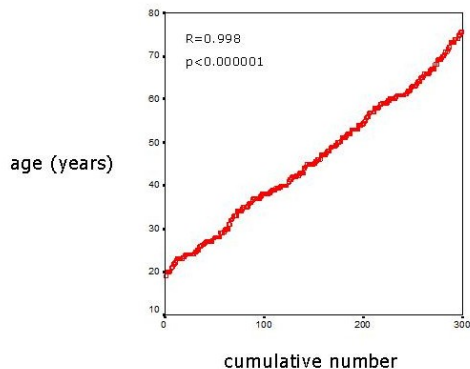
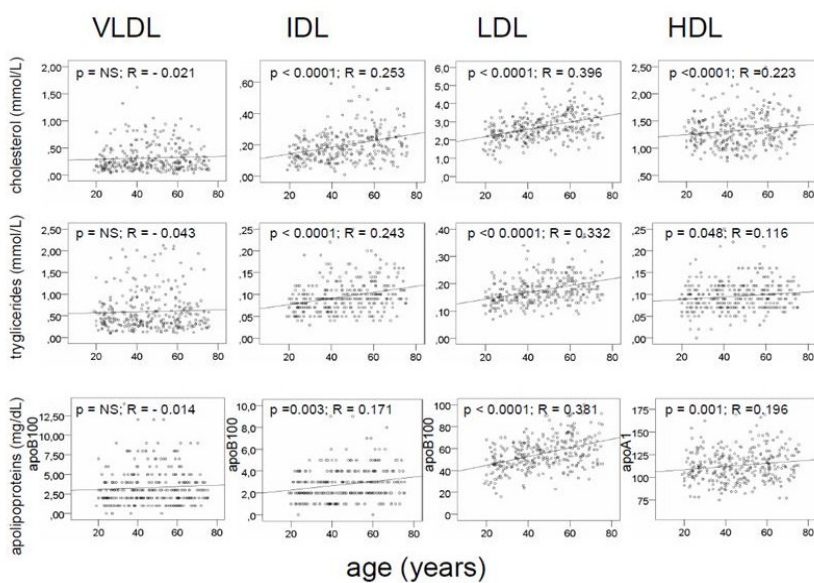


Figure 4  
Correlations between en NMR-evaluated HDL subclasses and age. The modest increase in HDL was confined to an increase in particle number of the smallest HDL subclass.

**Supplemental Figure 1.** Study subjects recruited to represent all ages in proportion to the general population



**Supplementary Figure 2.** Cholesterol, TG and apolipoprotein content of VLDL, IDL, LDL and HDL subclasses isolated by sequential preparative ultracentrifugation, and their relationship with age. Lipoprotein variables segregated by age.









## **BMI correlates with atherogenic lipoprotein profile even in non-obese, normoglycemic, and normolipidemic healthy men.**

---

Montse Guardiola, Rosa Solà, Joan Carles Vallvé, Josefa  
Girona, Gemma Godàs, Mercedes Heras, Marta González,  
Edmon Rock, Brigitte M Winklhofer-Roob, Lluís Masana i  
Josep Ribalta.

J. Clin. Lipidol. 2015; In Press

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

Original Article

## Body mass index correlates with atherogenic lipoprotein profile even in nonobese, normoglycemic, and normolipidemic healthy men

Montse Guardiola, PhD, Rosa Solà, MD, PhD, Joan Carles Vallvé, PhD, Josefa Girona, PhD, Gemma Godàs, BSc, Mercedes Heras, BSc, Marta González, MSc, Edmond Rock, PhD, Brigitte M. Winklhofer-Roob, MD, PhD, Lluís Masana, MD, PhD, Josep Ribalta, PhD\*

*Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi, Departament de Medicina i Cirurgia, Facultat de Medicina, Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, Universitat Rovira i Virgili, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, CIBERDEM, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain (Drs Guardiola, Solà, Vallvé, Girona, Godàs, Heras, González, Masana, Ribalta); Unité de Nutrition Humaine, INRA-UMR 1019, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France (Dr Rock); and Human Nutrition & Metabolism Research and Training Center, Institute of Molecular Biosciences, Karl-Franzens University, Graz, Austria (Dr Winklhofer-Roob)*

### KEYWORDS:

BMI;  
Healthy participants;  
Atherogenic dyslipidemia;  
Lipoprotein;  
NMR

**OBJECTIVE:** To establish a relationship between body mass index (BMI), lipid, and lipoprotein parameters among nonobese, normoglycemic, and normolipidemic healthy men without any cardiovascular, metabolic, or chronic diseases.

**METHODS:** A total of 297 healthy, nonsmoking males between 20 and 75 years were recruited. Exclusion criteria included familial hypercholesterolemia, any chronic diseases, and BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>. Lipid and lipoprotein particles were determined by standard methods, with the use of ultracentrifugation and nuclear magnetic resonance (NMR). Cholesterol in remnant-like particles (RLPc) was also determined.

**RESULTS:** These healthy volunteers were separated into two groups: normoweight (BMI  $> 19$  kg/m<sup>2</sup> and  $< 25$  kg/m<sup>2</sup> [n = 143]) and overweight (BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> and  $< 30$  kg/m<sup>2</sup> [n = 154]). Overweight participants were older ( $P < .001$ ) compared to normoweight. Both groups had low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels ( $< 130$  mg/dL) considered as desirable, and although both groups had plasma triglyceride levels within the nonpathological range, overweight participants presented with 30% higher triglyceride levels ( $P < .001$ ) and 9% lower high-density lipoprotein cholesterol ( $P < .001$ ) compared to normoweight individuals. Although LDL was comparable between groups, NMR analysis showed that overweight participants had 27% more total LDL particles due to a 16% decrease in large LDL ( $P < .001$ ) and 70% increase in the smaller subclasses ( $P < .001$ ). In overweight participants, NMR analysis also showed a 2-fold increase in large very low-density lipoprotein ( $P = .001$ ), and 30% more medium very low-density lipoprotein particles ( $P = .020$ ). Overweight participants also had 70% more intermediate-density lipoprotein particles ( $P = .010$ ), a 30% decrease in large high-density lipoprotein particles ( $P < .001$ ), and a 39% increase in RLPc levels ( $P = .005$ ). Results were adjusted for age and fat intake.

The authors declare that there are no conflicts of interest.

\* Corresponding author. Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç, 21, 43201 Reus, Spain.

E-mail address: [josep.ribalta@urv.cat](mailto:josep.ribalta@urv.cat)

Submitted June 8, 2015. Accepted for publication August 1, 2015.

**CONCLUSION:** BMI correlates with a shift toward a more proatherogenic lipoprotein profile even in individuals whose lipid levels were not elevated.  
© 2015 National Lipid Association. All rights reserved.

## Introduction

The combination of high triglycerides (TGs) and low high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) accompanied by nonpathological or moderately elevated low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) is typically associated with obesity<sup>1</sup> and insulin resistance,<sup>2</sup> and the lipid pattern also linked to the term adiposopathy or adipose tissue dysfunction.<sup>3</sup> Detailed analysis of the lipoprotein profile by sequential ultracentrifugation or nuclear magnetic resonance (NMR) reveals that atherogenic dyslipidemia is characterized by increased numbers of large very low-density lipoproteins (VLDLs) and intermediate-density lipoproteins (IDLs), and smaller low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) particles. In addition, the concentrations of remnant lipoprotein cholesterol in plasma (RLPc) are normally increased with atherogenic dyslipidemia and are an independent cardiovascular disease risk factor.<sup>4</sup>

Abundant scientific evidence demonstrates that clustering of these proatherogenic lipoprotein subclasses is associated with increased cardiovascular risk.<sup>5</sup> For example, we have recently described that the atherogenic subclasses correlate with circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), a key regulator of LDLc concentrations, and are associated with two of the most informative polymorphisms in a key gene regulating TG in circulation, the apolipoprotein A5.<sup>6,7</sup>

The effect of obesity on lipoprotein subclass distribution has been described.<sup>8–11</sup> Similar associations have also been found in healthy subjects. The atherogenic lipoprotein profile determined by ultracentrifugation is correlated with increased cardiovascular risk in healthy overweight subjects<sup>12</sup> and is described to be associated with coronary calcification in postmenopausal women<sup>13</sup> and intima media thickness in healthy men.<sup>14</sup>

We hypothesize that the shift toward an atherogenic lipoprotein profile can be observed even among healthy normoweight subjects.

Therefore, we studied the ultracentrifuge and NMR lipoprotein profiles of a group of nonobese men specifically selected to be free of any clinical conditions.

## Methods

### Subjects

In this cross-sectional study, 297 healthy, nonsmoking men (0 cigarettes/day for >6 months), aged 20 to 75 years

(evenly stratified by age), were recruited in Clermont-Ferrand, France (n = 97), Graz, Austria (n = 100), and Reus, Spain (n = 100) as part of a European Commission-funded research and technology development project of the 5th Framework Program.<sup>15</sup>

Methodology was standardized between recruitment centers. A physician conducted a personal interview with the potential participant to gather anthropometric data, personal history, lifestyle, medications, physical activity, smoking habits, and use of dietary supplements containing vitamins or trace elements.

Obesity was an exclusion criterion in our study, and body mass index (BMI) ranged from 18.9 to 30 kg/m<sup>2</sup>. We separated the participants into two groups: normoweight (BMI > 19 kg/m<sup>2</sup> and <25 kg/m<sup>2</sup> [n = 143]) and overweight (BMI ≥ 25 kg/m<sup>2</sup> and <30 kg/m<sup>2</sup> [n = 154]).

BMI was calculated as weight in kilograms divided by height in squared meters. Body weight and height were measured using calibrated scales and a wall-mounted stadiometer, with subjects wearing light clothes and no shoes.

Exclusion criteria included familial hypercholesterolemia, chronic diseases (including diabetes, cancer, cardiac insufficiency, neurological diseases, inflammatory diseases and chronic diseases of the liver, lung, or thyroid, unstable hypertension, dementia, and infectious diseases known to affect the immune system such as human immunodeficiency virus and hepatitis C), vaccination during the previous 2 months, alcohol abuse or drug addiction, and competitive sports activities. The consumption of fat, special diets, or dietary supplements in the previous 3 months was evaluated with a food frequency questionnaire and a face-to-face discussion with a dietician. The study protocol was approved by the ethics committees of all three recruiting centers, and written informed consent was obtained from all participants.

### Standard lipid profile and biochemical analyses

Glucose was measured using an enzymatic assay based on a trinder GOD-POD method (Spinreact, SA, Spain), adapted to a Cobas Mira Plus autoanalyzer (Roche Diagnostics, Spain). Glycosylated hemoglobin levels were measured using high-performance liquid chromatography (model D-10; Bio-Rad, Hercules, CA), according to the manufacturer's instructions.

Standard laboratory methods were used to quantify total cholesterol, TGs, and HDLc. LDLc was calculated by the Friedewald formula.<sup>16</sup> Apolipoproteins were measured with immunoturbidimetry using antisera specific for apoAI,

apoE, apoCIII, and apoB (Hoffman-La Roche) and lipoprotein (a) (Incstar Corporation, Stillwater, MN). High-sensitive C-reactive protein was measured with a highly sensitive near-infrared particle immunoassay rate methodology (Beckman Coulter) on an SYNCHRON LXI PRO System automated autoanalyzer (Beckman Coulter).

### Sequential preparative ultracentrifugation

Lipoproteins were separated by sequential preparative ultracentrifugation, using a Kontron 45.6 fixed-angle rotor in a Centrikon 75 (Kontron Instruments, Italy). The lipoprotein fractions isolated were VLDL ( $d < 1.006$  g/mL), IDL ( $d = 1.006$ – $1.019$  g/mL), LDL ( $d = 1.019$ – $1.063$  g/mL), and HDL ( $d = 1.063$ – $1.200$  g/mL). Total HDLc was also measured subsequent to the precipitation of the apoB-containing lipoproteins with polyethylene glycol (Immuno AG, Austria).

### NMR lipoprofile

Total plasma lipids and the distribution of subclasses of lipoproteins were analyzed by NMR spectroscopy (NMR LipoProfile; Raleigh, NC). The procedure simultaneously quantifies the concentration of lipoprotein subclasses and their average particle size. This technique allows for the determination of VLDL, IDL, LDL, and HDL. Furthermore, the VLDL fraction is quantified as three discrete subclasses, LDL as four subclasses, and HDL as three subclasses, all according to increasing molecular weight.<sup>17</sup> The NMR was performed with ethylenediaminetetraacetic acid plasma stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and thawed just before the analyses, which were conducted on a subset of 198 samples.

### Separation and quantification of remnant lipoprotein (RLP)

Remnant lipoprotein cholesterol (RLPc) was measured in plasma using the method described by Nakajima et al, using RLP-Cholesterol Assay Kits (Jimro-II, Japan Immunoresearch Laboratories, Japan).<sup>18</sup>

The remnant-lipoprotein particles were separated from plasma by immunoaffinity chromatography with a gel containing monoclonal antibodies against epitopes of apoB100 and apoA1. The anti-apoA1 recognized apoA1-containing lipoproteins, whereas the anti-apoB100 recognized all apoB100-containing lipoproteins except the partially lipolyzed, apoE-enriched TG-rich remnants. The suspension was gently mixed for 2 hours at room temperature with vertical magnetic-bead oscillator (RLP Mixer J-100A; Photal, Otsuka Electronics, Japan). The mixture was allowed to settle for 30 minutes, and 200  $\mu\text{L}$  of the supernatant containing unbound fraction was taken for the measurement of cholesterol in a sensitive assay developed for a Cobas Mira centrifugal analyzer (Roche, Laval, Quebec).

### Statistical analyses

Our hypothesis is that BMI changes, even within the normal range, can cause lipoprotein alterations only visible with NMR. Such lipoprotein changes due to BMI are mainly due to changes in TG. In our cohorts of healthy subjects, we calculated the average TG difference between the upper and the lowest BMI tertile, which happened to be of 25%. To detect differences in particle number of NMR LDL subclasses (average 468 nM and standard deviation of 201), a sample size of 96 per group is needed.

Normal distribution was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test. Variables were log transformed when non-normally distributed. Variances are comparable between the studied groups. Comparisons of means between variables were performed with ANCOVA, following adjustments for age, country, and fat intake. Partial correlations between continuous variables were assessed with the Pearson correlation coefficient, following adjustments for age and fat intake. Statistical significance was set at the  $P < .05$  level. SPSS (version 19.0) was used for all statistical analyses.

### Results

Our aim was to demonstrate that BMI is correlated with lipid and lipoprotein parameters even among nonobese, normoglycemic, normolipidemic healthy men carefully selected without any cardiovascular, metabolic, or chronic diseases.

We studied a total of 297 nonsmoking men aged 20 to 75 years from Clermont-Ferrand (France), Graz (Austria), and Reus (Spain). There were no significant differences in mean age, BMI, plasma cholesterol, or TG levels between the countries (Supplemental Table). Hence, the data from all subjects were pooled for the statistical analyses.

Obesity was an exclusion criterion in our study, and BMI ranged from 18.9 to 30  $\text{kg}/\text{m}^2$ . We separated the participants into two groups: normoweight (BMI  $< 25$   $\text{kg}/\text{m}^2$  [ $n = 143$ ]) and overweight (BMI  $\geq 25$   $\text{kg}/\text{m}^2$  [ $n = 154$ ]).

### Routine lipid parameters

Participants who were overweight were significantly older ( $P < .001$ ) and had higher diastolic blood pressure ( $P = .006$ ) compared to those with normal BMI (Table 1). Both groups were normoglycemic and had LDLc levels less than 130  $\text{mg}/\text{dL}$ , but overweight subjects still had 11% higher apoB100 levels ( $P = .032$ ) and increased (14%) non-HDLc levels ( $P = .011$ ). Similarly, although both groups had plasma TG levels less than 150  $\text{mg}/\text{dL}$ , overweight participants presented with 30% higher TG levels ( $P < .001$ ) and accordingly had lower HDLc ( $P < .001$ ), lower apoA1 ( $P = .001$ ), and higher circulating free fatty acids ( $P = .002$ ) compared to those with normal weight.

**Table 1** Characteristics of individuals recruited into the study according to body weight

Variables	BMI < 25 (n = 143)	BMI ≥ 25 (n = 154)	P
Age (y)	41.86 (15.13)	50.13 (14.63)	<.001*
Systolic blood pressure (mm Hg)	128.37 (13.41)	132.02 (13.21)	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	79.29 (9.32)	83.22 (8.44)	.005
Plasma glucose (mmol/L)	5.02 (0.59)	5.23 (0.66)	NS
Plasma cholesterol (mM)	4.69 (0.86)	5.03 (0.97)	NS
Plasma triglycerides (mM)	0.93 (0.37)	1.21 (0.62)	<.001
LDL cholesterol (mM)	2.99 (0.79)	3.30 (0.84)	NS
HDL cholesterol (mM)	1.33 (0.30)	1.21 (0.30)	<.001
Plasma apolipoprotein B100 (mg/dL)	67.76 (16.28)	75.49 (17.69)	.030
Plasma apolipoprotein AI (mg/dL)	135.95 (18.72)	131.62 (18.42)	.001
Plasma apolipoprotein E (mg/dL)	3.35 (0.74)	3.61 (0.84)	.034
Plasma apolipoprotein CIII (mg/dL)	14.87 (3.25)	16.36 (3.25)	.002
Lipoprotein (a) (mg/dL)	22.90 (20.52)	23.77 (22.29)	NS
Plasma total FFA (μmol/L)	9955.63 (1878.55)	11,082.10 (2577.95)	.003
Non HDLc (mM)	3.32 (0.92)	3.79 (1.04)	.011

BMI, body mass index; FFA, free fatty acid; HDL, high-density lipoprotein; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; LDL, low-density lipoprotein; NS, nonsignificant.

Values are presented as the means (standard deviation). All *P* values are adjusted by age except for \*, country, and for fat intake.

## Ultracentrifugation

Analyses of the lipid composition of each lipoprotein obtained by ultracentrifugation showed that overweight participants had a significantly altered cholesterol, TG, and apolipoprotein composition of VLDL, IDL, and HDL particles, but not LDL, compared with subjects with normal weight (Table 2). As expected, we found increased concentrations of cholesterol (38%, *P* = .002), TG (29%, *P* > .001), and apoB100 (30%, *P* = .002) in VLDL and

in IDL (22%, *P* = .051; 11%, *P* = .004; and 19%, *P* = .037, respectively) and found decreased concentrations of cholesterol and apoAI in HDL (7%, *P* = .001 and 4%, *P* = .002, respectively) in overweight subjects. LDL was comparable between the groups.

## Nuclear magnetic resonance

We analyzed the lipoprotein profile in further detail with NMR, which provided information on the particle

**Table 2** Lipid composition of lipoproteins obtained by ultracentrifugation according to body weight

Variables	BMI < 25 (n = 143)	BMI ≥ 25 (n = 154)	P
<b>VLDL</b>			
Cholesterol (mg/dL)	0.26 (0.18)	0.36 (0.30)	.002
Triglycerides (mg/dL)	0.49 (0.31)	0.69 (0.51)	<.001
Apolipoprotein B100 (mg/dL)	2.86 (1.81)	3.73 (2.56)	.002
<b>IDL</b>			
Cholesterol (mg/dL)	0.18 (0.10)	0.22 (0.11)	.047
Triglycerides (mg/dL)	0.09 (0.03)	0.10 (0.04)	.005
Apolipoprotein B100 (mg/dL)	2.54 (1.31)	3.03 (1.45)	.042
<b>LDL</b>			
Cholesterol (mg/dL)	2.59 (0.68)	2.83 (0.74)	NS
Triglycerides (mg/dL)	0.28 (1.32)	0.18 (0.05)	NS
Apolipoprotein B100 (mg/dL)	52.28 (13.87)	57.89 (14.62)	NS
<b>HDL</b>			
Cholesterol (mg/dL)	1.37 (0.30)	1.28 (0.31)	.001
Triglycerides (mg/dL)	0.09 (0.03)	0.10 (0.03)	NS
Apolipoprotein AI (mg/dL)	115.07 (17.33)	110.76 (17.05)	.003

BMI, body mass index; HDL, high-density lipoprotein; IDL, intermediate-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; NS, nonsignificant; VLDL, very low-density lipoprotein.

Values are presented as the means (standard deviation). All *P* values are adjusted by age, country, and fat intake.

**Table 3** Lipid profile obtained by NMR according to body weight

Variables	BMI < 25	BMI ≥ 25	P
RLP cholesterol (mg/dL)	6.17 (4.05)	8.57 (7.38)	.004
VLDL and chylomicron particles (nmol/L)	58.80 (25.23)	70.18 (27.57)	.024
Large VLDL and chylomicron particles (nmol/L)	1.02 (1.61)	2.07 (2.51)	.001
Medium VLDL particles (nmol/L)	17.61 (12.66)	22.79 (16.92)	.033
Small VLDL particles (nmol/L)	40.17 (16.96)	45.32 (14.83)	NS
IDL particles (nmol/L)	25.87 (32.08)	44.09 (40.63)	.012
LDL particles (nmol/L)	1006.56 (312.51)	1277.67 (381.12)	<.001
Large LDL particles (nmol/L)	505.78 (182.30)	426.60 (215.70)	<.001
Small LDL particles (nmol/L)	474.96 (273.96)	807.05 (424.60)	<.001
Medium small LDL particles (nmol/L)	97.62 (56.84)	166.68 (85.01)	<.001
Very small LDL particles (nmol/L)	377.31 (218.26)	640.41 (341.74)	<.001
HDL particles (μmol/L)	31.01 (5.05)	30.94 (4.43)	NS
Large HDL particles (μmol/L)	7.66 (2.82)	5.42 (3.17)	<.001
Medium HDL particles (μmol/L)	3.19 (3.42)	3.88 (3.20)	NS
Small HDL particles (μmol/L)	20.15 (5.56)	21.65 (3.97)	NS
VLDL size (nm)	44.88 (7.95)	47.05 (7.52)	.043
LDL size (nm)	21.57 (0.59)	20.96 (0.75)	<.001
HDL size (nm)	9.20 (0.46)	8.84 (0.41)	<.001

BMI, body mass index; HDL, high-density lipoprotein; IDL, intermediate-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; NMR, nuclear magnetic resonance; NS, nonsignificant; VLDL, very low-density lipoprotein.

Values are presented as the means (standard deviation). All *P* values are adjusted by age, country, and fat intake.

number and size distribution of the different lipoproteins (Table 3). NMR uncovered alterations in LDL in overweight subjects that were not detectable in the ultracentrifugation analyses. Overweight participants had 27% more total LDL particles ( $P < .001$ ), but these particles were unevenly distributed. Indeed, overweight participants had 16% lower levels of the large LDL particles ( $P < .001$ ) and 70% increased levels of the smaller subclasses ( $P < .001$ ; Fig. 1).

In overweight healthy individuals, NMR analysis also showed that VLDL elevation corresponded to a 20% higher number of circulating chylomicrons and VLDL particles ( $P = .016$ ), mostly (2-fold) larger VLDL ( $P = .001$ ), and 30% more medium VLDL particles ( $P = .020$ ). As these particles are metabolized to remnants, these participants also had 70% more IDL particles ( $P = .010$ ). This atherogenic profile was also accompanied by a 30% decrease in large HDL particles ( $P < .001$ ) and 39% higher cholesterol levels in pro-atherogenic RLP particles ( $P = .005$ ).

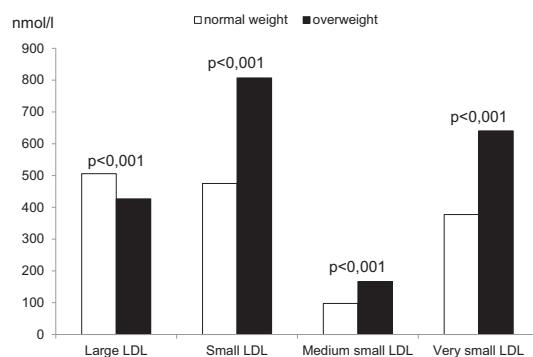
### BMI correlates with atherogenic lipoprotein changes even in the range of normal weight

The results showed that changes in BMI within the overweight range were associated with an atherogenic lipoprotein profile, and we wondered whether this association was also true among subjects with normal weight (Fig. 2). Even in this group, BMI changes were positively correlated with large VLDL and chylomicron particles ( $r = 0.320$ ,  $P < .001$ ), the smallest LDL particles (for small LDL particles [ $r = 0.488$ ,  $P < .001$ ]; for medium small

LDL particles [ $r = 0.494$ ,  $P < .001$ ], and for very small LDL particles [ $r = 0.485$ ,  $P < .001$ ]), and circulating cholesterol levels in RLP particles ( $r = 0.282$ ,  $P < .001$ ) (Fig. 2).

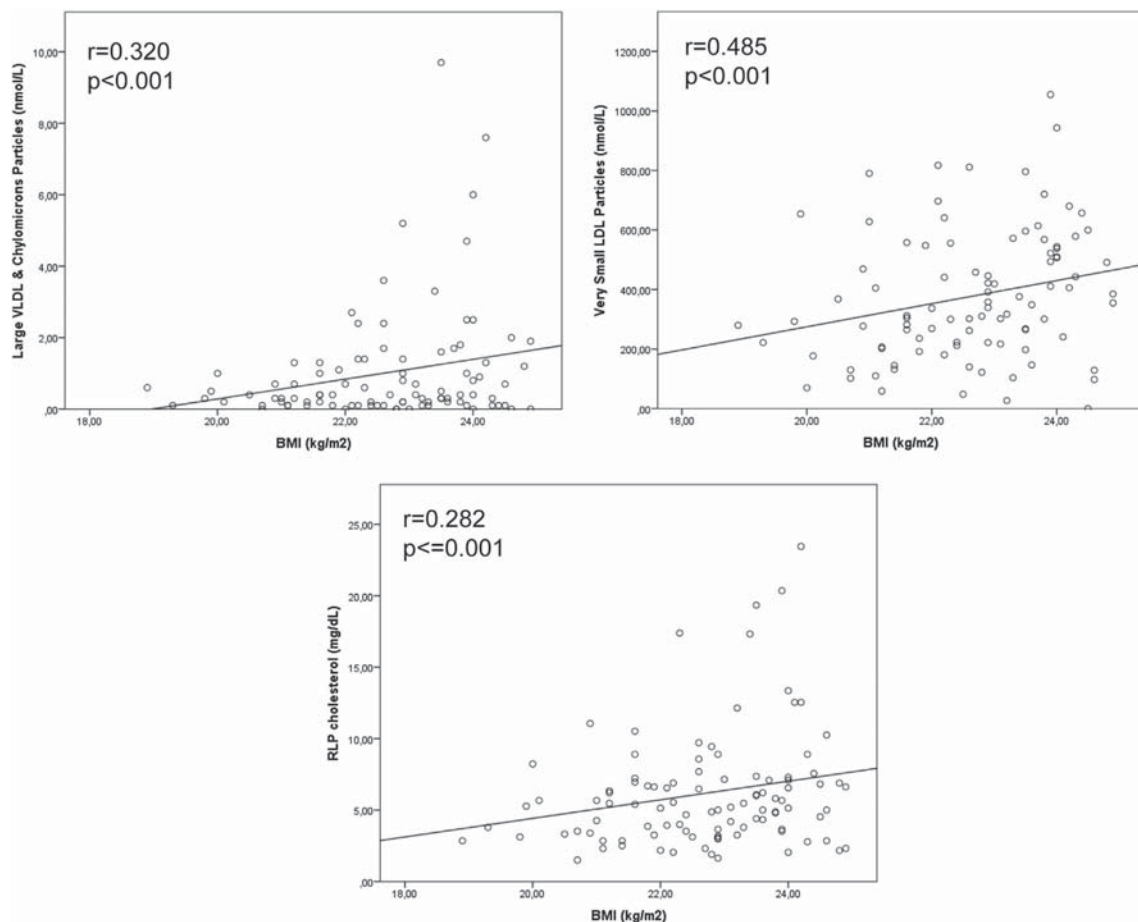
### Discussion

Obesity is commonly known to cause pathologies in the cardiovascular system,<sup>19</sup> and dyslipidemia, together with insulin resistance, is one of the most frequent comorbidities



**Figure 1** Circulating concentration of the different LDL particle subclasses measured by NMR technology. *P* value represents the comparison between normal-weight and overweight participants. Differences were assessed by ANOVA using age and fat intake as covariates. LDL subclasses are not normally distributed, and ANOVA has been performed on log-transformed data. ANOVA, analysis of variance; LDL, low-density lipoprotein; NMR, nuclear magnetic resonance.





**Figure 2** Correlation between BMI and atherogenic lipoprotein subclasses (large VLDL, very small LDL, and small HDL particles) in normoweight subjects. Partial correlations using age, country, and fat intake as covariates have been performed. Very small LDL and large VLDL are not normally distributed, and correlations have been performed on log-transformed data. Untransformed data are shown in all panels. BMI, body mass index; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; VLDL, very low-density lipoprotein.

associated with adiposity. It is not clear whether there is any effect of body weight on lipid profile in healthy, nonobese subjects. Our results demonstrate that indeed there is an effect because BMI is correlated with a shift toward a more proatherogenic lipoprotein profile even in the situation of normoglycemia and normolipidemia in nonobese healthy men, after adjusting for age and fat consumption.

To the best of our knowledge, this is the first study determining a detailed lipoprotein profile obtained by NMR in a population recruited for their healthiness. The inclusion criteria featured these volunteers, who were free of renal, liver, and immune dysfunctions; were normoglycemic, normolipidemic, nonobese, and without chronic or inflammatory diseases; and who had no family history of cardiovascular disease. Our results show that, compared to those with normal weight, our healthy overweight participants presented a more unfavorable profile of lipoproteins in terms of cardiovascular risk,<sup>20</sup> which is

characterized by increased number of larger VLDL particles, IDL particles and smaller LDL particles, and fewer larger LDL, HDL particles, and more cholesterol transported in RLP particles.

There is evidence of the proatherogenic role of the lipoprotein profile described previously. Large VLDL particles, smaller LDL particles, increased numbers of IDL, and small HDL particles are associated with increased incidence and progression of atherosclerosis.<sup>21,22</sup> The presence of small and dense LDL particles was associated with a greater than 3-fold increase in cardiovascular risk.<sup>23</sup> The well-known inverse correlation between HDL and coronary heart disease risk was found to be explained by the largest particles.<sup>24</sup> Finally, a nonfasting RLPc increase of 39 mg/dL was associated with a 2.8-fold causal risk for ischemic heart disease.<sup>25</sup>

However, few studies have analyzed the distribution profile of lipoprotein subclasses under healthy conditions. In a group of healthy postmenopausal women, coronary

calcification was associated with large VLDL, smaller LDL, and fewer large HDL particles.<sup>13</sup> In healthy and normolipidemic men aged 50 years, the smaller LDL particles also showed an important role in promoting atherosclerosis.<sup>14</sup> In adolescents followed during a 2-year period, increased weight was associated with a more atherogenic lipoprotein profile with increased VLDL size and decreased LDL and HDL size.<sup>26</sup>

The analytical “gold standard” determining lipoprotein subfractions for clinical purposes is the density gradient ultracentrifugation that obtains chylo/VLDL, IDL, LDL, and HDL fractions. However, other methodologies have also been used. Among them, proton NMR spectroscopy provides additional measurements beyond the conventional methods. NMR has been recently incorporated to quantify discrete subclasses for chylo/VLDL, IDL, LDL, and HDL.

Different studies have previously showed that the measurements of the different subfractions by ultracentrifugation and NMR are not identical but rather highly correlated.<sup>27–29</sup> The differences in results among technologies could be explained because these two methodologies are based on different principles providing quantitative measures of subfraction concentrations among the full spectrum of lipoprotein particles.

However, none of the published studies have studied the effect of body weight on NMR lipoprotein profile in healthy, normolipidemic, and nonobese participants. In our study, lipid changes are described not only by means of total lipids or lipoprotein fractions obtained by ultracentrifugation but also as particle number and size distribution using the NMR technique. In the present study, this question has been addressed in a cohort of men ranging from 20 to 75 years. Because age is a relevant determinant of BMI and because BMI increases with age, the correlation found between BMI and the atherogenic lipoprotein profile could be secondary to the effect of age. Age is one of the most relevant factors influencing lipid levels. Aging is associated with high total cholesterol levels; however, this has not been clearly stated for TG levels. The most relevant determinant of circulating TG levels is adiposity, and this is concordant with the relation found between BMI and the atherogenic profile, which is tightly linked to increased TG levels. Despite this fact, all the results were adjusted for age. Therefore, we conclude that the relationship described here is not influenced by age.

Our study has limitations, which include that this study was conducted only in men, who were all of European origin, and because age was higher in the overweight group, which is a variable that could conceivably alter the lipid profile, irrespective of the BMI, we included age as a covariate.

## Conclusion

Our results demonstrate that in nonobese healthy subjects, especially in overweight but even among those with

normal weight, increases in BMI shift the lipoprotein subclass distribution to the more atherogenic profile characterized by a predominance of large VLDL, small LDL, and small HDL.

## Acknowledgments

The authors thank the staff and volunteers who participated in the study.

Funding: EU FP5 Program “Quality of Life and Management of Living Resources,” Key Action 1, “Food, Nutrition, and Health,” entitled “Vitamin A, Vitamin E, and Carotenoid Status and Metabolism during Ageing: Functional and Nutritional Consequences,” acronym VIT-AGE (contract QLK1-CT-1999-00830). Project PI08/1579, Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación; CIBER in Diabetes and Associated Metabolic Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación.

## References

- Howard BV, Ruotolo G, Robbins DC. Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003;32:855–867.
- Laakso M, Sarlund H, Mykkänen L. Insulin resistance is associated with lipid and lipoprotein abnormalities in subjects with varying degrees of glucose tolerance. *Arteriosclerosis*. 1990;10:223–231.
- Bays HE, Toth PP, Kris-Etherton PM, et al. Obesity, adiposity, and dyslipidemia: a consensus statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol*. 2013;7:304–383.
- McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, et al. Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2001;154:229–236.
- Krauss RM. Lipoprotein subfractions and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21:305–311.
- Guardiola M, Plana N, Ibarretxe D, et al. Circulating PCSK9 levels are positively correlated with NMR-assessed atherogenic dyslipidemia in patients with high cardiovascular risk. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128:877–882.
- Guardiola M, Cofán M, de Castro-Oros I, et al. APOA5 variants predispose hyperlipidemic patients to atherogenic dyslipidemia and subclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015;240:98–104.
- Goff DC, D’Agostino RB, Haffner SM, Otvos JD. Insulin resistance and adiposity influence lipoprotein size and subclass concentrations. Results from the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Metabolism*. 2005;54:264–270.
- Magge SN, Prasad D, Koren D, et al. Prediabetic obese adolescents have a more atherogenic lipoprotein profile compared with normoglycemic obese peers. *J Pediatr*. 2012;161:881–886.
- Magkos F, Mohammed BS, Mittendorfer B. Effect of obesity on the plasma lipoprotein subclass profile in normoglycemic and normolipidemic men and women. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:1655–1664.
- Pascot A, Lemieux I, Prud’homme D, et al. Reduced HDL particle size as an additional feature of the atherogenic dyslipidemia of abdominal obesity. *J Lipid Res*. 2001;42:2007–2014.
- Halle M, Berg A, Frey I, König D, Keul J, Baumstark MW. Relationship between obesity and concentration and composition of low-density lipoprotein subfractions in normoinsulinemic men. *Metabolism*. 1995;44:1384–1390.
- Mackey RH, Kuller LH, Sutton-Tyrrell K, Evans RW, Holubkov R, Matthews KA. Lipoprotein subclasses and coronary artery calcium

- in postmenopausal women from the healthy women study. *Am J Cardiol.* 2002;90:711–761.
14. Skoglund-Andersson C, Tang R, Bond MG, de Faire U, Hamsten A, Karpe F. LDL particle size distribution is associated with carotid intima-media thickness in healthy 50-year-old men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2422–2430.
  15. Rock E, Winkhofer-Roob BM, Ribalta J, et al. Vitamin A, vitamin E and carotenoid status and metabolism during ageing: functional and nutritional consequences (VITAGE PROJECT). *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2001;11:70–73.
  16. Niedbala RS, Schray KJ, Foery R, Clement G. Estimation of low-density lipoprotein by the Friedewald formula and by electrophoresis compared. *Clin Chem.* 1985;31:1762–1763.
  17. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW. Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chem.* 1991;37:377–386.
  18. Nakajima K, Saito T, Tamura A, et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunoaffinity mixed gels. *Clin Chim Acta.* 1993; 223:53–71.
  19. Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008;6:343–368.
  20. Carmena R, Duriez P, Fruchart J-C. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III2–III7.
  21. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Barboriak JJ, Anderson AJ, Walker JA. Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1046–1053.
  22. Hodis HN, Mack WJ, Dunn M, Liu C, Selzer RH, Krauss RM. Intermediate-density lipoproteins and progression of carotid arterial wall intima-media thickness. *Circulation.* 1997;95:2022–2026.
  23. Lamarche B, Lemieux I, Després JP. The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, pathophysiology and therapeutic aspects. *Diabetes Metab.* 1999;25: 199–211.
  24. Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:174–182.
  25. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:427–436.
  26. Jago R, Drews KL, Otvos JD, et al. Effect of relative weight group change on nuclear magnetic resonance spectroscopy derived lipoprotein particle size and concentrations among adolescents. *J Pediatr.* 2014;164:1091–1098.e3.
  27. Tsai MY, Georgopoulos A, Otvos JD, et al. Comparison of ultracentrifugation and nuclear magnetic resonance spectroscopy in the quantification of triglyceride-rich lipoproteins after an oral fat load. *Clin Chem.* 2004;50:1201–1204.
  28. Williams PT, Zhao X-Q, Marcovina SM, Otvos JD, Brown BG, Krauss RM. Comparison of four methods of analysis of lipoprotein particle subfractions for their association with angiographic progression of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2014;233: 713–720.
  29. Sninsky JJ, Rowland CM, Baca AM, Caulfield MP, Superko HR. Classification of LDL phenotypes by 4 methods of determining lipoprotein particle size. *J Investig Med.* 2013;61:942–949.

## Appendix

**Supplemental Table** Characteristics of the individuals according to the recruitment country

Variables	France (n = 97)	Austria (n = 100)	Spain (n = 100)	P
Age (y)	46.5 (15.19)	45.58 (15.07)	46.33 (15.98)	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.61 (2.60)	25.18 (2.70)	25.10 (2.66)	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	136.60 (14.40)	130.05 (13.41)	124.35 (9.04)	<.001
Diastolic blood pressure (mm Hg)	80.12 (9.00)	86.01 (8.48)	77.88 (7.77)	<.001
Plasma glucose (mmol/L)	4.69 (0.55)	5.38 (0.53)	5.31 (0.58)	<.001
Plasma cholesterol (mM)	4.96 (0.95)	4.89 (1.00)	4.76 (0.83)	NS
Plasma triglycerides (mM)	0.98 (0.53)	1.12 (0.60)	1.12 (0.60)	NS
LDL cholesterol (mM)	2.79 (0.79)	2.69 (0.72)	2.65 (0.63)	NS
HDL cholesterol (mM)	1.32 (0.28)	1.40 (0.31)	1.27 (0.30)	.007
Plasma apolipoprotein B100 (mg/dL)	72.69 (18.23)	70.30 (17.87)	72.20 (16.07)	NS
Plasma apolipoprotein AI (mg/dL)	136.13 (18.17)	135.65 (18.41)	129.80 (19.05)	.028
Plasma apolipoprotein E (mg/dL)	3.43 (0.93)	3.53 (0.74)	3.49 (0.72)	NS
Plasma apolipoprotein CIII (mg/dL)	14.43 (3.19)	16.56 (3.68)	16.03 (3.03)	<.001
Lipoprotein (a) (mg/dL)	22.50 (19.81)	22.68 (20.10)	25.22 (24.14)	NS
Plasma total FFA (μmol/L)	10,197.13 (2397.96)	10,599.92 (2215.25)	10,802.99 (2366.46)	NS
Non HDLc (mM)	3.64 (0.95)	3.49 (0.95)	3.49 (0.79)	NS

BMI, body mass index; FFA, free fatty acid; HDL, high-density lipoprotein; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; LDL, low-density lipoprotein; NS, nonsignificant.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



## Increased presence of remnant lipoprotein cholesterol in the HDL of diabetic subjects.

---

Marta González, Mercedes Heras, Roser Rosales, Cristina  
López, Montse Guardiola, Joan Carles Vallvé, Lluís Masana,  
Josep Ribalta.

Ann. Clin. Lab. Sci. 2016;46(2). In Press

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

## **INCREASED PRESENCE OF REMNANT LIPOPROTEIN CHOLESTEROL IN THE HDL OF DIABETIC SUBJECTS**

Marta González, Mercedes Heras, Roser Rosales, Montse Guardiola, Núria Plana, Joan Carles Vallvé, Lluís Masana, Josep Ribalta.

Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosi. Facultat de Medicina.  
Hospital Universitari de Sant Joan. Insitut d'Investigacions Sanitàries  
Pere Virgili. Universitat Rovira i Virgili. CIBER de Diabetes y  
Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM)). Reus. Spain.

Running title: Remnant lipoprotein in HDL fraction

Keywords: remnant, lipoprotein, iodixanol, subclasses, HDL

To the director,

### **Introduction**

The atherogenic dyslipidemia associated with type II diabetes (T2DM) is characterized by elevated fasting triglycerides (TG) and remnant lipoproteins (RL) as well as small and dense low-density lipoprotein (sdLDL) particles and low high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) levels (1). Epidemiological studies have



demonstrated that both fasting and non-fasting hyperlipidemia are important risk factors for atherosclerosis and cardiovascular events (2). In the non-fasting state, the lipid profile is characterized by the accumulation of RL, a heterogeneous group of catabolized hepatic and intestinal lipoproteins, which differ in size, density, electrophoretic mobility, composition and receptor affinity (3). RL are considered an independent risk factor in cardiovascular disease (4–6). The analytical determination of RL is not straightforward. Measurements of circulating apolipoprotein (apo) B48 estimate postprandial remnant lipoproteins (7). On the other hand, the remnant-like particle cholesterol (RLPc) fraction obtained by immunochromatography identifies a wider spectrum of lipoproteins, ranging from VLDL to HDL, that cannot effectively bind to antibodies against apoA1 and apoB100 (8). The RLPs density range varies according to the population studied; for instance, in normolipidemic subjects, RLPc is normally undetectable in the IDL fraction (5). However, in diabetic or dysbetalipoproteinemic patients, the IDL can be found in the RLPc fraction (9).

The aim of this study is two-fold: 1) To analyze which lipoproteins have RLPs and how this varies between normolipidemic and T2DM patients; 2) To test how this distribution varies postprandially in normolipidemic subjects with iodixanol gradient ultracentrifugation, a

method that allows for more accurate subfraction separation permitting the quantification of up to 21 lipoprotein subclasses (10).

## **Material and methods**

We studied 5 healthy normolipidemic subjects and 4 T2DM patients. The normolipidemic subjects did not suffer from chronic diseases and were 3 men and 2 women with mean age of 43 years and a mean BMI of 24.5kg/m<sup>2</sup>. The T2DM patients were 2 men and 2 women with a mean age of 55 years; a mean BMI of 27.9kg/m<sup>2</sup>; and a mean HbA1c of 6.20%. We obtained plasma EDTA samples from the 5 normolipemic subjects (fasting and postprandial) and the 4 T2DM patients (fasting) after a 6-week of drug wash-out. The Hospital Ethical Committee approved the study and all patients gave their written consent to participate.

2ml of plasma of the healthy volunteers and the T2DM patients were subjected to sequential ultracentrifugation (11) to obtain four fractions (chylomicrons and VLDL, IDL, LDL and HDL).

4.5ml of pooled plasma from fasting and postprandial healthy volunteers were subjected to iodixanol density gradient ultracentrifugation (10) to obtain twenty-one fractions.

Iodixanol is a non-ionic, iso-osmotic and self-generating gradient medium. Unlike the saline gradient used in the sequential ultracentrifugation, the iodixanol gradient allows greater stratification of lipoproteins in a single pool centrifuge, reducing run times and increasing sample throughput. In addition, iodixanol do not alter the structure of lipoproteins as could do high salt concentration. Briefly, 3ml of the 9% solution (9ml Optiprep™ (60% iodixanol solution, Sigma-Aldrich D1556) with 51ml of 0.1M HEPES-buffered saline) was placed in the Optiseal polyallomer centrifugation tube; this was then under-layered with 3ml of the 12% solution (12ml Optiprep™ with 48ml HEPES-buffered saline) and then with a final 3ml of the 20% iodixanol/plasma solution (2.25ml Optiprep™ with 4.5ml chylomicron free plasma). The tube was then centrifuged at 65.000rpm (Kontron) for 4h at 4°C. Fractions were collected in a cold room (4°C) by upward displacement using a Beckman Coulter Fraction Recovery System that pierced the bottom of the tube and pumped Fluorinert (Sigma-Aldrich F9755) into the bottom of the tube via a syringe driver set.

From each lipoprotein fraction collected, we determined cholesterol, triglycerides, apoA1 and apoB100 by a Cobas Mira analyzer (Roche, Laval, Quebec, Canada), and RLPc by immunoaffinity chromatography. We used the RLP-Cholesterol Assay Kit (Jimro-II,

Japan Immunoresearch Laboratories, Tokyo, Japan) following manufacturer instructions (8). Briefly, 5 $\mu$ l of plasma are added to 300 $\mu$ l of gel suspension of anti-human apoA-I and apoB-100 mouse monoclonal antibodies bound to Sepharose®. The suspension is gently mixed for 2h at room temperature with a vertical magnetic-bead oscillator (RLP Mixer J-100A, Photal; Otsuka Electronics, Osaka, Japan). The mixture is allowed to settle for 30min, and 200 $\mu$ l of the supernatant containing unbound fraction is measured.

## Results

T2DM patients met the ATPIII criteria and presented with typical fasting lipids as follows: slight increase in LDLc (152.75mg/dl (76.57)) and TG (170.28mg/dl (50.52)) and high total cholesterol (245.75mg/dl (93.32)). The fasting TG and RLPc values were 122% (p=0.030) and 112.6% (p=0.019) higher, respectively, in T2DM patients compared to controls. T2DM patients, compared to controls, tend to have higher RLPc in VLDL (3.33 vs 1.02mg/dl), IDL (0.21mg/dl vs undetectable) and LDL (2.20 vs 1.08mg/dl) (Table 1). Although HDLc is lower in T2DM (48.87 vs 59.07mg/dl), the HDL fraction of T2DM contains 60% more RLPc (1.14 vs 0.46mg/dl, (p=0.014)) than the HDL of controls (Table 1). VLDLc, IDLc and LDLc tend to be increased in T2DM (24.46 vs 8.55mg/dl, 16.05 vs 5.95mg/dl, and 129.06 vs 87.82mg/dl, respectively) compared to

controls. Of the total plasma RLPc, 27.36% is contained in VLDL, none in IDL, 18.07% in LDL and 9.36% in HDL for control subjects; for T2DM patients, 17.74% is contained in VLDL, 1.68% in IDL, 18.79% in LDL and 8.00% in HDL. We were interested in the presence of RLPc in the HDL fraction and wondered what happened postprandially to the HDL-associated RLPc. For this purpose, two pools of fasting and postprandial control samples were subjected to iodixanol density gradient ultracentrifugation to obtain up to 7 HDL subfractions for RLPc detection. RLPc in the HDL subfractions was doubled and a shift towards denser iodixanol fractions during postprandial state was observed (Table 1).

## **Discussion**

Immunchromatography is a technique based on the elution of all lipoproteins that do not bind monoclonal anti-apoB100 and anti-apoA1 due to their altered tertiary structure. Thus, lipoproteins that have undergone a conformational change that may affect their physiological function have impaired binding to monoclonal antibodies and remain in the unbound fraction. Nakajima et al. (8) reported that even though the unbound fraction mainly consists of chylomicrons and VLDL, a peak in the HDL size range could be seen in virtually all diabetic and healthy subjects, with the same intensity for both. Considering these results are in accordance with ours, most

RLPc is located in the VLDL density range in control and T2DM subjects, although RLPc is significantly increased in T2DM. Moreover, RLPc is only detected in the IDL density range in patients with detectable concentrations of IDL, such as patients with T2DM or dysbetalipoproteinemia (9).

It is known that diabetic subjects, with or without CAD, have increased RLPc (13,14), which contributes to foam cell formation (15); however, little is known about the characteristics of those RLPs. Our results demonstrate that T2DM patients not only have lower HDLc, their HDL has a significantly higher content of remnant-like particles. This fraction of the HDL is very unlikely to be functional; therefore, the risk associated with low HDL in DM2 patients might be higher than anticipated by merely considering the patients' cholesterol content.

In view of the finding of RLPc in the HDL density range, we wondered whether the HDL-like RLPc was postprandially modified. In this case, we used an iodixanol density gradient to more accurately determine the density of these particles in the healthy volunteers. Nuclear magnetic resonance is also a good methodology for determining the particle number and lipoprotein size, but it does not allow for sample collection for further analysis (16). On the other hand, iodixanol density gradient ultracentrifugation provides more

subfractions of lipoproteins and more accurate information about the lipoprotein distribution and composition than conventional ultracentrifugation.

We found that the RLPc of an HDL-like density is doubled postprandially due to the denser particles observed in the shift of the iodixanol collected fractions. Although mechanistic studies should be conducted to better understand the consequences in terms of reverse cholesterol transport, it is likely that the increased RLPc content in the HDL density range will result in a lower HDL effluxing capacity. In any case, under certain metabolic states, small dense HDL particles are pro-inflammatory molecules that have lost the capacity to protect LDL against oxidative stress, and they are associated with cardiovascular disease (17), cerebrovascular (18) and subclinical atherosclerosis (19), independent of HDLc.

Although it has been reported that RLP-TG might be a better postprandial remnant marker (20), we clearly found that a 2-fold RLP-cholesterol increase in HDL was a feature of the postprandial state. More studies are needed to characterize the postprandial changes in these particles.

In conclusion, T2DM patients present with increased RLPc transported in the lipoproteins of HDL-like density compared to

healthy individuals. The RLPc of an HDL-like density is doubled postprandially and it is contained in denser particles.

## REFERENCES:

1. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International . Circulation. 2009 Oct 20;120(16):1640–5.
2. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. JAMA. 2007 Jul 18;298(3):299–308.
3. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. Circulation. 2007 Oct 16;116(16):1832–44.



4. McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, et al. Remnant lipoprotein cholesterol and triglyceride reference ranges from the Framingham Heart Study. *Clin Chem.* 1998;44:1224–32.
5. Leary ET, Wang T, Baker DJ, Cilla DD, Zhong J, Warnick GR, et al. Evaluation of an immunoseparation method for quantitative measurement of remnant-like particle-cholesterol in serum and plasma. *Clin Chem.* 1998 Dec;44(12):2490–8.
6. McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, et al. Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis.* 2001 Jan;154(1):229–36.
7. Su JW, Nzekwu M-MU, Cabezas MC, Redgrave T, Proctor SD. Methods to assess impaired post-prandial metabolism and the impact for early detection of cardiovascular disease risk. *Eur J Clin Invest.* 2009 Sep;39(9):741–54.
8. Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I

immunoaffinity mixed gels. Clin Chim Acta. 1993 Dec 31;223(1-2):53–71.

9. Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, et al. A new approach for the detection of type III hyperlipoproteinemia by RLP-cholesterol assay. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 1994.
10. Yee MS, Pavitt D V, Tan T, Venkatesan S, Godsland IF, Richmond W, et al. Lipoprotein separation in a novel iodixanol density gradient, for composition, density, and phenotype analysis. J Lipid Res. 2008;49:1364–71.
11. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest. 1955 Sep;34(9):1345–53.
12. Davies IG, Graham JM, Griffin BA. Rapid separation of LDL subclasses by iodixanol gradient ultracentrifugation. Clin Chem. 2003 Nov;49(11):1865–72.
13. Higashi K, Ito T, Nakajima K, Yonemura A, Nakamura H, Ohsuzu F. Remnant-like particles cholesterol is higher in

- diabetic patients with coronary artery disease. *Metabolism*. 2001 Dec;50(12):1462–5.
14. Schaefer EJ, McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Ordovas JM, et al. Elevated remnant-like particle cholesterol and triglyceride levels in diabetic men and women in the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 2002 Jun;25(6):989–94.
  15. Tomono S, Kawazu S, Kato N, Ono T, Ishii C, Ito Y, et al. Uptake of remnant like particles (RLP) in diabetic patients from mouse peritoneal macrophages. *J Atheroscler Thromb*. 1994 Jan;1(2):98–102.
  16. Mallol R, Rodríguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, Masana L, et al. Particle size measurement of lipoprotein fractions using diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Mar;402(7):2407–15.
  17. Asztalos BF, Collins D, Horvath K V, Bloomfield HE, Robins SJ, Schaefer EJ. Relation of gemfibrozil treatment and high-density lipoprotein subpopulation profile with cardiovascular events in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Metabolism*. 2008 Jan;57(1):77–83.

18. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Gulan B, et al. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: Prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis*. 2010;210(2):548–54.
19. Watanabe H, Söderlund S, Soro-Paavonen A, Hiukka A, Leinonen E, Alagona C, et al. Decreased high-density lipoprotein (HDL) particle size, prebeta-, and large HDL subspecies concentration in Finnish low-HDL families: relationship with intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Apr;26(4):897–902.
20. Nakajima K, Nakano T, Moon HD, Nagamine T, Stanhope KL, Havel PJ, et al. The correlation between TG vs remnant lipoproteins in the fasting and postprandial plasma of 23 volunteers. *Clin Chim Acta*. 2009 Jun 27;404(2):124–7.

**Table 1.** Remnant-like particle cholesterol distribution among iodixanol density gradient and sequential ultracentrifugation.

Sequential Ultracentrifugation				
Fractions	Chy & VLDL	IDL	LDL	HDL
T2DM patient 1	3,78	0,82	5,06	0,88
T2DM patient 2	1,36	0	0,82	1,56
T2DM patient 3	2,77	0	1,69	0,95
T2DM patient 4	5,4	0	1,22	1,15
Mean (±SD) T2DM				1,14 ±0,31
NL subject 1	0	0	0,62	0,58
NL subject 2	0	0	1,09	0,85
NL subject 3	0	0	0,55	0
NL subject 4	3,18	0	1,56	0,85
NL subject 5	1,9	0	1,56	0
Mean (±SD) NL				0,46 ±0,43
% NL vs T2DM				59,82

<b>Iodixanol Density Gradient Ultracentrifugation</b>								
<b>RLPc (mg/dl)</b>	HDL fractions	15	16	17	18	19	20	21
	FASTING plasma pool of normolipemic subjects	0	1,63	2,17	3,38	1,63	0	0
	Mean ( $\pm$ SD) FASTING	1,26 $\pm$ 1,31						
	POSTPRANDIAL pool of normolipemic subjects	0	0	2,31	2,58	7,83	1,77	0
	Mean ( $\pm$ SD) POSTPRANDIAL	2,07 $\pm$ 2,78						
	% FASTING vs POSTPRANDIAL	64,28						

Chy: chylomicron; HDL: high density lipoprotein; IDL: intermediate density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; NL: normolipemic; RLPc: remnant-like particle cholesterol; T2DM: type II diabetes; VLDL: very low density lipoprotein.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# DISCUSSIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



Un dels objectius d'aquesta tesi és avaluar l'impacte que les subpoblacions de lipoproteïnes tenen sobre l'arteriosclerosi. L'arteriosclerosi és la causa de la majoria de malalties cardiovasculars (MCVs) i el seu estudi en l'àmbit subclínic presenta dificultats metodològiques. La determinació del gruix íntima-mitjana carotídia (GIMc) és un dels mètodes no invasius més emprats per avaluar-la (101), tot i que hi ha estudis que en qüestionen l'eficàcia clínica per a l'estratificació del risc d'MCV més enllà dels models SCORE i Framingham (114,115). No obstant això, la seva determinació es troba àmpliament acceptada com a marcador d'arteriosclerosi subclínica en població general (109,110). En el cas dels pacients amb lupus eritematós sistèmic (LES), els models de risc cardiovascular SCORE i Framingham també tenen limitacions, ja que l'edat i el gènere masculí hi tenen molt de pes, i aquests pacients són, majoritàriament, dones joves amb un risc elevat (119,120).

Tot i que l'anàlisi de l'arteriosclerosi subclínica en pacients LES no era un objectiu inicial de l'estudi, hem pogut observar com la nostra cohort, malgrat mostrar un perfil lipídic convencional normolipèmic, presenta un 25% de subjectes amb valors de GIMc per sobre del percentil 75 per edat, sexe i grup ètnic (419), que augmenta un

## - Discussió -

52.9% quan s'utilitzen valors de referència locals per a dones (420). Atès que el concepte de GIMc patològic no es troba ben definit (111,421,422), encara que s'empri àmpliament, creiem més adequada la utilització dels percentils segons edat, gènere i grup ètnic per classificar el gruix de GIMc (419,420). Aquests resultats estan en línia amb els que han obtingut de Leeuw et al. (423) i Svenungsson et al. (298), on pacients LES mostren un increment significatiu en el GIMc respecte del grup control. Cal tenir present que, en el LES, el GIM basal augmentat s'associa amb un increment d'1.35 vegades del risc de patir qualsevol accident cardiovascular greu (318).

Les directrius epidemiològiques sobre risc cardiovascular en població general recomanen tant la valoració del GIM com la presència de plaques en l'artèria carotídia (111), per bé que la presència de placa és millor marcador de risc cardiovascular (112,113). Recentment, s'han publicat diferents articles on la placa sembla ser el millor marcador d'arteriosclerosi subclínica també en LES (318,424,425). En el moment de portar a terme el nostre estudi, no es disposava d'aquest paràmetre en la població de LES, tot i així és una dada important que cal tenir en compte en futurs estudis.

El motiu pel qual hem escollit LES per avaluar la utilitat de les subclasses de lipoproteïnes és perquè es caracteritzen per tenir un



perfil lipídic moderadament alterat (348–350), presentar arteriosclerosi subclínica i el risc cardiovascular incrementat fins a cinquanta cops en pacients joves en comparar amb població general (119,120). Per a aquesta població és, doncs, necessària una cerca d'altres paràmetres més informatius com a predictius d'MCV.

Des de fa molts anys, el maneig del risc cardiovascular se centra en les lipoproteïnes LDL i HDL, però avui en dia la major part dels infarts de miocardi es produeixen en persones els paràmetres de les quals són normals (95,173,174). Si bé s'ha intensificat la identificació de nous biomarcadors que prediguin el risc MCV, en aquest treball proposem que també es pot millorar la caracterització d'aquestes lipoproteïnes i que la determinació de subclasses de diferent mida és una bona manera de fer-ho.

Com s'ha comentat en la introducció, les lipoproteïnes constitueixen un grup ampli i heterogeni de partícules que es diferencien en mida, densitat i composició en lípids i apolipoproteïnes (apos). Des de la primera separació i obtenció de les diferents fraccions de lipoproteïnes segons la seva flotabilitat en medi salí fins a l'actualitat, s'han desenvolupat i millorat diverses tècniques basades en les seves propietats fisicoquímiques per aconseguir una millor

## - Discussió -

caracterització de les lipoproteïnes, tant quantitativa com qualitativa (426). Aquests avenços tècnics han permès millores en la comprensió del procés patogènic de l'arteriosclerosi i les seves complicacions, i també en l'avaluació clínica i en la prevenció de pacients que poden estar en risc d'accidents cardiovasculars. Tanmateix, aquests avenços tècnics no s'han traslladat a la pràctica clínica, i en la majoria de diagnòstics i avaluacions clíniques tan sols es quantifica el colesterol que transporten les LDL i les HDL mitjançant mètodes enzimàtics convencionals o, en el cas de les LDL, l'estimació del seu contingut en colesterol mitjançant la fórmula de Friedewald (427). D'aquesta manera, la determinació d'altres classes i/o subclasses de lipoproteïnes queda limitada a l'àmbit de la recerca. Però, és realment útil la informació que aporten per aquestes classes i/o subclasses de lipoproteïnes, actualment allunyades de la pràctica clínica, per a una millor avaluació i determinació del risc cardiovascular? Tot i l'extensa bibliografia publicada respecte a això, en la comunitat científica hi ha un controvertit debat amb defensors i detractors de la seva utilitat clínica.

En el cas de l'estudi que hem dut a terme en població amb LES, la resposta seria afirmativa. Els resultats mostren que, encara que no es presenti cap factor de risc convencional, el marcador



d'arteriosclerosi subclínica GIMc es correlaciona, significativament, amb aquestes classes i subclasses lipoproteiques i, el que és més rellevant, no pas amb els paràmetres lipídics convencionals. En el LES es coneix la ineficàcia predictiva dels paràmetres convencionals com el LDLc, el HDLc o la determinació d'apos (327,340,428,429), però també trobem altres poblacions que comparteixen aquestes característiques, com demostren Al-Shahrouri et al., que determinen perfils aterogènics mitjançant les subclasses lipoproteiques en pacients amb nefropatia diabètica que no presenten alteracions lipídiques en els paràmetres convencionals però amb alt risc d'MCV (430); o Rosenson et al., que descriuen subjectes amb malaltia arterial coronària (MAC) que, tenint un mateix perfil lipídic, mostren diferències quan s'analitza la distribució de les subclasses de lipoproteïnes segons prenguin medicació o placebo (206). Contràriament, altres estudis determinen que l'efectivitat predictiva de les subclasses lipoproteiques és comparable però no superior a la dels paràmetres convencionals (177,431).

Cal tenir present que les subclasses poden ser caracteritzades d'acord amb el contingut en colesterol, el nombre de partícules o la mida, tot i que en la població general aquestes variables mostren un grau significatiu de correlació, en determinades poblacions (223,432). Les determinacions de la mida de la partícula poden



## - Discussió -

donar també informació de la concentració d'aquestes partícules, com és el cas de la ressonància magnètica nuclear (RMN). En la bibliografia, molts cops es barregen aquests conceptes que en alguns casos poden donar lloc a resultats diferents. En general, el nombre de partícules s'associa més amb arteriosclerosi subclínica o accidents cardiovasculars que amb la concentració de colesterol o la mida per si soles (225,433,434).

En els nostres resultats es repeteix un patró basat en la mida i el nombre de partícules de les subclasses de lipoproteïnes, de manera que com més concentració de partícules de mida menor més GIMc i, a l'inrevés, com més concentració de partícules de mida més gran menor GIMc.

Aquest seria el cas de les subclasses de les LDL-P on les mitjanes-petites i les petites (les primeres incloses en les segones amb un diàmetre de 18-20.5 nm) es correlacionen positivament i significativament amb el GIMc i les LDL-P grans (20.5-23 nm), negativament, en els pacients amb LES. Com s'ha explicat més detalladament en la introducció, aquestes subclasses són les més estudiades, sobretot les sdLDL i la seva participació en la progressió de l'arteriosclerosi coronària (435) i carotídia (157,436). Atès que sembla prou establert que les sdLDL són més aterogèniques que les



LDL grans (156,190–195,225), l'existència d'un gran nombre d'estudis que demostren associacions entre les concentracions de partícules LDL petites amb el risc cardiovascular (37,181–183,199,206,224–226,437) i la caracterització *in vitro* de diverses propietats aterogèniques d'aquestes lipoproteïnes, com una major oxidabilitat o una major retenció a la matriu extracel·lular, fan d'aquesta partícula una clara candidata a l'inici o a la progressió del procés arterioscleròtic. D'altra banda, altres estudis consideren que, tot i tenir valor predictiu en el risc cardiovascular, la determinació de les subclasses no millora la predicció respecte dels paràmetres convencionals (177,188,438). Alguns suggereixen que el nombre de partícules LDL totals podria ser un millor paràmetre predictor del risc cardiovascular que les subclasses en si (196,199,223). De fet, una metanàlisi de 24 estudis, on es relacionen les mesures de l'LDL amb MCV, conclou que les subclasses no milloren la valoració dels factors de risc tradicionals (223). No obstant això, si s'analitzen de forma més acurada, en els estudis presents en la metanàlisi, s'observa que les LDL petites es correlacionen, significativament, amb els paràmetres següents: a) GIM femoral i carotídia (la correlació és positiva i independent d'altres lipoproteïnes, en quatre dels vuit estudis que la determinen), b) accidents cardiovasculars (la correlació és positiva i independent d'altres paràmetres lipídics, en

## - Discussió -

tres dels sis estudis que la determinen) i c) accidents cerebrovasculars (la correlació és positiva després d'ajustar per altres lípids i factors de risc en l'únic estudi on es determina). Aquests resultats van en la línia d'altres estudis amb cohorts semblants, on l'LDL petita s'associa amb: a) increment del GIMc (439), juntament amb l'activació de molècules proinflamatòries (440), independent d'altres factors de risc cardiovasculars no lipídics i més fortament que altres paràmetres lipídics i lipoproteics, b) incidència d'accidents cardiovasculars a dos anys independentment de lípids tradicionals i d'altres factors de risc en pacients amb malaltia arterial perifèrica o aneurisma abdominal aòrtic (441), i c) accidents coronaris i cerebrovasculars (433,442), així com la morbimortalitat (202), independent de lípids tradicionals i altres factors de risc convencionals en pacients amb síndrome metabòlica. Aquestes associacions també s'han vinculat amb característiques genètiques; per exemple, s'ha identificat un polimorfisme genètic associat a elevat risc d'infart de miocardi i nivells d'LDLc, localitzat en el cromosoma 1p13 i causant d'un increment en la secreció de VLDL del fetge i de nivells elevats de partícules LDL molt petites (443).

Així doncs, com hem dit anteriorment, les LDL-P més grans s'associen a menor GIMc en els pacients amb LES estudiats, i suggereixen un paper antiaterogènic. Tot i que no s'ha descrit, des



d'un punt de vista fisiològic, cap comportament antiaterogènic de les LDL més grans, sí que s'ha vist que pacients amb malaltia coronària presenten tant nivells baixos d'LDLc grans com nivells alts de sdLDLc (192). No obstant això, trobem estudis on es descriu una predominança de les LDL grans respecte d'altres subclasses en pacients amb MAC (197) i associacions d'aquestes amb GIMc en homes sans (198) i en esquimals (196). Cal tenir en compte, però, que els esquimals són una població que té una incidència molt baixa d'MCV i paràmetres lipídics poc alterats (444), i són un model poblacional on l'increment de GIMc i, consegüentment, la seva associació amb les LDL grans pot no ser tan determinant de MCV. D'altra banda, en l'estudi multiètnic MESA, les LDL-P grans es correlacionen amb el GIM de la mateixa manera que ho fan les petites, tot i que es conclou que les petites són més aterogèniques (199). Aquesta divergència de resultats es podria explicar pels nivells basals de TG, perquè quan aquests són baixos les LDL grans poden esdevenir predictives de risc coronari (35).

Tot i que històricament els nivells de colesterol contingut en les partícules HDL s'han trobat inversament relacionats amb el risc d'MCV, i que es coneixen bé els mecanismes antiarterioscleròtics de les HDL, no queden clars els efectes beneficiosos del seu increment farmacològic (138), ja que, per exemple, els fàrmacs dissenyats per

## - Discussió -

augmentar la concentració d'HDLc mitjançant la inhibició de la CETP aconsegueixen uns augments molt importants d'HDLc que no es tradueixen en una reducció de la mort cardiovascular o que, en alguns casos, fins i tot l'augmenten. A més, no es coneixen resultats concloents per determinar si les seves subclasses aporten un major efecte predictiu. Tot i que en estats metabòlics normals les HDL més petites (HDL<sub>3</sub>) sembla ser que presenten majors propietats antiarterioscleròtiques que les grans, sota certes condicions o estats metabòlics aquestes partícules poden patir algunes modificacions estructurals o de composició que facin perdre les seves funcions antiarterioscleròtiques esmentades anteriorment i poden convertir-se en HDL disfuncionals (200). La implicació de la mida d'HDL com a factor predictiu d'MCV no queda clara (36,201,445). Trobem nombrosa bibliografia on s'associen les HDL petites amb MCV, malaltia cerebrovascular i GIM (202–208), de manera independent a l'HDLc; i les grans s'associen a una major capacitat de protecció (51,156,176,177,190,203,209–216), en alguns casos millorant la predicció dels factors de risc convencional (132,217,218), i de manera inversa a les LDL petites (176). Aquestes dades van en la línia dels resultats aquí presentats amb pacients LES, on totes les subclasses més petites de les HDL (petites, mitjanes-petites i molt petites) s'associen amb major GIM i les més grans amb menor,



tenint en compte que aquesta associació es perd quan s'avalua el colesterol que contenen les HDL. En contraposició, trobem estudis que associen les HDL petites a factors protectors d'arteriosclerosi (219,220), o que no poden dissociar els efectes d'aquestes partícules segons la mida de les lipoproteïnes (176,221,222).

Part de la discordança de totes aquestes dades pot ser deguda a les diferents tècniques que es fan servir per analitzar les subclasses. La comparació de resultats és complexa, ja que no hi ha una bona correlació entre si, en part per manca d'estandarització, perquè els principis de cada tècnica són molt diferents. Estudis recents determinen que certes tècniques són més sensibles per a la detecció de certs tipus de lipoproteïnes que d'altres (37). Tot i així, Chung et al. conclouen que els diferents mètodes per a la determinació de les subclasses lipoproteïques, on s'inclou l'RMN, són comparables per la predicció d'arteriosclerosi subclínica (446). Així mateix, aquesta complexitat metodològica la trobem respecte de la determinació de l'arteriosclerosi subclínica, ja que també es pot determinar per mitjà de diferents tècniques. Tot plegat fa que la comparació d'estudis on s'associen dades de subclasses de lipoproteïnes i GIM no tinguin la robustesa metodològica suficient per treure'n conclusions més sòlides.

## - Discussió -

El continu intercanvi de lípids que es dona entre totes les lipoproteïnes provoca que canvis quantitius o qualitius d'alguna subclasse puguin afectar la resta. Cal, per tant, una visió conjunta de les diferents subclasses. El perfil donat per les subclasses lipoproteiques pot veure's modelat per diferents situacions. En aquesta tesi, s'ha analitzat la influència d'una patologia com és el LES i l'efecte de dos factors de risc clau en l'arteriosclerosi, com són l'edat i l'índex de massa corporal (IMC).

L'edat és el principal factor de risc cardiovascular. A més, sabem que és un important modulador del perfil lipoproteic, tot i que en certes poblacions, com LES, el risc de MCV es presenti de manera precoç. Els canvis produïts per l'edat sobre les subclasses de lipoproteïnes s'han descrit en població general (161,447) o sota condicions patològiques (448), però mai no s'ha investigat quins són aquests canvis en absència de cap patologia crònica. En aquesta tesi demostrem com, fins i tot en absència de malaltia, l'edat produeix alguns canvis en el perfil lipídic convencional i d'altres en la mida i la composició de les subclasses lipoproteiques que només són observables amb anàlisis més específiques com l'RMN.

En primer lloc observem que el colesterol total augmenta un 32% entre els 20 i els 75 anys. Quan analitzem en més detall quines



lipoproteïnes són les que causen l'augment del colesterol, observem que, tot i que en termes absoluts les LDL són més abundants i, per tant, el seu percentatge d'augment del 45% té un efecte important en l'augment total del colesterol, l'increment més espectacular, en termes relatius, el duu a terme la IDLc (72%). En menor mesura també s'observa com l'edat incrementa un 7% l'HDLc. Paral·lelament a un augment en el colesterol que transporten les lipoproteïnes IDL, LDL i HDL, també es produeix un augment en el seu nombre de partícules (199%, 43% i 12%, respectivament), a causa, principalment, de l'increment de les subclasses LDL-P grans i HDL-P petites. Si bé l'augment d'LDL-P grans es compatible amb un envelliment sa, l'increment de les HDL-P petites apuntaria a l'acumulació d'unes partícules HDL menys funcionals. De fet, els nostres estudis en malaltes amb LES ens suggereixen que les HDL-P petites poden, fins i tot, jugar un paper proaterogènic. Contràriament, trobem estudis en dones sanes que amb l'edat presenten un augment de les HDL grans, però no pas de les petites (161). En tractar-se d'una població amb criteris molt estrictes pel que fa a l'exclusió de patologies cròniques, i amb un registre dietètic molt complet que ens descarta que els canvis observats siguin deguts a la ingesta de greix, entenem que aquest podria ser el perfil lipídic tipus per a un envelliment sa en homes, si més no fins als 75 anys.



## - Discussió -

Més concretament, els resultats suggereixen que ni l'augment de colesterol LDL és tan dolent (ja que es dona en partícules grans) ni l'augment de colesterol HDL és tan bo (ja que es produeix en partícules petites).

Contràriament a l'efecte observat sobre el colesterol, ens va sobtar veure que l'edat no altera els nivells de TG, i fins i tot vam esbrinar que no hi ha cap estudi previ que ho demostrï. De la mateixa manera, observem com cap subclasse lipoproteica relacionada amb el metabolisme dels TG es veu afectada, de manera significativa, per l'edat. El fet que amb l'edat no variï la producció de lipoproteïnes riques en TG (VLDL), però sí que augmenti la concentració de lipoproteïnes riques en colesterol, suggereix que amb l'edat no es produeix un augment de la síntesi de lipoproteïnes, sinó un alentiment del seu catabolisme.

Un altre factor de gran importància en el risc arterioscleròtic és el pes corporal, valorat en el nostre estudi mitjançant l'IMC. L'obesitat té un efecte sobre la distribució de les subcllasses lipoproteiques que es relaciona clarament amb un major risc d'MCV (448–451). Sabem que un perfil aterogènic determinat per ultracentrifugació es correlaciona amb un increment en el risc cardiovascular en individus



sans amb sobrepès (153) i de GIM en homes sans (157). En els resultats que s'han presentat en el tercer estudi d'aquesta tesi, aquest efecte del pes corporal sobre el perfil lipídic també s'observa en homes sans no obesos. El que hem pogut demostrar en el present treball és que aquests canvis només es poden detectar amb anàlisis avançades del perfil lipídic, com les que s'obtenen per RMN i que no són visibles en les analítiques clíniques de rutina. D'aquesta manera hem detectat com l'IMC es correlaciona amb un canvi metabòlic cap a un perfil més aterogènic fins i tot en situacions de normoglicèmia i perfil lipídic convencional normal, després d'ajustar per edat i ingesta de greix. L'augment d'IMC incrementa la concentració de partícules LDL petites, i en redueix les grans, el que s'associa a un perfil més arterioscleròtic, com s'ha comentat amb anterioritat. A més a més, també s'associa a una reducció de les apoA1 i al colesterol que transporten les HDL, que es tradueix en una disminució de les HDL grans. L'increment de TG circulants, associat a un major IMC, pot reduir el transport revers de colesterol per acció de la CETP i, consegüentment, alterar la composició de les VLDL, que en el cas d'aquests homes sans seran de mida gran i mitjanes. De manera semblant, en adolescents seguits durant un període de dos anys, l'increment de pes va associar-se a increments en la mida de les VLDL-P i reduccions en les mides de les LDL-P i HDL-P

## - Discussió -

(158). D'altra banda, d'un temps ençà, ha crescut l'interès pels anomenats "obesos metabòlicament sans", el que ha obert la porta a un nou debat que posa en dubte la importància real d'IMC. Recentment, Phillips et al. (452) han descrit un perfil metabòlic sa independent de l'IMC, caracteritzat per un increment en les LDL-P i HDL-P grans, i una disminució de les sdLDL i VLDL-P grans. En aquest sentit, la nostra població d'estudi compleix les definicions de "metabòlicament sans", amb el que podríem determinar que el perfil lipoproteic associat a un major IMC representa el d'homes amb sobrepès, i no obesos, sans. Dos factors que també s'han de tenir en compte són l'edat i el gènere, atès que en l'estudi de Phillips et al. els individus, d'ambdós sexes, presentaven edats compreses entre els 50 i 69 anys, mentre que la nostra població d'estudi són homes representatius de totes les edats.

En resum, en homes sans podem concloure que l'edat afecta el metabolisme del colesterol i, en canvi, l'IMC el dels TG. De la mateixa manera que amb les pacients que presenten LES, demostrem clarament que les subclasses de lipoproteïnes permeten observar efectes de l'edat i l'IMC sobre el metabolisme lipoproteic que els lípids convencionals no revelen.



El conjunt de canvis lipídics que s'han identificat en els tres primers treballs presentats en aquesta tesi perquè estan associats a GIM o relacionats a major edat o IMC recorden l'anomenada dislipèmia aterògena, caracteritzada per la presència de lipoproteïnes HDL petites i sdLDL, acompanyades de nivells alts de TG i partícules VLDL més grans (218). Com s'ha comentat anteriorment, els pacients amb LES presenten el "perfil de dislipèmia lúpica" (348–350), de gran semblança amb la dislipèmia aterògena: nivells baixos d'HDLc, nivells alts de TG i Lp(a), i lleugers increments o canvis absents en LDLc respecte de la població general (298,348,349).

En el context de LES, trobem poca informació publicada sobre les subclasses lipoproteiques que el caracteritzen i sobre el seu efecte en el GIM. S'ha descrit que pacients amb LES discoide tenen disminuïdes les concentracions de partícules HDL, tant grans com petites respecte de controls (413), i en LES pediàtric l'activitat de la malaltia s'associa a altes concentracions d'LDL petites (414). Un article publicat pel nostre grup determina que les HDL petites activen el complement en pacients LES (415), marcador clau d'autoimmunitat i inflamació en aquest tipus de pacients; i l'activació d'aquest complement s'associa al GIM. Aquests resultats aporten el llaç d'unió entre les subclasses de lipoproteïnes i la inflamació, ben present en pacients amb LES, on es coneix el paper proinflamatori

## - Discussió -

de certes HDL associades a MAC (356). Contràriament, Chung et al. relacionen la inflamació en LES amb increments d'LDL-P petites i reduccions en les HDL-P petites i grans, tot i que les correlacions entre les subclasses i els marcadors inflamatoris són molt dèbils (416). Els mateixos autors, malgrat constatar que pacients LES presenten unes VLDL-P més grans i menors concentracions d'HDL-P grans que individus control, no troben associacions de les subclasses lipoproteiques amb l'arteriosclerosi arterial coronària. Hua et al. (417), tot i no trobar un perfil lipídic concret predictiu d'MCV en LES i reduccions en les partícules sdLDL en LES amb MCV, constaten associacions significatives entre sdLDL i GIM. A més, en pacients LES amb història d'MCV, les HDL-P, i més concretament les petites, es troben reduïdes. Malgrat les diferències entre els pacients LES que s'han estudiat, aquestes dades van en la línia dels nostres resultats, ja que les partícules més petites s'associen a més GIM. El fet que Chung et al no hagin trobat cap associació pot ser degut a les diferències metodològiques en la determinació de l'arteriosclerosi subclínica: mentre Chung et al. utilitzen com a marcador la calcificació arterial coronària, nosaltres i Hua et al. estudiem el GIMc. Tot i així, un dels nostres resultats més determinants té com a protagonista la IDL, ja que en LES és marcador de GIMc i n'explica el 20.2% de la seva variabilitat; i



malauradament Chung et al. no determinen IDL-P, el que ens impedeix saber quin efecte tindria aquesta variable en el seu estudi. A més, Hua et al. determinen el doble d'IDL-P en pacients LES amb història d'MCV respecte d'aquells sense MCV o individus control no LES, tot i que això no és estadísticament significatiu (417). De la mateixa manera, veiem com dones postmenopàusiques amb LES tenen incrementats els valors del colesterol de les *remnant-like lipoproteins* (RLPc) respecte de les premenopàusiques (418).

Tal com acabem de dir, les fraccions de les LR, són, en el cas de pacients amb LES, les més informatives quant a risc arterioescleròtic, perquè tant les IDL-P com l'RLPc s'associen a un augment del GIMc, a diferència dels lípids convencionals que no, i la IDL-P és capaç d'explicar el 20.2% de la variabilitat de la GIMc. D'altra banda, el fet que tant les IDL-P com les VLDL-P petites siguin les que es correlacionen més fortament amb GIMc es pot explicar perquè ambdues lipoproteïnes es troben fortament associades entre si pel seu metabolisme, i és que les IDL són les romanents de les VLDL, i les més petites són l'últim pas metabòlic abans de passar a ser IDL.

Com ja hem comentat anteriorment, les LR són un grup de partícules altament heterogènies, tant d'origen exogen com endogen, que

## - Discussió -

varien en mida, densitat, mobilitat electroforètica, composició química i reconeixement de receptors. Avui en dia hi ha diferents tècniques per obtenir-les i determinar-les, que es basen en les diferents propietats fisicoquímiques que posseeixen. L'aspecte que s'ha de tenir present és que les lipoproteïnes aïllades de cada tècnica no són la mateixa. Aquest és el cas dels paràmetres determinats en els estudis presentats, que són la IDL determinada per RMN (IDL-P) en el primer i tercer estudis, i per ultracentrifugació (IDLc) en el segon i tercer estudis, i l'RLPc determinat per cromatografia d'immunoafinitat en tots els estudis. Encara que en conjunt s'anomenen lipoproteïnes romanents perquè són el resultat d'un alentiment en el catabolisme, les partícules que s'obtenen són diferents si la tècnica que s'ha utilitzat és una o altra. Per RMN obtenim el nombre de partícules amb un diàmetre i una composició equivalents als de la IDL; per ultracentrifugació, el colesterol present a les partícules amb densitats compreses entre 1.006 i 1.019 mg/dL, i per cromatografia d'immunoafinitat, el colesterol present en les lipoproteïnes eluïdes incapaces d'unir-se a anticossos anti-apoA1 i anti-apoB. Per tant, cada mesura presenta lipoproteïnes amb diferents característiques i, consegüentment, la correlació entre si és baixa (81). Les IDL que s'obtenen per ultracentrifugació i RMN són partícules riques en èsters de colesterol i apoE<sub>s</sub>, i tenen una mida



compresa entre 23 i 29 nm. En canvi, l'RLP també inclou aquelles partícules romanents enriquides en TG, més grans i no catabolitzades per complet; en altres paraules, inclou tant els romanents d'origen hepàtic com intestinals. Se sap que la fracció RLP no inclou les IDL (82), per bé que s'ha vist que en pacients hipertriglicèrdèmics (81) i disbetalipoproteïnèmics (84) aquesta fracció sí que hi apareix. Això permet llançar la hipòtesi que, potser, en el cas de pacients amb LES portadors de l'al·lel apoE2 també s'hi podria trobar. Aquestes dades confirmen els resultats que s'han obtingut en el quart estudi presentat en aquesta tesi, on es porta a terme la caracterització de la fracció RLPc, perquè, malgrat que en individus control no es determina l'RLPc en la fracció IDL, sí que es fa en pacients diabètics. Tot i l'interès informatiu d'aquest resultat, les dades més destacades en el present estudi fan referència a les HDL. És conegut que la major part de l'RLPc es troba contingut en lipoproteïnes de densitat semblant als quilomicrons i les VLDL, i que presenta una elevada correlació amb els TG circulants (81). Per tant, sembla poc probable que n'hi hagi en el rang de densitat de l'HDL. En aquest estudi demostrem la presència d'RLPc en la fracció HDL que s'ha obtingut per ultracentrifugació, tant en pacients control com en diabètics tipus 2 (DMT2), sent en aquests segons un 60% major, tot i que presenten menors concentracions d'HDLc. Aquesta és una



## - Discussió -

dada clínicament rellevant, ja que suggereix que l'HDL dels pacients diabètics no és només baixa, sinó que també és disfuncional. A més, trobem diferències postprandials en individus controls, perquè, en separar les lipoproteïnes de manera més estratificada mitjançant el gradient d'iodixanol (ens permet obtenir fins a 21 fraccions), observem com en estat postprandial les fraccions HDL doblen el seu contingut en RLPc que, a més, queda desplaçat a les partícules més denses. Aquestes dades remarquen l'heterogeneïtat de les partícules romanents, que poden trobar-se presents en diferents rangs de densitat i aportar caràcter aterogènic a diferents fraccions lipoproteiques. Encara que s'haurien de dur a terme estudis metabòlics per entendre millor les conseqüències en termes de transport revers del colesterol, és probable que l'augment del contingut d'RLPc en les densitats corresponents a HDL pugui reduir la capacitat d'eflux de les HDLs en pacients diabètics. En qualsevol cas, com hem comentat anteriorment, en certs estats metabòlics, les partícules HDL més petites i denses són molècules proinflamàtòries que han perdut la capacitat de protegir l'LDL contra l'estrès oxidatiu i que estan associades a risc cardiovascular (202,203,208), independent d'HDLC.

Un altre fet diferencial en la concentració de les diferents classes de lipoproteïnes romanents -IDLc, IDL-P i RLPc- és la variabilitat



intraindividual. Per exemple, fins a un 70% dels individus normolipèmics té concentracions no detectables d'IDL (431), i els que en presenten tenen concentracions d'entre 5 i 15 mg/dL d'IDLc (69,70,453,454) -en condicions normals representen entre el 3% i el 10% del colesterol total plasmàtic (71)- i entre 24 i 42 nmol/L en homes (447,455) i 32 i 40 nmol/L en dones (270,447) d'IDL-P. En canvi, l'RLPc és més fàcilment detectable a causa de la major sensibilitat de la tècnica, donant valors en població general d'entre 4.6 mg/dL en dones, i 5.9 mg/dL en homes de 35 a 54 anys nord-americans (81), que poden arribar a elevar-se fins a 36 mg/dL en hipertrigliceridèmics (256). De la mateixa manera, en el cas de les poblacions estudiades en aquesta tesi, s'observa com aquests dos paràmetres tenen un comportament ben diferenciat: les pacients amb LES mostren valors d'RLPc de 5.15 mg/dL (més alts que les dones de població general nord-americana) i d'IDL-P de 43.76 nmol/L (lleugerament més alts que les dones normolipèmiques), i els homes sans del sud d'Europa d'entre 20 i 75 anys presenten valors d'RLPc de 7.31 mg/dL (superiors a població general nord-americana) i IDL-P i IDLc dins dels rangs esperats (34.52 nmol/L i 7,66 mg/dL, respectivament). La causa dels diferents valors d'RLPc i IDL (tant les partícules com el colesterol contingut) entre aquestes poblacions la podem trobar en múltiples factors, ja que les

## - Discussió -

condicions fisiopatològiques d'ambdós grups són molt diferents i cal no oblidar les diferències de gènere que ja hem esmentat abans, atès que el LES és un grup que es compon, principalment, de dones i, en canvi, el grup normolipèmic se es compon d'homes. També cal tenir en compte les limitacions metodològiques per obtenir ambdós paràmetres. No es pot deixar de banda que la tècnica d'immunocromatografia d'afinitat per obtenir RLPc presenta algunes limitacions. La tècnica requereix d'un volum molt petit de mostra (5  $\mu$ L), aquest fet que, d'una banda, és un avantatge resulta en alts coeficients de variació en els resultats. Els resultats presentats són la multiplicació del valor donat per l'autoanalitzador (mètode enzimàtic colorimètric) i un factor de dilució molt alt, fet que produeix que petites variacions en la reacció enzimàtica donin altes variacions en el resultat. D'altra banda, la determinació d'IDLc per ultracentrifugació també pot generar alta variabilitat en els resultats interassaig i intraassaig, atès el maneig que requereix la tècnica i la dependència de la destresa manual de l'operador.

El comportament de les LR en situacions sense risc cardiovascular en població sana també ha estat objecte d'estudi en aquesta tesi. Cal remarcar, tot i que ja s'ha comentat anteriorment, el fet que els criteris d'inclusió en aquesta població sana van ser molt estrictes,



excloent qualsevol paràmetre de risc cardiovascular o patologies cròniques (hipercolesterolèmia, DM, càncer, insuficiència cardíaca, malalties neurològiques, malalties inflamatòries o cròniques de ronyó, fetge o tiroides, hipertensió, demència i malalties infeccioses que es que conegui afectin el sistema immune). En aquests homes sans es va observar que mentre que la IDL podia veure's incrementada tant per l'edat (IDLc 72%, IDL-P 199%) com per IMC (IDLc 22%, IDL-P 70%), l'RLPc només es veia alterat per IMC (39%). A diferència de nosaltres, Nakajima et al. (80) i McNamara et al. (243) troben incrementat l'RLPc en gent adulta si la comparen amb joves definits com a < 50 anys. Tanmateix, cal tenir en compte que aquests individus normolipèmics són d'ambdós sexes i de 52 anys de mitjana, en canvi en el nostre estudi hi ha representats homes de totes les edats entre 20 i 75 anys, amb la qual cosa es poden arribar a diferents resultats. Paral·lelament, el colesterol i els TG tenen comportaments semblants pel que fa a aquests paràmetres, ja que, mentre que el colesterol augmenta amb l'edat però no amb IMC, els TG ho fan amb l'IMC però no amb l'edat. Com es pot observar, trobem diferents comportaments segons el paràmetre romanent determinat.

## - Discussió -

L'increment o la acumulació de les partícules IDL pot donar-se a través de dues vies que podrien actuar de manera independent o bé en conjunt:

- 1) L'increment de la IDL en l'IMC: L'augment dels TG circulants, com és el cas dels individus amb  $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ , produeix un increment en la síntesi de les VLDL, precursors de les IDL, que, en ser alliberades en circulació, generen més partícules IDL. Cal tenir en compte que l'IMC no només incrementa el nombre de partícules IDL, sinó que, a més, les remodela i n'augmenta el contingut en colesterol, TG i apoB100. Aquest fet també es dona en les partícules VLDL, incrementades les més grans (100%) i mitjanes (30%). Aquest comportament semblant es pot produir a causa de la "proximitat metabòlica" entre ambdues partícules.
- 2) L'increment de la IDL en l'edat: L'alentiment en el catabolisme de les LDL pot afavorir una menor transformació d'IDL en LDL i afavorir que la IDL s'acumuli en circulació.

L'increment de les IDL és marcadament diferent si té la causa en l'IMC ( $\geq$  vs  $< 25 \text{ kg/m}^2$ ; IDLc 22%, IDL-P 70%) o en l'edat (20 anys vs 75 anys; IDLc 72%, IDL-P 199%). Hi ha una discordança entre el colesterol transportat i el nombre de partícules IDL d'aproximadament el 50%. Tot i que podem veure que l'efecte de l'edat en les IDL-P és



encara més fort que el de l'IMC (199% vs 70%), l'increment associat a l'edat no arriba a la significació estadística ( $p=0.053$ ). Amb aquestes dades podem proposar una relació entre edat-colesterol-IDL i IMC-TG-RLPc. La correlació entre els TG i el RLPc ja s'ha documentat anteriorment (81) i la relació que hi ha amb l'edat presenta resultats diferents. Que els TG siguin un factor independent d'arteriosclerosi és un tema controvertit (139–144). Tot i la forta associació univariant entre TG i risc d'MAC (456), es perd significació quan altres paràmetres lipídics es tenen en compte, en canvi RLPc ha demostrat ser un factor independent en diversos estudis (257).

L'impacte en diferents tipus poblacionals de les LR en el risc cardiovascular es troba ben documentat en la bibliografia.

Ja en els anys vuitanta i noranta, la IDLc es relacionava de manera independent amb MAC (260), i amb la severitat i progressió de l'arteriosclerosi subclínica tant en estudis transversals (262,263,265) com longitudinals (264,266,267,457). A més, estudis transversals han demostrat que pacients amb MAC tendeixen a tenir nivells plasmàtics d'IDLc elevats (73,260–264), de la mateixa manera que els supervivents d'infart de miocardi (458). Més recentment, mitjançant la tècnica RMN, el *Women's Health Study* associava les

## - Discussió -

concentracions d'IDL-P -juntament amb les LDL-P totals, LDL-P petites i les VLDL-P- amb els accidents cardiovasculars en dones sanes seguides durant 11 anys (177). La GIMc també s'associa a homes amb DM tipus 1, juntament amb VLDL grans, LDLc i apoB (269). A més, hi ha diferents mecanismes pels quals la IDL pot contribuir a l'acumulació de lípids durant el desenvolupament de la lesió arterioscleròtica, com per exemple a través de l'*sphingomyelinase*, un tipus de fosfolipasa (459).

El RLPc ha demostrat que és un factor de risc independent en dones de la cohort de Framingham (242), i predictiva d'arteriosclerosi carotídia o coronària amb independència dels nivells plasmàtics de TG (257). Diferents poblacions d'alt risc arterioscleròtic, com dones postmenopàusiques (243), pacients amb MAC (80,81,243,244), diabètics (245,246) i disbetalipoproteïnèmics (80,84), presenten elevades concentracions d'RLPc. També s'ha vist que RLPc és millor predictor d'accidents cardiovasculars que el colesterol no HDL en pacients amb MAC amb tractament hipolipemiant amb nivells d'LDLc <100 mg/dL (247). El potencial aterogènic d'RLP queda enfortit per la capacitat que té en l'acumulació lipídica en macròfags (248,249), estimulació d'agregació plaquetària (250–253) i disfunció en la vasorelaxació dependent d'endoteli (254,255).



El mecanisme pel qual les LR donen lloc a un augment en el risc arterioscleròtic ve determinat per algunes de les seves característiques, com la mida i el nombre de partícules, o per modificacions a les quals es poden sotmetre, com oxidació i lipòlisi, per bé la dificultat per eliminar-les pot ser una de les més importants.

Com hem comentat anteriorment, l'eliminació de les LR es duu a terme, principalment, a nivell hepàtic mitjançant receptors específics (LDLR, LRP i HSPG) (15,58). Per tant, segons la funcionalitat dels receptors i les isoformes presents, l'eliminació de les LR serà més o menys efectiva, i ressaltem, d'aquesta manera, la importància de la determinació de les isoformes d'apoE (15) en les poblacions amb més risc (LES) d'estudi.

En els resultats mostrats, els pacients LES presenten una freqüència major de l'al·lel  $\epsilon 2$  que en població general. En l'estudi d'Orlacchio et al. (460), encara que no es detecten diferències significatives entre les freqüències al·lèliques de 132 pacients amb LES i 916 dones de l'estudi Framingham, la freqüència al·lèlica de  $\epsilon 2$  en LES (9.1%) és superior a la de Framingham (7.8%), i semblant a la que hem obtingut en el nostre estudi (10%). Com que no es troben més estudis on es faci referència a la freqüència al·lèlica d'apoE en pacients LES, i atesa la reduïda mida de la població estudiada en



## - Discussió -

ambdós estudis, limitació que no es pot obviar, caldrien estudis amb poblacions majors per poder determinar si es troba realment augmentada o no la freqüència al·lèlica de  $\epsilon 2$  en LES.

La relació de l'al·lel  $\epsilon 2$  amb l'acumulació d'IDL-P i el risc arterioscleròtic és ben coneguda en pacients disbetalipoproteïnèmics (84,461), i en el LES queden confirmats amb l'associació de  $\epsilon 2$  amb el desenvolupament accelerat d'arteriosclerosi (460). En el cas dels pacients estudiats amb LES, els resultats van en aquesta línia, ja que els portadors d'aquest al·lel troben augmentada la seva freqüència al tercil més alt de GIMc, tercil amb l'acumulació més significativa d'IDL-P. A més, però, algunes variants de les isoformes d'apoE són dominants genètiques per l'acumulació d'LR, com és el cas d'apoE2 (Cys112 i Cys142), en el qual, a diferència d'apoE2 (Cys112 i Cys158), no és necessari un factor de risc arterioscleròtic (obesitat, menopausa,...) per induir una acumulació d'LR, o d'apoE3 Leiden, entre d'altres (13). Tot i així, aquestes variants són molt poc freqüents, amb la qual cosa l'impacte en població general és escàs.

En resum, les subclasses de lipoproteïnes o lipoproteïnes romanents són paràmetres més informatius de risc arterioscleròtic que els lípids convencionals, en l'efecte del LES, l'edat i l'IMC; i el que de manera general anomenem lipoproteïnes romanents és un grup heterogeni



de partícules, de les quals caldria deixar de parlar com un grup homogeni.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



- 1.** En pacients amb LES, el millor indicador lipídic d'arteriosclerosi subclínica és la partícula IDL.
- 2.** L'acumulació de partícules IDL es troba associada a la presència del genotip APOE2 en pacients amb LES.
- 3.** En homes sans, el colesterol total s'incrementa amb l'edat, mentre que els TG ho fan amb l'IMC.
- 4.** L'augment del colesterol amb l'edat en homes sans és degut a un major increment relatiu de les partícules IDL, un increment absolut de les partícules LDL grans i, en menor mesura, de les HDL petites.
- 5.** Ni els TGs ni el RLPc varien amb l'edat.
- 6.** L'increment en l'IMC s'associa a un perfil de dislipèmia aterògena caracteritzat per un augment de les VLDL grans i LDL i HDL més petites, i la presència de lipoproteïnes romanents (IDL-P i RLPc).
- 7.** La separació de les subclasses de lipoproteïnes per gradient d'iodixanol revela que les HDL dels pacients DMT2 contenen RLPc.
- 8.** L'anàlisi de la mida i el nombre de lipoproteïnes, i les lipoproteïnes romanents, permet obtenir informació addicional a la que s'obté amb els paràmetres convencionals, en l'efecte del LES, l'edat i l'IMC sobre el procés patogènic de l'arteriosclerosi.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



1. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol.* 2014 Jun;25(3):200–6.
2. Hooper AJ, Burnett JR, Watts GF. Contemporary aspects of the biology and therapeutic regulation of the microsomal triglyceride transfer protein. *Circ Res.* 2015 Jan 2;116(1):193–205.
3. Barter PJ. Cholesteryl Ester Transfer Protein: A Novel Target for Raising HDL and Inhibiting Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003. p. 160–7.
4. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RPF. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest.* 2003;33(12):1051–69.
5. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies. *J Intern Med.* 1995;237:5–12.
6. Li C, Zhang W, Zhou F, Chen C, Zhou L, Li Y, et al. Cholesteryl ester transfer protein inhibitors in the treatment of dyslipidemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2013 Jan;8(10):e77049.
7. Nissen SE, Tardif J-C, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, et al. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2007;356:1304–16.
8. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Mar;19(3):472–84.
9. Clavey V, Lestavel-Delattre S, Copin C, Bard JM, Fruchart JC. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:963–71.
10. Stein Y, Stein O. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2003. p. 1–9.
11. Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, Tamai T, Miyabo S, et al. Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the

- BIBLIOGRAFIA -

- very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 1995 Jun 30;270(26):15747–54.
12. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, et al. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA.* 2007;298:1300–11.
  13. Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl).* 2005 May;83(5):329–42.
  14. Horie Y, Fazio S, Westerlund JR, Weisgraber KH, Rall SC. The functional characteristics of a human apolipoprotein E variant (cysteine at residue 142) may explain its association with dominant expression of type III hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem.* 1992 Jan 25;267(3):1962–8.
  15. Mahley RW, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):94–8.
  16. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2002 Mar 15;155(6):487–95.
  17. Ji ZS, Fazio S, Mahley RW. Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apolipoprotein E variants may modulate the expression of type III hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem.* 1994 May 6;269(18):13421–8.
  18. Adiels M, Olofsson S-O, Taskinen M-R, Borén J. Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol.* 2006 Jun;17(3):238–46.
  19. Zambon A, Bertocco S, Vitturi N, Polentarutti V, Vianello D, Crepaldi G. Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 5):1070–4.
  20. Phair RD, Hammond MG, Bowden JA, Fried M, Fisher WR, Berman M. Preliminary model for human lipoprotein metabolism in hyperlipoproteinemia. *Federation proceedings.* 1975. p. 2263–70.
  21. Gaw A, Packard CJ, Lindsay GM, Griffin BA, Caslake MJ, Lorimer AR, et al. Overproduction of small very low density lipoproteins (Sf 20-60) in moderate hypercholesterolemia: relationships between apolipoprotein B kinetics and plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 1995;36:158–71.



22. Bergeron N, Phan BAP, Ding Y, Fong A, Krauss RM. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Inhibition: A New Therapeutic Mechanism for Reducing Cardiovascular Disease Risk. *Circulation*. 2015 Oct 27;132(17):1648–66.
23. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4(4):214–25.
24. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007 Oct 16;116(16):1832–44.
25. Enríquez L, Matas P. [Lipoprotein (a): physiopathology and clinical and therapeutic considerations]. *Med Clin (Barc)*. 2001 May 26;116(19):746–9.
26. Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Marcovina SM. Lipoprotein(a) metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2014 Jun;25(3):189–93.
27. Asztalos BF, Tani M, Schaefer EJ. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol*. 2011 Jun;22(3):176–85.
28. Oram JF, Lawn RM. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res*. 2001;42(8):1173–9.
29. Asztalos BF, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. *Am J Cardiol*. 2003 Apr 3;91(7A):12E – 17E.
30. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(26):9774–9.
31. Choi SY, Hirata K, Ishida T, Quertermous T, Cooper AD. Endothelial lipase: a new lipase on the block. *J Lipid Res*. 2002 Nov;43(11):1763–9.
32. Jaye M, Krawiec J. Endothelial lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2004 Apr;15(2):183–9.
33. Burstein M, Scholnick HR. Lipoprotein-polyanion-metal interactions. *Adv Lipid Res*. 1973 Jan;11:67–108.



- BIBLIOGRAFIA -

34. Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res.* 1982;23:97–104.
35. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* 2002;43:1363–79.
36. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006 Mar;3(3):144–53.
37. Williams PT, Zhao X-Q, Marcovina SM, Otvos JD, Brown BG, Krauss RM. Comparison of four methods of analysis of lipoprotein particle subfractions for their association with angiographic progression of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2014 Apr;233(2):713–20.
38. Kulkarni KR, Garber DW, Marcovina SM, Segrest JP. Quantification of cholesterol in all lipoprotein classes by the VAP-II method. *J Lipid Res.* 1994;35:159–68.
39. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols A V. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 1981;665:408–19.
40. Bautovich GJ, Dash MJ, Hensley WJ, Turtle JR. Gradient gel electrophoresis of human plasma lipoproteins. *Clin Chem.* 1973 Apr;19(4):415–8.
41. Ordovas JM, Osgood D. Preparative isolation of plasma lipoproteins using fast protein liquid chromatography (FPLC). *Methods Mol Biol.* 1998 Jan;110:105–11.
42. Haginaka J, Yamaguchi Y, Kunitomo M. Anion-exchange high-performance liquid chromatography assays of plasma lipoproteins and modified low-density lipoproteins using a ProtEx-DEAE column. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 Feb 10;751(1):161–7.
43. Neyer J, Espinoza C, Luppen L, Dohety TM, Tripathi SC, Uzui H, et al. A comparison of anion-exchange and steric-exclusion HPLC assays of mouse plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 2005 Aug;46(8):1786–95.
44. Caulfield MP, Li S, Lee G, Blanche PJ, Salameh WA, Benner WH, et al. Direct determination of lipoprotein particle sizes and



- concentrations by ion mobility analysis. *Clin Chem.* 2008;54:1307–16.
45. Otvos JD, Rudel LL, McConnell JP. Concerns regarding lipoprotein particle measurement by ion mobility analysis. *Clin Chem.* 2008 Dec 1;54(12):2086–7; author reply 2088–9.
  46. Caulfield MP, Li S, Lee G, Blanche PA, Salameh WA, Benner WH, et al. In Reply. *Clin Chem.* 2008 Nov 28;54(12):2088–9.
  47. Gofman JW, Lindgren FT, Elliott H. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem.* 1949 Jun;179(2):973–9.
  48. Sawle A, Higgins MK, Olivant MP, Higgins JA. A rapid single-step centrifugation method for determination of HDL, LDL, and VLDL cholesterol, and TG, and identification of predominant LDL subclass. *Journal of lipid research.* 2002.
  49. Yee MS, Pavitt D V, Tan T, Venkatesan S, Godsland IF, Richmond W, et al. Lipoprotein separation in a novel iodixanol density gradient, for composition, density, and phenotype analysis. *J Lipid Res.* 2008;49:1364–71.
  50. Lounila J, Ala-Korpela M, Jokisaari J, Savolainen M, Kesäniemi Y. Effects of orientational order and particle size on the NMR line positions of lipoproteins. *Phys Rev Lett.* 1994 Jun 20;72(25):4049–52.
  51. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab Med.* 2006 Dec;26(4):847–70.
  52. Otvos JD. Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab.* 2002 Jan;48(3-4):171–80.
  53. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Cromwell WC. Measurement issues related to lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol.* 2002 Oct 17;90(8A):22i – 29i.
  54. Shirakawa T, Nakajima K, Yatsuzuka S, Shimomura Y, Kobayashi J, Machida T, et al. The role of circulating lipoprotein lipase and adiponectin on the particle size of remnant lipoproteins in patients with diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Clin Chim Acta.* 2015 Feb 2;440:123–32.

- BIBLIOGRAFIA -

55. Ruiz J, Kouivaskaia D, Migliorini M, Robinson S, Saenko EL, Gorlatova N, et al. The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J Lipid Res.* 2005 Aug;46(8):1721–31.
56. Kobayashi K, Oka K, Forte T, Ishida B, Teng B, Ishimura-Oka K, et al. Reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice by adenovirus-mediated gene transfer of the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 1996 Mar 22;271(12):6852–60.
57. Nordestgaard BG, Wootton R, Lewis B. Selective Retention of VLDL, IDL, and LDL in the Arterial Intima of Genetically Hyperlipidemic Rabbits In Vivo: Molecular Size as a Determinant of Fractional Loss From the Intima Inner Media. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Apr 1;15(4):534–42.
58. Foley EM, Gordts PLSM, Stanford KI, Gonzales JC, Lawrence R, Stoddard N, et al. Hepatic remnant lipoprotein clearance by heparan sulfate proteoglycans and low-density lipoprotein receptors depend on dietary conditions in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Sep;33(9):2065–74.
59. Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 1974 Aug 25;249(16):5153–62.
60. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, et al. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell.* 1984 Nov;39(1):27–38.
61. Ishibashi S, Perrey S, Chen Z, Osuga J i, Shimada M, Ohashi K, et al. Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J Biol Chem.* 1996 Sep 13;271(37):22422–7.
62. Rubinsztein DC, Cohen JC, Berger GM, van der Westhuyzen DR, Coetzee GA, Gevers W. Chylomicron remnant clearance from the plasma is normal in familial hypercholesterolemic homozygotes with defined receptor defects. *J Clin Invest.* 1990 Oct;86(4):1306–12.
63. Kita T, Goldstein JL, Brown MS, Watanabe Y, Hornick CA, Havel RJ. Hepatic uptake of chylomicron remnants in WHHL rabbits: a



- mechanism genetically distinct from the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Jun;79(11):3623–7.
64. MacArthur JM, Bishop JR, Stanford KI, Wang L, Bensadoun A, Witztum JL, et al. Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):153–64.
  65. Eisenberg S, Sehayek E. Remnant particles and their metabolism. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1995. p. 739–53.
  66. Havel RJ. Triglyceride-rich lipoproteins and plasma lipid transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010. p. 9–19.
  67. Cohn JS, Marcoux C, Davignon J. Detection, quantification, and characterization of potentially atherogenic triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2474–86.
  68. Mjos OD, Faergeman O, Hamilton RL, Havel RJ. Characterization of remnants produced during the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins of blood plasma and intestinal lymph in the rat. *J Clin Invest*. 1975;56:603–15.
  69. Mabuchi H, Tatami R, Ueda K, Ueda R, Haba T, Kametani T, et al. Serum lipid and lipoprotein levels in Japanese patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1979 Apr;32(4):435–44.
  70. Fontanals-Ferrer N, Serrat-Serrat J, Sorribas-Vivas A, Gonzalez-Garcia C, Gonzalez-Sastre F, Gomez-Gerique J. Quick method of determining lipoproteins, including those of intermediate density, in serum. *Clin Chem*. 1988;34:1753–7.
  71. Zhao SP, Smelt AH, Van den Maagdenberg AM, Van Tol A, Vroom TF, Gevers Leuven JA, et al. Plasma lipoproteins in familial dysbetalipoproteinemia associated with apolipoproteins E2(Arg158-->Cys), E3-Leiden, and E2(Lys146-->Gln), and effects of treatment with simvastatin. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1705–16.
  72. Musliner TA, Giotas C, Krauss RM. Presence of multiple subpopulations of lipoproteins of intermediate density in normal subjects. *Arteriosclerosis*. 6(1):79–87.
  73. Kameda K, Matsuzawa Y, Kubo M, Ishikawa K, Maejima I, Yamamura T, et al. Increased frequency of lipoprotein disorders similar to type III hyperlipoproteinemia in survivors of myocardial infarction in Japan. *Atherosclerosis*. 51(2-3):241–9.

- BIBLIOGRAFIA -

74. Sabaka P, Kruzliak P, Gaspar L, Caprnda M, Bendzala M, Balaz D, et al. Postprandial changes of lipoprotein profile: effect of abdominal obesity. *Lipids Health Dis.* 2013 Jan;12:179.
75. Mead MG, Dangerfield WG. The investigation of "mid-band" lipoproteins using polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Chim Acta.* 1974 Mar 15;51(2):173–82.
76. Muñoz N. Measurement of plasma lipoproteins by electrophoresis on polyacrylamide gel. *Clin Chem.* 1977;23:1826–33.
77. Pagnan A, Havel RJ, Kane JP, Kotite L. Characterization of human very low density lipoproteins containing two electrophoretic populations: double pre-beta lipoproteinemia and primary dysbetalipoproteinemia. *J Lipid Res.* 1977;18:613–22.
78. Luc G, Fievet C, Arveiler D, Evans AE, Bard JM, Cambien F, et al. Apolipoproteins C-III and E in apoB- and non-apoB-containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study. Etude Cas Témoins sur l'Infarctus du Myocarde. *J Lipid Res.* 1996;37:508–17.
79. Yang CY, Xie YH, Yang M, Quion JA, Gotto AM. ELISA quantitation of apolipoproteins in plasma lipoprotein fractions: ApoE in apoB-containing lipoproteins (Lp B:E) and apoB in apoE-containing lipoproteins (Lp E:B). *J Protein Chem.* 1995;14:503–9.
80. Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, et al. Cholesterol in remnant-like lipoproteins in human serum using monoclonal anti apo B-100 and anti apo A-I immunoaffinity mixed gels. *Clin Chim Acta.* 1993 Dec 31;223(1-2):53–71.
81. Leary ET, Wang T, Baker DJ, Cilla DD, Zhong J, Warnick GR, et al. Evaluation of an immunoseparation method for quantitative measurement of remnant-like particle-cholesterol in serum and plasma. *Clin Chem.* 1998 Dec;44(12):2490–8.
82. Chandra R, Macfarlane RD. Remnant lipoprotein density profiling by CsBIEDTA density gradient ultracentrifugation. *Anal Chem.* 2006;78(3):680–5.
83. Campos E, Nakajima K, Tanaka A, Havel RJ. Properties of an apolipoprotein E-enriched fraction of triglyceride-rich lipoproteins isolated from human blood plasma with a monoclonal antibody to apolipoprotein B-100. *J Lipid Res.* 1992;33:369–80.



84. Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, et al. A new approach for the detection of type III hyperlipoproteinemia by RLP-cholesterol assay. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 1994.
85. Marcoux C, Tremblay M, Fredenrich A, Jacques H, Krimbou L, Nakajima K, et al. Plasma remnant-like particle lipid and apolipoprotein levels in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *Atherosclerosis*. 1998;139:161–71.
86. Pedro-Botet J, Flores-Le Roux JA, Mostaza JM, Pintó X, de la Cruz JJ, Banegas JR. Atherogenic dyslipidemia: prevalence and management in lipid clinic. *Journal of Internal Medicine*. 2014 Dec;214(9):491–8.
87. Nieves DJ, Cnop M, Retzlaff B, Walden CE, Brunzell JD, Knopp RH, et al. The atherogenic lipoprotein profile associated with obesity and insulin resistance is largely attributable to intra-abdominal fat. *Diabetes*. 2003 Jan;52(1):172–9.
88. Després J-P, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):881–7.
89. Adiels M, Borén J, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, et al. Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Aug;25(8):1697–703.
90. Hiukka A, Fruchart-Najib J, Leinonen E, Hilden H, Fruchart J-C, Taskinen M-R. Alterations of lipids and apolipoprotein CIII in very low density lipoprotein subspecies in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2005 Jun;48(6):1207–15.
91. Haque S, Bruce IN. Therapy insight: systemic lupus erythematosus as a risk factor for cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005;2:423–30.
92. Badui E, Garcia-Rubi D, Robles E, Jimenez J, Juan L, Deleze M, et al. Cardiovascular manifestations in systemic lupus erythematosus. Prospective study of 100 patients. *Angiology*. 1985 Jul;36(7):431–41.
93. Organization WH. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization. 2011.

- BIBLIOGRAFIA -

94. Defunciones según la causa de muerte. Año 2012. Instituto Nacional de Estadística. 2014;
95. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by re. Eur Heart J. 2012 Jul;33(13):1635–701.
96. Libby P. Atherosclerosis: the new view. Sci Am. 2002 May;286(5):46–55.
97. Westerweel PE, Luyten RKM a C, Koomans H a, Derksen RHWM, Verhaar MC. Premature atherosclerotic cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2007 May;56(5):1384–96.
98. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature. 2011 May 19;473(7347):317–25.
99. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. 2003 Oct;14(5):421–30.
100. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. N Engl J Med. 1999;340:14–22.
101. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: A systematic review and meta-analysis. Circulation. 2007;115:459–67.
102. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, Selzer RH, Liu CR, Liu CH, et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. Annals of internal medicine. 1998.
103. Sehestedt T, Jeppesen J, Hansen TW, Wachtell K, Ibsen H, Torp-Pedersen C, et al. Risk prediction is improved by adding markers of subclinical organ damage to SCORE. Eur Heart J. 2010 Apr;31(7):883–91.
104. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and



- myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 1997 Sep 2;96(5):1432–7.
105. Nambi V, Chambless L, Folsom AR, He M, Hu Y, Mosley T, et al. Carotid intima-media thickness and presence or absence of plaque improves prediction of coronary heart disease risk: the ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) study. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Apr 13;55(15):1600–7.
  106. Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancia G, Dal Palù C, et al. Calcium antagonist lacidipine slows down progression of asymptomatic carotid atherosclerosis: principal results of the European Lacidipine Study on Atherosclerosis (ELSA), a randomized, double-blind, long-term trial. *Circulation*. 2002 Nov 5;106(19):2422–7.
  107. Iwamoto Y, Maruhashi T, Fujii Y, Idei N, Fujimura N, Mikami S, et al. Intima-media thickness of brachial artery, vascular function, and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2295–303.
  108. Polak JF, Szklo M, Kronmal RA, Burke GL, Shea S, Zavodni AEH, et al. The value of carotid artery plaque and intima-media thickness for incident cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2013;2.
  109. De Groot E, van Leuven SI, Duivenvoorden R, Meuwese MC, Akdim F, Bots ML, et al. Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008 May;5(5):280–8.
  110. Nambi V, Chambless L, He M, Folsom AR, Mosley T, Boerwinkle E, et al. Common carotid artery intima-media thickness is as good as carotid intima-media thickness of all carotid artery segments in improving prediction of coronary heart disease risk in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Eur Heart J*. 2012 Jan;33(2):183–90.
  111. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013 Jul;34(28):2159–219.
  112. Darabian S, Hormuz M, Latif MA, Pahlevan S, Budoff MJ. The role of carotid intimal thickness testing and risk prediction in the



- BIBLIOGRAFIA -

- development of coronary atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2013 Mar;15(3):306.
113. Peters SAE, den Ruijter HM, Bots ML, Moons KGM. Improvements in risk stratification for the occurrence of cardiovascular disease by imaging subclinical atherosclerosis: a systematic review. *Heart.* 2012 Feb;98(3):177–84.
114. Lorenz MW, Schaefer C, Steinmetz H, Sitzer M. Is carotid intima media thickness useful for individual prediction of cardiovascular risk? Ten-year results from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Eur Heart J.* 2010 Aug;31(16):2041–8.
115. Den Ruijter HM, Peters SAE, Anderson TJ, Britton AR, Dekker JM, Eijkemans MJ, et al. Common carotid intima-media thickness measurements in cardiovascular risk prediction: a meta-analysis. *JAMA.* 2012 Aug 22;308(8):796–803.
116. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Dec 14;56(25):e50–103.
117. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen M-R, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J.* 2011 Jul;32(14):1769–818.
118. Mata P, Alonso R, Ruiz A, Gonzalez-Juanatey JR, Badimón L, Díaz-Díaz JL, et al. [Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolemia in Spain: consensus document]. *Aten Primaria.* 2015 Jan;47(1):56–65.
119. Hak AE, Karlson EW, Feskanich D, Stampfer MJ, Costenbader KH. Systemic lupus erythematosus and the risk of cardiovascular disease: results from the nurses' health study. *Arthritis Rheum.* 2009;61:1396–402.
120. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, Conte CG, Medsger TA, Jansen-McWilliams L, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 1997;145:408–15.



121. Jackson KG, Knapper-Francis JME, Morgan LM, Webb DH, Zampelas A, Williams CM. Exaggerated postprandial lipaemia and lower post-heparin lipoprotein lipase activity in middle-aged men. *Clin Sci (Lond)*. 2003 Oct;105(4):457–66.
122. Christensen B, Glueck C, Kwiterovich P, Degroot I, Chase G, Heiss G, et al. Plasma cholesterol and triglyceride distributions in 13,665 children and adolescents: the Prevalence Study of the Lipid Research Clinics Program. *Pediatr Res*. 1980 Mar;14(3):194–202.
123. Heiss G, Tamir I, Davis CE, Tyroler HA, Rifkind BM, Schonfeld G, et al. Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the lipid research clinics program prevalence study. *Circulation*. 1980 Feb;61(2):302–15.
124. Mouloupoulos SD, Adamopoulos PN, Diamantopoulos EI, Nanas SN, Anthopoulos LN, Iliadi-Alexandrou M. Coronary heart disease risk factors in a random sample of Athenian adults. The Athens Study. *Am J Epidemiol*. 1987 Nov;126(5):882–92.
125. Hershcopf RJ, Elahi D, Andres R, Baldwin HL, Raizes GS, Schocken DD, et al. Longitudinal changes in serum cholesterol in man: an epidemiologic search for an etiology. *J Chronic Dis*. 1982 Feb;35(2):101–14.
126. Anderson KM, Wilson PW, Garrison RJ, Castelli WP. Longitudinal and secular trends in lipoprotein cholesterol measurements in a general population sample. The Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis*. 1987 Nov;68(1-2):59–66.
127. Abbott RD, Garrison RJ, Wilson PW, Epstein FH, Castelli WP, Feinleib M, et al. Joint distribution of lipoprotein cholesterol classes. The Framingham study. *Arteriosclerosis*. 1983 Jan;3(3):260–72.
128. Newschaffer CJ, Bush TL, Hale WE. Aging and total cholesterol levels: cohort, period, and survivorship effects. *Am J Epidemiol*. 1992 Jul 1;136(1):23–34.
129. Ettinger WH, Wahl PW, Kuller LH, Bush TL, Tracy RP, Manolio TA, et al. Lipoprotein lipids in older people. Results from the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group. *Circulation*. 1992 Sep;86(3):858–69.
130. Carroll MD, Lacher DA, Sorlie PD, Cleeman JI, Gordon DJ, Wolz M, et al. Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002. *JAMA*. 2005 Oct 12;294(14):1773–81.

- BIBLIOGRAFIA -

131. Gould AL, Davies GM, Alemao E, Yin DD, Cook JR. Cholesterol reduction yields clinical benefits: meta-analysis including recent trials. *Clin Ther*. 2007 May;29(5):778–94.
132. Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, et al. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 2001 Sep 4;104(10):1108–13.
133. Maron DJ. The epidemiology of low levels of high-density lipoprotein cholesterol in patients with and without coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2000 Dec 21;86(12A):11L – 14L.
134. Gotto AM, Brinton EA. Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Mar 3;43(5):717–24.
135. Chapman MJ, Assmann G, Fruchart J-C, Shepherd J, Sirtori C. Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid—a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Curr Med Res Opin*. 2004 Aug;20(8):1253–68.
136. Jafri H, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Baseline and on-treatment high-density lipoprotein cholesterol and the risk of cancer in randomized controlled trials of lipid-altering therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Jun 22;55(25):2846–54.
137. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989 Jan;79(1):8–15.
138. Briel M, Ferreira-Gonzalez I, You JJ, Karanicolas PJ, Akl EA, Wu P, et al. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *BMJ*. 2009 Jan;338:b92.
139. Bainton D, Miller NE, Bolton CH, Yarnell JW, Sweetnam PM, Baker IA, et al. Plasma triglyceride and high density lipoprotein cholesterol as predictors of ischaemic heart disease in British men. The Caerphilly and Speedwell Collaborative Heart Disease Studies. *Br Heart J*. 1992;68:60–6.



140. Salonen JT, Puska P. Relation of serum cholesterol and triglycerides to the risk of acute myocardial infarction, cerebral stroke and death in eastern Finnish male population. *Int J Epidemiol.* 1983;12:26–31.
141. Cambien F, Jacqueson A, Richard JL, Warnet JM, Ducimetiere P, Claude JR. Is the level of serum triglyceride a significant predictor of coronary death in “normocholesterolemic” subjects? The Paris Prospective Study. *Am J Epidemiol.* 1986;124:624–32.
142. Criqui MH, Heiss G, Cohn R, Cowan LD, Suchindran CM, Bangdiwala S, et al. Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1993;328:1220–5.
143. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol.* 1992;70:733–7.
144. Menotti A, Spagnolo A, Scanga M, Dima F. Multivariate prediction of coronary deaths in a 10 year follow-up of an Italian occupational male cohort. *Acta Cardiol.* 1992;47:311–20.
145. Castelli WP. The triglyceride issue: a view from Framingham. *Am Heart J.* 1986 Aug;112(2):432–7.
146. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk.* 1996;3:213–9.
147. Smith SJ, Cooper GR, Myers GL, Sampson EJ. Biological variability in concentrations of serum lipids: sources of variation among results from published studies and composite predicted values. *Clin Chem.* 1993;39:1012–22.
148. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA.* 2007 Jul 18;298(3):299–308.
149. Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, Nordestgaard BG. Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population. *JAMA. American Medical Association;* 2008 Nov 12;300(18):2142–52.

- BIBLIOGRAFIA -

150. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA. American Medical Association*; 2007 Jul 18;298(3):309–16.
151. Wu W, Wang M, Sun Z, Wang X, Miao J, Zheng Z. The predictive value of TNF- $\alpha$  and IL-6 and the incidence of macrovascular complications in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 2012 Feb;49(1):3–7.
152. Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* 2009 Mar 28;373(9669):1083–96.
153. Halle M, Berg A, Frey I, König D, Keul J, Baumstark MW. Relationship between obesity and concentration and composition of low-density lipoprotein subfractions in normoinsulinemic men. *Metabolism.* 1995 Nov;44(11):1384–90.
154. Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, et al. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med.* 2010 Dec 2;363(23):2211–9.
155. Zheng W, McLerran DF, Rolland B, Zhang X, Inoue M, Matsuo K, et al. Association between body-mass index and risk of death in more than 1 million Asians. *N Engl J Med.* 2011 Feb 24;364(8):719–29.
156. Mackey RH, Kuller LH, Sutton-Tyrrell K, Evans RW, Holubkov R, Matthews KA. Lipoprotein subclasses and coronary artery calcium in postmenopausal women from the healthy women study. *Am J Cardiol.* 2002 Oct 17;90(8A):71i – 76i.
157. Skoglund-Andersson C, Tang R, Bond MG, de Faire U, Hamsten A, Karpe F. LDL particle size distribution is associated with carotid intima-media thickness in healthy 50-year-old men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Oct;19(10):2422–30.
158. Jago R, Drews KL, Otvos JD, Foster GD, Marcus MD, Buse JB, et al. Effect of relative weight group change on nuclear magnetic resonance spectroscopy derived lipoprotein particle size and concentrations among adolescents. *J Pediatr.* 2014 May;164(5):1091–8.e3.
159. Kochanek KD, Xu J, Murphy SL, Miniño AM, Kung H-C. Deaths: final data for 2009. *Natl Vital Stat Rep.* 2011 Dec 29;60(3):1–116.



160. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012 Jan 3;125(1):e2–220.
161. Anagnostis P, Stevenson JC, Crook D, Johnston DG, Godsland IF. Effects of menopause, gender and age on lipids and high-density lipoprotein cholesterol subfractions. *Maturitas*. 2015 May;81(1):62–8.
162. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J*. 1986 Feb;111(2):383–90.
163. Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med*. 1976 Oct;85(4):447–52.
164. Rosenberg L, Hennekens CH, Rosner B, Belanger C, Rothman KJ, Speizer FE. Early menopause and the risk of myocardial infarction. *Am J Obstet Gynecol*. 1981 Jan;139(1):47–51.
165. Løkkegaard E, Jovanovic Z, Heitmann BL, Keiding N, Ottesen B, Pedersen AT. The association between early menopause and risk of ischaemic heart disease: influence of Hormone Therapy. *Maturitas*. 2006 Jan 20;53(2):226–33.
166. Bittner V. Menopause, age, and cardiovascular risk: a complex relationship. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 15;54(25):2374–5.
167. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115–26.
168. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. Jan;420(6917):868–74.
169. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005 Apr 21;352(16):1685–95.
170. Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21 Suppl 1):II2–10.
171. Van Halm VP, Nielen MMJ, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Reesink HW, Voskuyl AE, et al. Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007 Feb;66(2):184–8.

- BIBLIOGRAFIA -

172. Barter PJ, Nicholls S, Rye K-A, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004 Oct 15;95(8):764–72.
173. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med.* 1997;337:1360–9.
174. Genest J, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner JL, Silberman SR, Anderson KM, et al. Lipoprotein cholesterol, apolipoprotein A-I and B and lipoprotein (a) abnormalities in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1992 Mar 15;19(4):792–802.
175. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CNB, Brewer HB, Clark LT, Hunninghake DB, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Aug;24(8):e149–61.
176. Musunuru K, Orho-Melander M, Caulfield MP, Li S, Salameh WA, Reitz RE, et al. Ion mobility analysis of lipoprotein subfractions identifies three independent axes of cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1975–80.
177. Mora S, Otvos JD, Rifai N, Rosenson RS, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation.* 2009 Mar 24;119(7):931–9.
178. Furusyo N, Ai M, Okazaki M, Ikezaki H, Ihara T, Hayashi T, et al. Serum cholesterol and triglyceride reference ranges of twenty lipoprotein subclasses for healthy Japanese men and women. *Atherosclerosis.* 2013 Dec;231(2):238–45.
179. Nikkilä M, Pitkälä T, Koivula T, Solakivi T, Lehtimäki T, Laippala P, et al. Women have a larger and less atherogenic low density lipoprotein particle size than men. *Atherosclerosis.* 1996 Jan 26;119(2):181–90.
180. Johnson JL, Slentz CA, Duscha BD, Samsa GP, McCartney JS, Houmard JA, et al. Gender and racial differences in lipoprotein subclass distributions: the STRRIDE study. *Atherosclerosis.* 2004 Oct;176(2):371–7.
181. St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, Mauriège P, Bernard P-M, Després J-P, et al. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up



- data from the Québec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Mar;25(3):553–9.
182. St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Després JP, et al. Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation.* 2001;104(19):2295–9.
  183. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA.* 1988;260(13):1917–21.
  184. Takayanagi N, Onuma T, Kato S, Nishiyama K, Nomiyama T, Kawamori R. Association between LDL particle size and postprandial increase of remnant-like particles in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004 Dec;66(3):245–52.
  185. Kuller LH, Grandits G, Cohen JD, Neaton JD, Prineas R. Lipoprotein particles, insulin, adiponectin, C-reactive protein and risk of coronary heart disease among men with metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2007 Nov;195(1):122–8.
  186. Otvos JD, Collins D, Freedman DS, Shalaurova I, Schaefer EJ, McNamara JR, et al. Low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclasses predict coronary events and are favorably changed by gemfibrozil therapy in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Circulation.* 2006 Mar 28;113(12):1556–63.
  187. Campos H, Moye LA, Glasser SP, Stampfer MJ, Sacks FM. Low-density lipoprotein size, pravastatin treatment, and coronary events. *JAMA.* 2001 Sep 26;286(12):1468–74.
  188. Krauss RM, Siri PW. Metabolic abnormalities: Triglyceride and low-density lipoprotein. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 2004. p. 405–15.
  189. Lada AT, Rudel LL. Associations of low density lipoprotein particle composition with atherogenicity. *Curr Opin Lipidol.* 2004 Feb;15(1):19–24.
  190. Koba S, Hirano T, Kondo T, Shibata M, Suzuki H, Murakami M, Geshi E KT. Significance of small dense low-density lipoproteins and other risk factors in patients with various types of coronary heart disease. *Am Heart J.* 2002 Dec;144(6):1026–35.



- BIBLIOGRAFIA -

191. Griffin BA. Lipoprotein atherogenicity: an overview of current mechanisms. *Proc Nutr Soc.* 1999 Feb;58(1):163–9.
192. Koba S, Yokota Y, Hirano T, Ito Y, Ban Y, Tsunoda F, et al. Small LDL-cholesterol is superior to LDL-cholesterol for determining severe coronary atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2008 Oct;15(5):250–60.
193. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, Dodge RC, Crosby JR, Jiang J, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 May;34(5):1069–77.
194. Tsai MY, Steffen BT, Guan W, McClelland RL, Warnick R, McConnell J, et al. New automated assay of small dense low-density lipoprotein cholesterol identifies risk of coronary heart disease: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Jan;34(1):196–201.
195. Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, Ito Y, Nakajima K, White CC, et al. Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study. *Clin Chem.* 2010 Jun;56(6):967–76.
196. Masulli M, Patti L, Riccardi G, Vaccaro O, Annuzzi G, Ebbesson SOE, et al. Relation among lipoprotein subfractions and carotid atherosclerosis in Alaskan Eskimos (from the GOCADAN Study). *Am J Cardiol.* 2009 Dec 1;104(11):1516–21.
197. Campos H, Roederer GO, Lussier-Cacan S, Davignon J, Krauss RM. Predominance of large LDL and reduced HDL2 cholesterol in normolipidemic men with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Aug;15(8):1043–8.
198. Takahashi R, Taguchi N, Suzuki M, Cheng XW, Numaguchi Y, Tsukamoto H, et al. Cholesterol and triglyceride concentrations in lipoproteins as related to carotid intima-media thickness. *Int Heart J.* 2012 Jan;53(1):29–34.
199. Mora S, Szklo M, Otvos JD, Greenland P, Psaty BM, Goff DC, et al. LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* 2007 May;192(1):211–7.
200. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of



- dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006 Sep;58(3):342–74.
201. Hafiane A, Genest J. High density lipoproteins: Measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk. *BBA Clin.* 2015 Jun;3:175–88.
  202. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Gulan B, et al. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: Prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis.* 2010;210(2):548–54.
  203. Asztalos BF, Collins D, Horvath K V, Bloomfield HE, Robins SJ, Schaefer EJ. Relation of gemfibrozil treatment and high-density lipoprotein subpopulation profile with cardiovascular events in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Metabolism.* 2008 Jan;57(1):77–83.
  204. Williams PT, Superko HR, Haskell WL, Alderman EL, Blanche PJ, Holl LG, et al. Smallest LDL particles are most strongly related to coronary disease progression in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Feb 1;23(2):314–21.
  205. Syväne M, Nieminen MS, Frick MH, Kauma H, Majahalme S, Virtanen V, et al. Associations between lipoproteins and the progression of coronary and vein-graft atherosclerosis in a controlled trial with gemfibrozil in men with low baseline levels of HDL cholesterol. *Circulation.* 1998 Nov 10;98(19):1993–9.
  206. Rosenson RS, Otvos JD, Freedman DS. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial. *Am J Cardiol.* 2002 Jul 15;90(2):89–94.
  207. Asztalos BF, Schaefer EJ. HDL in atherosclerosis: actor or bystander? *Atheroscler Suppl.* 2003 Mar;4(1):21–9.
  208. Watanabe H, Söderlund S, Soro-Paavonen A, Hiukka A, Leinonen E, Alagona C, et al. Decreased high-density lipoprotein (HDL) particle size, prebeta-, and large HDL subspecies concentration in Finnish low-HDL families: relationship with intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Apr;26(4):897–902.
  209. Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation

- BIBLIOGRAFIA -

- with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb*. 1991 Jan;11(1):174–82.
210. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath K V, Cox CE, Batista MC, et al. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Nov;24(11):2181–7.
211. Mueller O, Chang E, Deng D, Franz T, Jing D, Kincaid R, et al. PROCAM Study: risk prediction for myocardial infarction using microfluidic high-density lipoprotein (HDL) subfractionation is independent of HDL cholesterol. *Clin Chem Lab Med*. 2008 Jan;46(4):490–8.
212. Drexel H, Amann FW, Rentsch K, Neuenschwander C, Luethy A, Khan SI, et al. Relation of the level of high-density lipoprotein subfractions to the presence and extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1992 Aug 15;70(4):436–40.
213. Miller NE. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J*. 1987 Feb;113(2 Pt 2):589–97.
214. Yu S, Yarnell JWG, Sweetnam P, Bolton CH. High density lipoprotein subfractions and the risk of coronary heart disease: 9-years follow-up in the Caerphilly Study. *Atherosclerosis*. 2003 Feb;166(2):331–8.
215. Alagona C, Soro A, Ylitalo K, Salonen R, Salonen JT, Taskinen M-R. A low high density lipoprotein (HDL) level is associated with carotid artery intima-media thickness in asymptomatic members of low HDL families. *Atherosclerosis*. 2002 Dec;165(2):309–16.
216. Harangi M, Seres I, Harangi J, Paragh G. Benefits and difficulties in measuring HDL subfractions and human paraoxonase-1 activity during statin treatment. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009 Dec;23(6):501–10.
217. Morgan J, Carey C, Lincoff A, Capuzzi D. High-density lipoprotein subfractions and risk of coronary artery disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2004 Sep;6(5):359–65.
218. Williams PT, Krauss RM, Vranizan KM, Stefanick ML, Wood PD, Lindgren FT. Associations of lipoproteins and apolipoproteins with gradient gel electrophoresis estimates of high density lipoprotein



- subfractions in men and women. *Arterioscler Thromb*. 1992 Mar;12(3):332–40.
219. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry*. 1988 Jan 12;27(1):25–9.
220. Desai MY, Rodriguez A, Wasserman BA, Gerstenblith G, Agarwal S, Kennedy M, et al. Association of cholesterol subfractions and carotid lipid core measured by MRI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jun;25(6):e110–1.
221. Drexel H, Steurer J, Muntwyler J, Meienberg S, Schmid HR, Schneider E, et al. Predictors of the presence and extent of peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*. 1996 Nov 1;94(9 Suppl):II199–205.
222. Drexel H, Amann FW, Beran J, Rentsch K, Candinas R, Muntwyler J, et al. Plasma triglycerides and three lipoprotein cholesterol fractions are independent predictors of the extent of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1994 Nov;90(5):2230–5.
223. Ip S, Lichtenstein AH, Chung M, Lau J, Balk EM. Systematic review: association of low-density lipoprotein subfractions with cardiovascular outcomes. *Ann Intern Med*. 2009;150:474–84.
224. Kuller L, Arnold A, Tracy R, Otvos J, Burke G, Psaty B, et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of lipoproteins and risk of coronary heart disease in the cardiovascular health study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Jul 1;22(7):1175–80.
225. Blake GJ, Otvos JD, Rifai N, Ridker PM. Low-density lipoprotein particle concentration and size as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy as predictors of cardiovascular disease in women. *Circulation*. 2002 Oct 8;106(15):1930–7.
226. Soedamah-Muthu SS, Chang Y-F, Otvos J, Evans RW, Orchard TJ. Lipoprotein subclass measurements by nuclear magnetic resonance spectroscopy improve the prediction of coronary artery disease in Type 1 diabetes. A prospective report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia*. 2003 May;46(5):674–82.
227. Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath K V, Bloomfield HE, et al. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the

- BIBLIOGRAFIA -

- Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Oct;25(10):2185–91.
228. Nordestgaard BG, Nielsen LB. Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 1994;5:252–7.
229. Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Lewis B. Influx in vivo of low density, intermediate density, and very low density lipoproteins into aortic intimas of genetically hyperlipidemic rabbits. Roles of plasma concentrations, extent of aortic lesion, and lipoprotein particle size as determinants. *Arterioscler Thromb.* 1992 Jan;12(1):6–18.
230. Kasama T, Yoshino G, Iwatani I, Iwai M, Hatanaka H, Kazumi T, et al. Increased cholesterol concentration in intermediate density lipoprotein fraction of normolipidemic non-insulin-dependent diabetics. *Atherosclerosis.* 1987 Feb;63(2-3):263–6.
231. Steiner G, Tkác I, Uffelman KD, Lewis GF. Important contribution of lipoprotein particle number to plasma triglyceride concentration in type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 1998 Mar;137(1):211–4.
232. Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, Hussain MM, Innerarity TL, Mahley RW. Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem.* 1993 May 15;268(14):10160–7.
233. Evans AJ, Sawyez CG, Wolfe BM, Connelly PW, Maguire GF, Huff MW. Evidence that cholesteryl ester and triglyceride accumulation in J774 macrophages induced by very low density lipoprotein subfractions occurs by different mechanisms. *J Lipid Res.* 1993;34:703–17.
234. Hofker MH, van Vlijmen BJ, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1998;137:1–11.
235. Whitman SC, Miller DB, Wolfe BM, Hegele RA, Huff MW. Uptake of type III hypertriglyceridemic VLDL by macrophages is enhanced by oxidation, especially after remnant formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1707–15.
236. Praticò D, Tangirala RK, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA. Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nat Med.* 1998;4:1189–92.



237. Chung BH, Tallis G, Yalamoori V, Anantharamaiah GM, Segrest JP. Liposome-like particles isolated from human atherosclerotic plaques are structurally and compositionally similar to surface remnants of triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:622–35.
238. Chung BH, Segrest JP. Cytotoxicity of remnants of triglyceride-rich lipoproteins: an atherogenic insult? *Adv Exp Med Biol*. 1991;285:341–51.
239. Chung BH, Segrest JP, Smith K, Griffin FM, Brouillette CG. Lipolytic surface remnants of triglyceride-rich lipoproteins are cytotoxic to macrophages but not in the presence of high density lipoprotein. A possible mechanism of atherogenesis? *J Clin Invest*. 1989;83:1363–74.
240. Rutledge JC, Woo MM, Rezai AA, Curtiss LK, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase increases lipoprotein binding to the artery wall and increases endothelial layer permeability by formation of lipolysis products. *Circ Res*. 1997;80:819–28.
241. Mitropoulos KA, Miller GJ, Watts GF, Durrington PN. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins activates coagulant factor XII: a study in familial lipoprotein-lipase deficiency. *Atherosclerosis*. 1992;95:119–25.
242. McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, et al. Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2001 Jan;154(1):229–36.
243. McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, et al. Remnant lipoprotein cholesterol and triglyceride reference ranges from the Framingham Heart Study. *Clin Chem*. 1998;44:1224–32.
244. Devaraj S, Vega G, Lange R, Grundy SM, Jialal I. Remnant-like particle cholesterol levels in patients with dysbetalipoproteinemia or coronary artery disease. *Am J Med*. 1998;104:445–50.
245. Schaefer EJ, McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Ordovas JM, et al. Elevated remnant-like particle cholesterol and triglyceride levels in diabetic men and women in the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 2002 Jun;25(6):989–94.

- BIBLIOGRAFIA -

246. Shimizu H, Mori M, Saito T. An increase of serum remnant-like particles in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Clin Chim Acta*. 1993 Nov 30;221(1-2):191–6.
247. Nakamura T, Obata J ei, Hirano M, Kitta Y, Fujioka D, Saito Y, et al. Predictive value of remnant lipoprotein for cardiovascular events in patients with coronary artery disease after achievement of LDL-cholesterol goals. *Atherosclerosis*. 2011;218:163–7.
248. Tomono S, Kawazu S, Kato N, Ono T, Ishii C, Ito Y, et al. Uptake of remnant like particles (RLP) in diabetic patients from mouse peritoneal macrophages. *J Atheroscler Thromb*. 1994 Jan;1(2):98–102.
249. Shige H, Ishikawa T, Ikewaki K, Nishiwaki M, Higashi K, Nakajima K, et al. Remnant-like very-low-density lipoprotein isolated from hypertriglyceridemic patients by immunoaffinity chromatography suppressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A activity of cultured human skin fibroblasts. *Clin Chim Acta*. 1997 Feb 17;258(2):145–58.
250. Knöfler R, Nakano T, Nakajima K, Takada Y, Takada A. Remnant-like lipoproteins stimulate whole blood platelet aggregation in vitro. *Thromb Res*. 1995;78:161–71.
251. Mochizuki M, Takada Y, Urano T, Nagai N, Nakano T, Nakajima K, et al. The in vitro effects of chylomicron remnant and very low density lipoprotein remnant on platelet aggregation in blood obtained from healthy persons. *Thromb Res*. 1996 Mar 1;81(5):583–93.
252. Knöfler R, Nakano T, Nakajima K, Takada Y, Takada A. Remnant-like lipoproteins stimulate whole blood platelet aggregation in vitro. *Thromb Res*. 1995 Apr 15;78(2):161–71.
253. Saniabadi AR, Umemura K, Shimoyama M, Adachi M, Nakano M, Nakashima M. Aggregation of human blood platelets by remnant like lipoprotein particles of plasma chylomicrons and very low density lipoproteins. *Thromb Haemost*. 1997 May;77(5):996–1001.
254. Kugiyama K, Doi H, Motoyama T, Soejima H, Misumi K, Kawano H, et al. Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries. *Circulation*. 1998 Jun 30;97(25):2519–26.
255. Doi H, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Matsumura T, Ohta Y, et al. Remnants of chylomicron and very low density lipoprotein



- impaired endothelium-dependent vasorelaxation. *Atherosclerosis*. 1998 Apr;137(2):341–9.
256. Ikewaki K, Tohyama J, Nakata Y, Wakikawa T, Kido T, Mochizuki S. Fenofibrate effectively reduces remnants, and small dense LDL, and increases HDL particle number in hypertriglyceridemic men - a nuclear magnetic resonance study. *J Atheroscler Thromb*. 2004 Nov 20;11(5):278–85.
257. Karpe F, Boquist S, Tang R, Bond GM, de Faire U, Hamsten A. Remnant lipoproteins are related to intima-media thickness of the carotid artery independently of LDL cholesterol and plasma triglycerides. *J Lipid Res*. 2001 Jan;42(1):17–21.
258. Okazaki M, Usui S, Tokunaga K, Nakajima Y, Takeichi S, Nakano T, et al. Hypertriglyceridemia in pregnancy does not contribute to the enhanced formation of remnant lipoprotein particles. *Clin Chim Acta*. 2004 Jan;339(1-2):169–81.
259. Tanaka A, Tomie N, Nakano T, Nakajima K, Yui K, Tamura M, et al. Measurement of postprandial remnant-like particles (RLPs) following a fat-loading test. *Clin Chim Acta*. 1998;275:43–52.
260. Steiner G, Schwartz L, Shumak S, Poapst M. The association of increased levels of intermediate-density lipoproteins with smoking and with coronary artery disease. *Circulation*. 1987 Jan;75(1):124–30.
261. Gofman JW, Lindgren F. The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. *Science*. 1950 Mar 17;111(2877):166–71.
262. Tatami R, Mabuchi H, Ueda K, Ueda R, Haba T, Kametani T, et al. Intermediate-density lipoprotein and cholesterol-rich very low density lipoprotein in angiographically determined coronary artery disease. *Circulation*. 1981;64:1174–84.
263. Reardon MF, Nestel PJ, Craig IH, Harper RW. Lipoprotein predictors of the severity of coronary artery disease in men and women. *Circulation*. 1985;71:881–8.
264. Krauss RM, Williams PT, Brensike J, Detre KM, Lindgren FT, Kelsey SF, et al. Intermediate-density lipoproteins and progression of coronary artery disease in hypercholesterolaemic men. *Lancet*. 1987;2:62–5.



- BIBLIOGRAFIA -

265. Hodis HN, Mack WJ, Dunn M, Liu C, Liu C, Selzer RH, et al. Intermediate-density lipoproteins and progression of carotid arterial wall intima-media thickness. *Circulation*. 1997 Apr.
266. Mack WJ, Krauss RM, Hodis HN. Lipoprotein subclasses in the Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). Treatment effects and relation to coronary angiographic progression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996.
267. Phillips NR, Waters D, Havel RJ. Plasma lipoproteins and progression of coronary artery disease evaluated by angiography and clinical events. *Circulation*. 1993.
268. Watts GF, Mandalia S, Brunt JN, Slavin BM, Coltart DJ, Lewis B. Independent associations between plasma lipoprotein subfraction levels and the course of coronary artery disease in the St. Thomas' Atherosclerosis Regression Study (STARS). *Metabolism: clinical and experimental*. 1993.
269. Lyons TJ, Jenkins AJ, Zheng D, Klein RL, Otvos JD, Yu Y, et al. Nuclear magnetic resonance-determined lipoprotein subclass profile in the DCCT/EDIC cohort: associations with carotid intima-media thickness. *Diabet Med*. 2006 Sep;23(9):955–66.
270. Mora S, Otvos JD, Rosenson RS, Pradhan A, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle size and concentration by nuclear magnetic resonance and incident type 2 diabetes in women. *Diabetes*. 2010 May;59(5):1153–60.
271. Dobmeyer J, Lohrmann J, Feussner G. Prevalence and association of atherosclerosis at three different arterial sites in patients with type III hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 1996;119:89–98.
272. Mahley RW. Atherogenic hyperlipoproteinemia. The cellular and molecular biology of plasma lipoproteins altered by dietary fat and cholesterol. *Med Clin North Am*. 1982 Mar;66(2):375–402.
273. Bersot TP, Innerarity TL, Mahley RW, Havel RJ. Cholesteryl ester accumulation in mouse peritoneal macrophages induced by beta-migrating very low density lipoproteins from patients with atypical dysbetalipoproteinemia. *J Clin Invest*. 1983;72:1024–33.
274. Huff MW, Sawyez CG, Connelly PW, Maguire GF, Little JA, Hegele RA. Beta-VLDL in hepatic lipase deficiency induces apoE-mediated cholesterol ester accumulation in macrophages. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1282–90.



275. Ghiselli G, Schaefer EJ, Gascon P, Breser HB. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science*. 1981;214:1239–41.
276. Huff MW, Evans AJ, Sawyez CG, Wolfe BM, Nestel PJ. Cholesterol accumulation in J774 macrophages induced by triglyceride- rich lipoproteins. Comparison of very low density lipoprotein from subjects with type III, IV, and V hyperlipoproteinemias. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1991. p. 221–33.
277. Huang Y, Schwendner SW, Rall SC, Sanan DA, Mahley RW. Apolipoprotein E2 transgenic rabbits. Modulation of the type III hyperlipoproteinemic phenotype by estrogen and occurrence of spontaneous atherosclerosis. *J Biol Chem*. 1997;272:22685–94.
278. Sullivan PM, Mezdour H, Quarfordt SH, Maeda N. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe\*2. *J Clin Invest*. 1998;102:130–5.
279. Ebenbichler CF, Kirchmair R, Egger C, Patsch JR. Postprandial state and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 1995;6:286–90.
280. López-Miranda J, Pérez-Martínez P, Marín C, Moreno JA, Gómez P, Pérez-Jiménez F. Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:132–8.
281. Carmona L, Gabriel R, Laffon A, EPISER G de E. Proyecto EPISER 2000: prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española. *Rev Española Reumatol*. 2001;28(1):18–25.
282. Danchenko N, Satia J, Anthony. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*. 2006;15:308–18.
283. Sanchez-Guerrero J, Karlson EW, Liang MH, Hunter DJ, Speizer FE, Colditz GA. Past use of oral contraceptives and the risk of developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997 May;40(5):804–8.
284. Zandman-Goddard G, Solomon M, Rosman Z, Peeva E, Shoenfeld Y. Environment and lupus-related diseases. *Lupus*. 2012 Mar;21(3):241–50.

- BIBLIOGRAFIA -

285. Costenbader KH, Feskanich D, Stampfer MJ, Karlson EW. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum.* 2007 Apr;56(4):1251–62.
286. McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2003 Aug;48(8):2100–10.
287. Estes D, Christian CL. The natural history of systemic lupus erythematosus by prospective analysis. *Medicine (Baltimore).* 1971 Mar;50(2):85–95.
288. McCombs RP, Patterson JF. Factors influencing the course and prognosis of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 1959 Jun 11;260(24):1195–204.
289. Wallace DJ, Podell TE, Weiner JM, Cox MB, Klinenberg JR, Forouzesh S, et al. Lupus nephritis. Experience with 230 patients in a private practice from 1950 to 1980. *Am J Med.* 1982;72:209–20.
290. Wallace DJ, Podell T, Weiner J, Klinenberg JR, Forouzesh S, Dubois EL. Systemic lupus erythematosus--survival patterns. Experience with 609 patients. *Jama J Am Med Assoc.* 1981;245:934–8.
291. Dubois EL, Wierchowicki M, Cox MB, Weiner JM. Duration and death in systemic lupus erythematosus. An analysis of 249 cases. *JAMA.* 1974 Mar 25;227(12):1399–402.
292. Urowitz MB, Gladman DD, Abu-Shakra M, Farewell VT. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. III. Improved survival over 24 years. *J Rheumatol.* 1997;24:1061–5.
293. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore).* 2003;82:299–308.
294. Bansal VK, Beto JA. Treatment of lupus nephritis: a meta-analysis of clinical trials. *Am J Kidney Dis.* 1997;29:193–9.
295. Kasitanon N, Magder LS, Petri M a. Predictors of survival in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore).* 2006;85:147–56.



296. Urowitz MB, Bookman AA, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1976;60:221–5.
297. Rubin LA, Urowitz MB, Gladman DD. Mortality in systemic lupus erythematosus: the bimodal pattern revisited. *Q J Med.* 1985;55:87–98.
298. Svenungsson E, Jensen-Urstad K, Heimbürger M, Silveira A, Hamsten A, De Faire U, et al. Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Circulation.* 2001;104:1887–93.
299. Lam GKW, Petri M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2005;23:S120–30.
300. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996 Mar;39(3):363–9.
301. Gladman DD, Urowitz MB, Goldsmith CH, Fortin P, Ginzler E, Gordon C, et al. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 May;40(5):809–13.
302. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725.
303. Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012 Aug;64(8):2677–86.
304. Alamanos Y, Voulgari P V, Papassava M, Tsamandouraki K, Drosos AA, Parassava M. Survival and mortality rates of systemic lupus erythematosus patients in northwest Greece. Study of a 21-year incidence cohort. *Rheumatology (Oxford).* 2003 Sep;42(9):1122–3.
305. Manger K, Manger B, Repp R, Geisselbrecht M, Geiger A, Pfahlberg A, et al. Definition of risk factors for death, end stage renal disease, and thromboembolic events in a monocentric cohort of 338 patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:1065–70.

- BIBLIOGRAFIA -

306. Neumann K, Wallace DJ, Azen C, Nessim S, Fichman M, Metzger AL, et al. Lupus in the 1980s: III. Influence of clinical variables, biopsy, and treatment on the outcome in 150 patients with lupus nephritis seen at a single center. *Semin Arthritis Rheum.* 1995;25:47–55.
307. Ståhl-Hallengren C, Jönsen A, Nived O, Sturfelt G. Incidence studies of systemic lupus erythematosus in Southern Sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis. *J Rheumatol.* 2000;27:685–91.
308. Donadio J V, Hart GM, Bergstralh EJ, Holley KE. Prognostic determinants in lupus nephritis: a long-term clinicopathologic study. *Lupus.* 1995;4:109–15.
309. Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. II. Predictor variables for mortality. *J Rheumatol.* 1995;22:1265–70.
310. Petri M, Perez-Gutthann S, Spence D, Hochberg MC. Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1992 Nov;93(5):513–9.
311. Jacobsen S, Petersen J, Ullman S, Junker P, Voss A, Rasmussen JM, et al. Mortality and causes of death of 513 Danish patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 1999;28:75–80.
312. Font J, Ramos-Casals M, Cervera R, García-Carrasco M, Torras A, Sisó A, et al. Cardiovascular risk factors and the long-term outcome of lupus nephritis. *QJM Mon J Assoc Physicians.* 2001;94:19–26.
313. Nossent JC. Course and prognostic value of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index in black Caribbean patients. *Semin Arthritis Rheum.* 1993;23:16–21.
314. Reveille JD, Bartolucci A, Alarcón GS. Prognosis in systemic lupus erythematosus. Negative impact of increasing age at onset, black race, and thrombocytopenia, as well as causes of death. *Arthritis Rheum.* 1990;33:37–48.
315. Kannel WB, Wilson PW. Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch Intern Med.* 1995;155:57–61.



316. Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42:338–46.
317. Borchers AT, Keen CL, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2004 Aug;3(6):423–53.
318. Kao AH, Lertratanakul A, Elliott JR, Sattar A, Santelices L, Shaw P, et al. Relation of Carotid Intima-Media Thickness and Plaque With Incident Cardiovascular Events in Women With Systemic Lupus Erythematosus. *Am J Cardiol.* 2013 Jul 2;112(7):1025–32.
319. Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald SG, Rairie JE, Tracy RP, et al. Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42(1):51–60.
320. Gladman DD, Urowitz MB. Morbidity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol Suppl.* 1987 Jun;14 Suppl 1:223–6.
321. Toloza SMA, Uribe AG, McGwin G, Alarcón GS, Fessler BJ, Bastian HM, et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXIII. Baseline predictors of vascular events. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3947–57.
322. Jonsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine (Baltimore).* 1989;68:141–50.
323. Kitagawa Y, Gotoh F, Koto A, Okayasu H. Stroke in systemic lupus erythematosus. *Stroke.* 1990 Nov;21(11):1533–9.
324. Petri M, Roubenoff R, Dallal GE, Nadeau MR, Selhub J, Rosenberg IH. Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *Lance.* 1996;348:1120–4.
325. Bulkley BH, Roberts WC. The heart in systemic lupus erythematosus and the changes induced in it by corticosteroid therapy. A study of 36 necropsy patients. *Am J Med.* 1975;58:243–64.
326. Haider YS, Roberts WC. Coronary arterial disease in systemic lupus erythematosus; quantification of degrees of narrowing in 22 necropsy patients (21 women) aged 16 to 37 years. *Am J Med.* 1981;70:775–81.

- BIBLIOGRAFIA -

327. Asanuma Y, Oeser A, Shintani AK, Turner E, Olsen N, Fazio S, et al. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349:2407–15.
328. Ahmad Y, Shelmerdine J, Bodill H, Lunt M, Patrick MG, Teh LS, et al. Subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus (SLE): the relative contribution of classic risk factors and the lupus phenotype. *Rheumatology (Oxford).* 2007 Jun;46(6):983–8.
329. Kiani AN, Vogel-Claussen J, Magder LS, Petri M. Noncalcified coronary plaque in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2010;37:579–84.
330. Wolak T, Todosoui E, Szendro G, Bolotin A, Jonathan B-S, Flusser D, et al. Duplex study of the carotid and femoral arteries of patients with systemic lupus erythematosus: a controlled study. *J Rheumatol.* 2004;31:909–14.
331. Thompson T, Sutton-Tyrrell K, Wildman RP, Kao A, Fitzgerald SG, Shook B, et al. Progression of carotid intima-media thickness and plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008 Mar;58(3):835–42.
332. Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am J Med.* 2003 Dec 8;115 Suppl :99S – 106S.
333. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III27–I32.
334. Lima DSN, Sato EI, Lima VC, Miranda F, Hatta FH. Brachial endothelial function is impaired in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002 Feb;29(2):292–7.
335. El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y, Durrington PN, Mackness M, Walker M, et al. Systemic lupus erythematosus - An independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation.* 2004. p. 399–404.
336. Haque S, Alexander MY, Bruce IN. Endothelial progenitor cells: a new player in lupus? *Arthritis Res Ther.* 2012;14:203.
337. Bijl M. Endothelial activation, endothelial dysfunction and premature atherosclerosis in systemic autoimmune diseases. *Neth J Med.* 2003;61:273–7.



338. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T, Li Y, Panaritis C, Du Berger R, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2331–7.
339. Del Rincón ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2737–45.
340. Roman MJ, Shanker B-A, Davis A, Lockshin MD, Sammaritano L, Simantov R, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349:2399–406.
341. Sherer Y, Zinger H, Shoenfeld Y. Atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2010;43:98–102.
342. Sinicato NA, da Silva Cardoso PA, Appenzeller S. Risk factors in cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Cardiol Rev.* 2013;9:15–9.
343. Petri M. Detection of coronary artery disease and the role of traditional risk factors in the Hopkins Lupus Cohort. *Lupus.* 2000;9:170–5.
344. Gustafsson JT, Simard JF, Gunnarsson I, Elvin K, Lundberg IE, Hansson L-O, et al. Risk factors for cardiovascular mortality in patients with systemic lupus erythematosus, a prospective cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R46.
345. Negrón AM, Molina MJ, Mayor AM, Rodríguez VE, Vilá LM. Factors associated with metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus from Puerto Rico. *Lupus.* 2008;17:348–54.
346. Mok CC, Poon WL, Lai JPS, Wong CK, Chiu SM, Lun SWM, et al. Metabolic syndrome, endothelial injury, and subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus: comments on the article by Mok et al. *Scand J Rheumatol.* 2010;39:42–9.
347. Sabio JM, Zamora-Pasadas M, Jiménez-Jáimez J, Albadalejo F, Vargas-Hitos J, Rodríguez Del Aguila MDM, et al. Metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus from Southern Spain. *Lupus.* 2008;17:849–59.



- BIBLIOGRAFIA -

348. Borba EF, Bonfá E. Dyslipoproteinemias in systemic lupus erythematosus: influence of disease, activity, and anticardiolipin antibodies. *Lupus*. 1997;6:533–9.
349. Borba EF, Santos RD, Bonfa E, Vinagre CG, Pileggi FJ, Cossermelli W, et al. Lipoprotein(a) levels in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1994 Feb;21(2):220–3.
350. Svenungsson E, Gunnarsson I, Fei G-Z, Lundberg IE, Klareskog L, Frostegård J. Elevated triglycerides and low levels of high-density lipoprotein as markers of disease activity in association with up-regulation of the tumor necrosis factor alpha/tumor necrosis factor receptor system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2003 Sep;48(9):2533–40.
351. Ouyang X, Dai Y, Wen JL, Wang LX. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomic study of metabolic profiling for systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2011 Nov;20(13):1411–20.
352. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:831–42.
353. Van Lenten BJ, Wagner AC, Anantharamaiah GM, Garber DW, Fishbein MC, Adhikary L, et al. Influenza infection promotes macrophage traffic into arteries of mice that is prevented by D-4F, an apolipoprotein A-I mimetic peptide. *Circulation*. 2002;106:1127–32.
354. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Hough G, Wagner A, et al. Human apolipoprotein AI mimetic peptides for the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003;4:1100–4.
355. McMahon M, Grossman J, Skaggs B, Fitzgerald J, Sahakian L, Ragavendra N, et al. Dysfunctional proinflammatory high-density lipoproteins confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2428–37.
356. McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace DJ, Thong BY, et al. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:2541–9.
357. Kiss E, Seres I, Tarr T, Kocsis Z, Szegedi G, Paragh G. Reduced paraoxonase1 activity is a risk for atherosclerosis in patients with



- systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1108:83–91.
358. Delgado Alves J, Ames PRJ, Donohue S, Stanyer L, Nourooz-Zadeh J, Ravirajan C, et al. Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2686–94.
359. Lahita RG, Rivkin E, Cavanagh I, Romano P. Low levels of total cholesterol, high-density lipoprotein, and apolipoprotein A1 in association with anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1993;36:1566–74.
360. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1987–94.
361. Libby P. Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. *Am J Cardiol.* 2001;88:3N – 8N.
362. Svenungsson E, Fei GZ, Jensen-Urstad K, De Faire U, Hamsten A, Frostegard J. TNF-alpha: a link between hypertriglyceridaemia and inflammation in SLE patients with cardiovascular disease. *Lupus.* 2003;12:454–61.
363. Parra S, Castro A, Masana L. The pleiotropic role of HDL in autoimmune diseases. *Clin Investig Arterioscler. Jan;*27(2):97–106.
364. Rahman P, Urowitz MB, Gladman DD, Bruce IN, Genest J. Contribution of traditional risk factors to coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1999;26:2363–8.
365. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836–43.
366. Skamra C, Ramsey-Goldman R. Management of cardiovascular complications in systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Rheumatol.* 2010 Feb 1;5(1):75–100.
367. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. Mechanisms of premature atherosclerosis in rheumatoid arthritis and lupus. *Annu Rev Med.* 2013 Jan;64:249–63.

- BIBLIOGRAFIA -

368. López-Pedrerera C, Aguirre MÁ, Barbarroja N, Cuadrado MJ. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010.
369. Horwitz DA, Jacob CO. The cytokine network in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and possible therapeutic implications. *Springer Semin Immunopathol.* 1994 Jan;16(2-3):181–200.
370. Hyka N, Dayer JM, Modoux C, Kohno T, Edwards CK, Roux-Lombard P, et al. Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood.* 2001;97:2381–9.
371. Borba EF, Bonfá E, Vinagre CG, Ramires JA, Maranhão RC. Chylomicron metabolism is markedly altered in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1033–40.
372. Vallvé J-C, Paredes S, Girona J, Uliaque K, Ribalta J, Hurt-Camejo E, et al. Tumor necrosis factor-alpha -1031 T/C polymorphism is associated with smaller and more proatherogenic low density lipoprotein particles in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008 Sep;35(9):1697–703.
373. Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Raggi P, Gebretsadik T, et al. Novel cardiovascular risk factors in premature coronary atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2008;35:1789–94.
374. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH, et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med.* 1999;106:506–12.
375. Goudevenos J, Tselepis AD, Vini MP, Michalis L, Tsoukatos DC, Elisaf M, et al. Platelet-associated and secreted PAF-acetylhydrolase activity in patients with stable angina: sequential changes of the enzyme activity after angioplasty. *Eur J Clin Invest.* 2001;31:15–23.
376. Elinder LS, Dumitrescu A, Larsson P, Hedin U, Frostegård J, Claesson HE. Expression of phospholipase A2 isoforms in human normal and atherosclerotic arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2257–63.



377. Huang YH, Schäfer-Elinder L, Wu R, Claesson HE, Frostegård J. Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-activating factor (PAF) receptor-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol.* 1999;116:326–31.
378. George J, Harats D, Gilburd B, Levy Y, Langevitz P, Shoenfeld Y. Atherosclerosis-related markers in systemic lupus erythematosus patients: the role of humoral immunity in enhanced atherogenesis. *Lupus.* 1999 Jan;8(3):220–6.
379. Sherer Y, Shoenfeld Y. Atherosclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2002 Feb;61(2):97–9.
380. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini ML, Makino H, Sakairi N, et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res.* 2003 Apr;44(4):716–26.
381. Shoenfeld Y, Sherer Y, George J, Harats D. Autoantibodies associated with atherosclerosis. *Ann Med.* 2000;32 Suppl 1:37–40.
382. Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clin Exp Immunol.* 1997 Mar;107(3):569–73.
383. Lopes-Virella MF, Binzafar N, Rackley S, Takei A, La Via M, Virella G. The uptake of LDL-IC by human macrophages: predominant involvement of the Fc gamma RI receptor. *Atherosclerosis.* 1997 Dec;135(2):161–70.
384. Iuliano L, Praticò D, Ferro D, Pittoni V, Valesini G, Lawson J, et al. Enhanced lipid peroxidation in patients positive for antiphospholipid antibodies. *Blood.* 1997;90:3931–5.
385. Abou-Raya A, el-Hallous D, Fayed H. 8-Isoprostaglandin F2 alpha: a potential index of lipid peroxidation in systemic lupus erythematosus. *Clin Invest Med.* 2004;27:306–11.
386. Zeller CB, Appenzeller S. Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus: The Role of Traditional and Lupus Related Risk Factors. *Curr Cardiol Rev.* Bentham Science Publishers Ltd.; 2008;4(2):116–22.
387. Bergmark C, Wu R, de Faire U, Lefvert AK, Swedenborg J. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of

- BIBLIOGRAFIA -

- autoantibodies against oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:441–5.
388. Frostegård J, Svenungsson E, Wu R, Gunnarsson I, Lundberg IE, Klareskog L, et al. Lipid peroxidation is enhanced in patients with systemic lupus erythematosus and is associated with arterial and renal disease manifestations. *Arthritis Rheum.* 2005;52:192–200.
389. Memon RA, Staprans I, Noor M, Holleran WM, Uchida Y, Moser AH, et al. Infection and inflammation induce LDL oxidation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1536–42.
390. Wu R, de Faire U, Lemne C, Witztum JL, Frostegård J. Autoantibodies to OxLDL are decreased in individuals with borderline hypertension. *Hypertension.* 1999;33:53–9.
391. Hulthe J, Wiklund O, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Antibodies to oxidized LDL in relation to carotid atherosclerosis, cell adhesion molecules, and phospholipase A(2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:269–74.
392. Karvonen J, Päivänsalo M, Kesäniemi YA, Hörkkö S. Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. *Circulation.* 2003;108:2107–12.
393. Binder CJ, Chang M-K, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med.* 2002;8:1218–26.
394. Salonen JT, Ylä-Herttua S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, et al. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1992;339:883–7.
395. Lopes-Virella MF, Virella G, Orchard TJ, Koskinen S, Evans RW, Becker DJ, et al. Antibodies to oxidized LDL and LDL-containing immune complexes as risk factors for coronary artery disease in diabetes mellitus. *Clin Immunol.* 1999;90:165–72.
396. Garcia-De La Torre I, Palafox-Sanchez C, Salazar-Paramo M, Lopez L, Hurley B, Matsuura E. Oxidized low-density lipoprotein and  $\beta$ 2-glycoprotein I in patients with systemic lupus erythematosus and increased carotid intima-media thickness: implications in autoimmune-mediated atherosclerosis. *Lupus.* 2006. p. 80–6.



397. Bassi N, Ghirardello A, Iaccarino L, Zampieri S, Rampudda ME, Atzeni F, et al. OxLDL/beta2GPI-anti-oxLDL/beta2GPI complex and atherosclerosis in SLE patients. *Autoimmun Rev.* 2007;7:52–8.
398. Nowak B, Szmyrka-Kaczmarek M, Durazińska A, Płaksej R, Borysewicz K, Korman L, et al. Anti-ox-LDL antibodies and anti-ox-LDL-B2GPI antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Clin Exp Med.* 2012;21:331–5.
399. Shoenfeld Y, Wu R, Dearing LD, Matsuura E. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective? *Circulation.* 2004 Oct 26;110(17):2552–8.
400. Zampieri S, Iaccarino L, Ghirardello A, Tarricone E, Arienti S, Sarzi-Puttini P, et al. Systemic lupus erythematosus, atherosclerosis, and autoantibodies. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1051:351–61.
401. Frostegård J. SLE, atherosclerosis and cardiovascular disease. *J Intern Med.* 2005;257:485–95.
402. Turner E, Dishy V, Chung CP, Harris P, Pierces R, Asanuma Y, et al. Endothelial function in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity, cardiovascular risk factors, corticosteroid therapy, and coronary calcification. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1:357–60.
403. Zonana-Nacach A, Barr SG, Magder LS, Petri M. Damage in systemic lupus erythematosus and its association with corticosteroids. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1801–8.
404. Bellomio V, Spindler A, Lucero E, Berman A, Santana M, Moreno C, et al. Systemic lupus erythematosus: mortality and survival in Argentina. A multicenter study. *Lupus.* 2000;9:377–81.
405. Petri M, Lakatta C, Magder L, Goldman D. Effect of prednisone and hydroxychloroquine on coronary artery disease risk factors in systemic lupus erythematosus: a longitudinal data analysis. *Am J Med.* 1994;96:254–9.
406. Makheja AN, Bloom S, Muesing R, Simon T, Bailey JM. Anti-inflammatory drugs in experimental atherosclerosis. 7. Spontaneous atherosclerosis in WHHL rabbits and inhibition by cortisone acetate. *Atherosclerosis.* 1989;76:155–61.
407. Leong KH, Koh ET, Feng PH, Boey ML. Lipid profiles in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1994;21:1264–7.

- BIBLIOGRAFIA -

408. Rahman P, Gladman DD, Urowitz MB. Premature coronary artery disease in systemic lupus erythematosus in the absence of corticosteroid use. *J Rheumatol.* 2000 May;27(5):1323–5.
409. Serikova SI, Kozlovskaja NL, Shilov EM. Lupus nephritis as a factor of atherosclerosis risk in patients with systemic lupus erythematosus. *Ter Arkh.* 2008;80:52–8.
410. Karsh J, Klippel JH, Balow JE, Decker JL. Mortality in lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 1979;22:764–9.
411. Van Tits L, De Graaf J, Hak-Lemmers H, Bredie S, Demacker P, Holvoet P, et al. Increased levels of low-density lipoprotein oxidation in patients with familial hypercholesterolemia and in end-stage renal disease patients on hemodialysis. *Lab Invest.* 2003;83:13–21.
412. Lee HS, Kim YS. Identification of oxidized low density lipoprotein in human renal biopsies. *Kidney Int.* 1998;54:848–56.
413. Lagogianni I, Papapanagiotou A, Piperi C, Kalofoutis C, Troupis G, Zachari A, et al. Evidence of reduced plasma HDL subfractions in patients with cutaneous discoid lupus erythematosus. *Clin Biochem.* 2005 Mar;38(3):286–90.
414. Posadas-Romero C, Torres-Tamayo M, Zamora-González J, Aguilar-Herrera BE, Posadas-Sánchez R, Cardoso-Saldaña G, et al. High insulin levels and increased low-density lipoprotein oxidizability in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004 Jan;50(1):160–5.
415. Parra S, Vives G, Ferré R, González M, Guardiola M, Ribalta J, et al. Complement system and small HDL particles are associated with subclinical atherosclerosis in SLE patients. *Atherosclerosis.* 2012 Nov;225(1):224–30.
416. Chung CP, Oeser A, Raggi P, Solus JF, Avalos I, Linton MF, et al. Lipoprotein subclasses and particle size determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2008 Oct;27(10):1227–33.
417. Hua X, Su J, Svenungsson E, Hurt-Camejo E, Jensen-Urstad K, Angelin B, et al. Dyslipidaemia and lipoprotein pattern in systemic lupus erythematosus (SLE) and SLE-related cardiovascular disease. *Scand J Rheumatol.* 2009 Jan;38(3):184–9.



418. Sato H, Miida T, Wada Y, Maruyama M, Murakami S, Hasegawa H, et al. Atherosclerosis is accelerated in patients with long-term well-controlled systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Chim Acta*. 2007 Oct;385(1-2):35–42.
419. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr*. 2008 Feb;21(2):93–111; quiz 189–90.
420. Junyent M, Gilabert R, Núñez I, Corbella E, Cofána M, Zambón D, et al. [Femoral ultrasound in the assessment of preclinical atherosclerosis. Distribution of intima-media thickness and frequency of atheroma plaques in a Spanish community cohort]. *Med Clin (Barc)*. 2008 Nov 1;131(15):566–71.
421. Temelkova-Kurktschiev T, Fischer S, Koehler C, Mennicken G, Henkel E, Hanefeld M. [Intima-media thickness in healthy probands without risk factors for arteriosclerosis]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001 Feb 23;126(8):193–7.
422. Howard G, Sharrett AR, Heiss G, Evans GW, Chambless LE, Riley WA, et al. Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. *ARIC Investigators. Stroke*. 1993 Sep;24(9):1297–304.
423. De Leeuw K, Freire B, Smit AJ, Bootsma H, Kallenberg CG, Bijl M. Traditional and non-traditional risk factors contribute to the development of accelerated atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2006;15(10):675–82.
424. Frerix M, Stegbauer J, Kreuter A, Weiner SM. Atherosclerotic plaques occur in absence of intima-media thickening in both systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus: a duplexsonography study of carotid and femoral arteries and follow-up for cardiovascular events. *Arthritis Res Ther*. 2014 Jan;16(1):R54.
425. Eder L, Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. The correlation between carotid artery atherosclerosis and clinical ischemic heart disease in lupus patients. *Lupus*. 2014 Oct;23(11):1142–8.
426. Kane J, Malloy MJ. Emerging roles of qualitative properties of lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2014 Oct;25(5):406–7.



- BIBLIOGRAFIA -

427. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972 Jun;18(6):499–502.
428. Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald SG, Pratt JE, Tracy RP, Kuller LH, et al. Comparison of risk factors for vascular disease in the carotid artery and aorta in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004 Jan;50(1):151–9.
429. Kiani AN, Fang H, Akhter E, Quiroga C, Simpson N, Alaupovic P, et al. Apolipoprotein-containing lipoprotein subclasses and subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2015 Mar;67(3):442–6.
430. Al-Shahrouri HZ, Ramirez P, Fanti P, Abboud H, Lorenzo C, Haffner S. NMR identifies atherogenic lipoprotein abnormalities in early diabetic nephropathy that are unrecognized by conventional analysis. *Clin Nephrol.* 2010 Mar;73(3):180–9.
431. Colhoun HM, Otvos JD, Rubens MB, Taskinen MR, Underwood SR, Fuller JH. Lipoprotein subclasses and particle sizes and their relationship with coronary artery calcification in men and women with and without type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002 Jun;51(6):1949–56.
432. Damasceno NRT, Sala-Vila A, Cofán M, Pérez-Heras AM, Fitó M, Ruiz-Gutiérrez V, et al. Mediterranean diet supplemented with nuts reduces waist circumference and shifts lipoprotein subfractions to a less atherogenic pattern in subjects at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 2013 Oct;230(2):347–53.
433. Rizzo M, Pernice V, Frasheri A, Di Lorenzo G, Rini GB, Spinass GA, et al. Small, dense low-density lipoproteins (LDL) are predictors of cardio - and cerebro-vascular events in subjects with the metabolic syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;70(6):870–5.
434. Prado KB, Shugg S, Backstrand JR. Low-density lipoprotein particle number predicts coronary artery calcification in asymptomatic adults at intermediate risk of cardiovascular disease. *J Clin Lipidol.* 2011 Jan;5(5):408–13.
435. Vakkilainen J, Steiner G, Ansquer J-C, Aubin F, Rattier S, Foucher C, et al. Relationships between low-density lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS). *Circulation.* 2003 Apr 8;107(13):1733–7.



436. Liu ML, Ylitalo K, Nuotio I, Salonen R, Salonen JT, Taskinen MR. Association between carotid intima-media thickness and low-density lipoprotein size and susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in asymptomatic members of familial combined hyperlipidemia families. *Stroke*. 2002;33(5):1255–60.
437. Arsenault BJ, Lemieux I, Després J-P, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJP, et al. Cholesterol levels in small LDL particles predict the risk of coronary heart disease in the EPIC-Norfolk prospective population study. *Eur Heart J*. 2007 Nov;28(22):2770–7.
438. Yeo Y, Byun SW, Lee JY, Min W-K, Park JS, Kim SB. Lack of association between small dense low-density lipoprotein levels and coronary artery disease in chronic hemodialysis patients. *Am J Nephrol*. 2009 Jan;30(3):310–4.
439. Shoji T, Hatsuda S, Tsuchikura S, Shinohara K, Kimoto E, Koyama H, et al. Small dense low-density lipoprotein cholesterol concentration and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):582–8.
440. Norata GD, Raselli S, Grigore L, Garlaschelli K, Vianello D, Bertocco S, et al. Small dense LDL and VLDL predict common carotid artery IMT and elicit an inflammatory response in peripheral blood mononuclear and endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2009;206(2):556–62.
441. Berneis K, Rizzo M, Spinass GA, Di Lorenzo G, Di Fede G, Pepe I, et al. The predictive role of atherogenic dyslipidemia in subjects with non-coronary atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2009;406(1-2):36–40.
442. Zhao CX, Cui YH, Fan Q, Wang PH, Hui R, Cianflone K, et al. Small dense low-density lipoproteins and associated risk factors in patients with stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27(1):99–104.
443. Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, Lee NE, Ahfeldt T, Sachs K V, et al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature*. 2010;466(7307):714–9.
444. Weber HS, Selimi D, Huber G. Prevention of cardiovascular diseases and highly concentrated n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs). *Herz*. 2006 Dec;31 Suppl 3:24–30.
445. Buttari B, Profumo E, Mattei V, Siracusano A, Ortona E, Margutti P, et al. Oxidized beta2-glycoprotein I induces human dendritic cell maturation and promotes a T helper type 1 response. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3880–7.

- BIBLIOGRAFIA -

446. Chung M, Lichtenstein AH, Ip S, Lau J, Balk EM. Comparability of methods for LDL subfraction determination: A systematic review. *Atherosclerosis*. 2009. p. 342–8.
447. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Shalaurova I, Cupples LA, Parise H, et al. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: the Framingham Study. *Clin Chem*. 2004 Jul;50(7):1189–200.
448. Magge SN, Prasad D, Koren D, Gallagher PR, Mohler ER, Stettler N, et al. Prediabetic obese adolescents have a more atherogenic lipoprotein profile compared with normoglycemic obese peers. *J Pediatr*. 2012 Nov;161(5):881–6.
449. Goff DC, D'Agostino RB, Haffner SM, Otvos JD. Insulin resistance and adiposity influence lipoprotein size and subclass concentrations. Results from the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Metabolism*. 2005 Mar;54(2):264–70.
450. Magkos F, Mohammed BS, Mittendorfer B. Effect of obesity on the plasma lipoprotein subclass profile in normoglycemic and normolipidemic men and women. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Nov;32(11):1655–64.
451. Pascot A, Lemieux I, Prud'homme D, Tremblay A, Nadeau A, Couillard C, et al. Reduced HDL particle size as an additional feature of the atherogenic dyslipidemia of abdominal obesity. *J Lipid Res*. 2001 Dec;42(12):2007–14.
452. Phillips CM, Perry IJ. Lipoprotein particle subclass profiles among metabolically healthy and unhealthy obese and non-obese adults: Does size matter? *Atherosclerosis*. 2015 Oct;242(2):399–406.
453. Brämswig S, Kerksiek A, Sudhop T, Luers C, Von Bergmann K, Berthold HK. Carbamazepine increases atherogenic lipoproteins: mechanism of action in male adults. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Feb;282(2):H704–16.
454. Ribalta J, La Ville AE, Vallvé JC, Humphries S, Turner PR, Masana L. A variation in the apolipoprotein C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 1997 Jun;38(6):1061–9.
455. Magkos F, Wright DC, Patterson BW, Mohammed BS, Mittendorfer B. Lipid metabolism response to a single, prolonged bout of endurance exercise in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006 Feb;290(2):E355–62.



- BIBLIOGRAFIA -

456. Hulley SB, Rosenman RH, Bawol RD, Brand RJ. Epidemiology as a guide to clinical decisions. The association between triglyceride and coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1980;302:1383–9.
457. Nestel PJ, Fidge NH, Tan MH. Increased lipoprotein-remnant formation in chronic renal failure. *N Engl J Med.* 1982 Aug 5;307(6):329–33.
458. JONES HB, GOFMAN JW, LINDGREN FT, LYON TP, GRAHAM DM, STRISOWER B, et al. Lipoproteins in atherosclerosis. *Am J Med.* 1951 Sep;11(3):358–80.
459. Oörni K, Posio P, Ala-Korpela M, Jauhiainen M, Kovanen PT. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion of small very low-density lipoprotein and intermediate-density lipoprotein particles and increases their retention to human arterial proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Aug;25(8):1678–83.
460. Orlicchio A, Bruce IN, Rahman P, Kawarai T, Bernardi G, St George-Hyslop PH, et al. The apolipoprotein E2 isoform is associated with accelerated onset of coronary artery disease in systemic lupus erythematosus. *Med Sci Monit.* 2008 May;14(5):CR233–7.
461. Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. IDL, VLDL, chylomicrons and atherosclerosis. *Eur J Epidemiol.* 1992 May;8 Suppl 1:92–8.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

# ANNEXOS



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



## ANNEX I PNT ultracentrifugació seqüencial

### 1. Fonament i objectiu

Donat que les lipoproteïnes tenen una densitat més baixa que la resta de proteïnes plasmàtiques i que es distribueixen en famílies segons diferent densitat, variant la densitat del sèrum floten en l'extrem superior del tub quan d'ultracentrífuga. La ultracentrifugació ha sigut un dels principals mètodes utilitzats per la separació i classificació de les diferents lipoproteïnes: Quilomicrons, **Very Low Density Lipoprotein (VLDL)**, **Intermediate Density Lipoprotein (IDL)**, **Low Density Lipoprotein (LDL)** i **High Density Lipoprotein (HDL)**.

### 2. Espècimen

Sèrum o plasma humà. Es recomana plasma EDTA per evitar contaminacions amb ions pesats que puguin catalitzar la peroxidació lipídica a través de l'oxigen. També poden separar-se lipoproteïnes de qualsevol solució que les contingui, com per exemple del medi de cèl·lules secretores de lipoproteïnes.

### 3. Documentació relacionada

### 4. Definicions

### 5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data

### 6. Solucions, reactius i materials

- NaCl Ref. 0278 J.T. Baker (Medilab)
- NaBr Ref. 121646 Panreac
- EDTA Ref. 03679 Fluka

- ANNEXOS -

- Azida Sòdica Ref. 71290 Fluka
- Sulfat de Gentamicina Ref. G-1914 Sigma
- Cloramfenicol Ref. C-0378
- Solucions de densitat (per la seva preparació veure Annex)

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Tubs polial·lòmer	6.5 ml		Beckman Instruments Ref.344088
Taps per tancar els tubs			Kontron
Tubs	5 ml		
Pipetes <i>pasteur</i> de vidre			Ref.401006 Afora
Matràs aforat	2ml		

**7. Instrumentació i equips:**

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Ultracentrífuga KONTRON	Laboratori 2	012580	61	
Balança tubs ultra	Laboratori 2	012426	01	
Rotor 45.6 Kontron				
Vòrtex	Laboratori 1 o 2	012483	32	
Agitador magnètic	Laboratori 2	003528	18	



---

HB502

---

## 8. Precaucions

El temps de centrifugació és llarg i costós, amb el que pot donar-se canvi i pèrdues d'apolipoproteïnes (apos), especialment AI, C i E.

Pot produir-se agregació de les partícules riques en triglicèrids.

Pot donar-se peroxidació lipídica, que pot minimitzar-se amb agents quelants i antioxidant.

L'investigador ha de saber que aquest mètode separa les lipoproteïnes d'acord només a la seva densitat i que les lipoproteïnes es diferencien per la seva etapa en el metabolisme, composició, carrega i mida; i que tot això pot combinar-se amb qualsevol de les fraccions obtingudes per aquest mètode.

Cal tindre en compte que totes les fraccions tenen un alt contingut en sals, principalment les HDLs en BrNa. Aquesta sal pot interferir en reaccions enzimàtiques, mobilitat, ... etc Per evitar-ho cal dialitzar la mostra.

## 9. Procediment

### 9.1. Obtenció de quilomicrons (densitat < 0.940 g/mL)

- Posar 2 mL de plasma en un tub de 6.5 mL de polial·lòmer.
- Afegir en capa 3 ml de solució de densitat **1.006 g/ml**.
- Tapar el tub i col·locar-lo en el rotor 45.6 de Kontron.
- Centrifugar a 16.000 rpm, 30 minuts a 10°C.
- Treure amb la pipeta *pasteur* de vidre, 2 mL de l'infranadant.
- Posar aquests 2 mL en un tub de plàstic de 5 ml, deixar-lo a 4°C per posteriors anàlisis. Identificar el tub: **Quilomicrons** i N° de mostra.
- Barrejar amb la pipeta els 3 mL restants que han quedat al tub de polial·lòmer.

### 9.2. Obtenció de VLDL (densitat entre 0.940 i 1.006 g/mL)

- Afegir en capa 2 mL de solució de densitat **1.006 g/mL** sobre els 3 mL que hem barrejat en el tub de polial·lòmer.
- Tapar el tub i posar-lo al rotor 45.6 de Kontron.
- Centrifugar a 37.000 rpm, 16 hores a 10°C.
- Treure amb la pipeta *pasteur* de vidre 2 mL de l'infranadant.
- Posar aquests 2 mL en un tub de plàstic de 5 mL, deixar-lo a 4°C per posteriors anàlisis. Identificar el tub: **VLDL** i N° de mostra.
- Barrejar amb la pipeta els 3 mL restants que han quedat al tub de polial·lòmer.

### 9.3. Obtenció de IDL (densitat entre 1.006 i 1.019 g/mL)

- Afegir 1 mL de solució de densitat **1.006 g/mL** i 1 mL de **1.071 g/mL** sobre els 3 mL que hi ha al tub de polial·lòmer. Barrejar.
- Tapar el tub i posar-lo al rotor 45.6 de Kontron.
- Centrifugar a 37.000 rpm, 20 hores a 10°C.
- Treure amb la pipeta *pasteur* de vidre 2 mL de l'infranadant.
- Posar aquests 2 mL en el tub de plàstic de 5 mL, deixar-lo a 4°C per posteriors anàlisis. Identificar el tub: **IDL** i N° de mostra.
- Barrejar amb la pipeta els 3 mL que han quedat al tub de polial·lòmer

### 9.4. Obtenció de LDL (densitat entre 1.019 i 1.063 g/mL)

- Afegir 1 mL de solució de densitat **1.063 g/mL** i 1 mL de **1.239 g/ml** sobre els 3 mL del tub de polial·lòmer. Barrejar.
- Tapar el tub i col·locar-lo al rotor 45.6 de Kontron.
- Centrifugar a 37.000 rpm, 20 hores a 10°C.
- Treure amb la pipeta *pasteur* de vidre 2 mL de l'infranadant.
- Posar aquests 2 mL en el tub de plàstic de 5 mL, deixar-lo a 4°C per posteriors anàlisis. Identificar el tub: **LDL** i N° de mostra.
- Barrejar amb la pipeta els 3 mL que han quedat al tub de polial·lòmer



### 9.5. Obtenció de HDL (densitat entre 1.063 i 1.210 g/mL)

- Pesar 1.1 g de BrNa.
- Afegir-lo sobre els 3 mL que queden al tub de polial·lòmer.
- Enrasar a 5 mL amb solució de densitat **1.063 g/ml**.
- Barrejar bé fins que es dissolgui la sal.
- Tapar el tub i col·locar-lo al rotor 45.6 de Kontron.
- Centrifugar a 37.000 rpm., 40 hores a 10°C.
- Treure amb la pipeta *pasteur* de vidre 2 mL de l'infranadant.
- Posar aquests 2 mL en el tub de plàstic de 5 mL, deixar-ho a 4°C per posteriors anàlisis. Identificar el tub: **HDL** i N° de mostra.

### 10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

No hi ha control de qualitat.

### 11. Guia de problemes

Problema	Possible causa

### 12. Referències

- 1) Havel, R. J., Eder, H. A., & Bragdon, J. H. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *The Journal of Clinical Investigation*, 34(9), 1345–53.

### 13. Control de la documentació

### 14. Annexos

**Preparació de les solucions de densitat**

<p><b>Densitat 1.006 g/mL</b>                      23.2 g NaCl                      0.82 g EDTA                      1 g de Acida Sòdica                      40 mg sulfat de gentamicina                      100 mg cloramfenicol                      Dissoldre en 2 L d'aigua  <b>Ajustar a pH 7.4</b></p>	<p><b>Densitat 1.019 g/mL</b>                      4 volums de solució de densitat 1.006 g/mL                      1 volum de solució de densitat 1.071 g/mL</p>	<p><b>Densitat 1.040 g/mL</b>                      48 g NaBr + 1 L de H<sub>2</sub>O                      1 volum de solució de densitat 1.071 g/mL</p>
<p><b>Densitat 1.063 g/mL</b>                      4 volums de solució de densitat 1.019 g/mL                      1 volum de solució de densitat 1.239 g/mL                      ó                      4 volums de solució de densitat 1.006 g/mL                      1 volum de solució de densitat 1.291 g/mL</p>	<p><b>Densitat 1.071 g/mL</b>                      4 volums de solució de densitat 1.239 g/mL                      13 volums de solució de densitat 1.019 g/mL                      ó                      12 volums de solució de densitat 1.239 g/mL                      31 volums de solució de densitat 1.006 g/mL</p>	<p><b>Densitat 1.210 g/mL</b>                      1.1 g NaBr + 5 mL de densitat 1.063 g/mL</p>
<p><b>Densitat 1.239 g/mL</b>                      328 g de NaBr                      1 l de la solució de densitat 1.006 g/mL</p>	<p><b>Densitat 1.291 g/mL</b>                      410 g NaBr + 1 L de densitat 1.006 g/mL                      (4 mL de plasma + 1 mL de densitat 1.291 g/mL = 1.063 g/mL)</p>	<p><b>Densitat 1.353 g/mL</b>                      135 g NaBr + 250 mL de densitat 1.006 g/mL                      (4mL de densitat 1.063 g/mL + 1 mL de densitat 1.353 g/mL = 1.121 g/mL)</p>



## ANNEX II PNT ultracentrifugació amb gradient iodixanol

### 1. Fonament i objectiu

Donat que les lipoproteïnes tenen una densitat més baixa que la resta de proteïnes plasmàtiques i que es distribueixen entre elles segons diferent densitat, variant la densitat del sèrum s'ubiquen segons aquesta quan d'ultracentrífuga. L'iodixanol és un medi no iònic i iso-osmòtic que forma auto-gradient durant la centrifugació. A diferència de la ultracentrifugació seqüencial per gradient salí, el gradient d'iodixanol permet una major estratificació de les lipoproteïnes, obtenint fins a 21 fraccions diferents en un sol pool de centrifugació, augmentant així la rapidesa de la tècnica. A més, l'iodixanol no altera l'estructura de les proteïnes com ho poden fer altes concentracions de medi salí.

El posterior anàlisi de les subfraccions obtingudes ens permetrà obtenir el seu contingut en colesterol, triglicèrids, apoA1 i apoB100; determinant les diferents subclasses de lipoproteïnes: Quilomicrons, **Very Low Density Lipoprotein (VLDL)**, **Intermediate Density Lipoprotein (IDL)**, **Low Density Lipoprotein (LDL)** i **High Density Lipoprotein (HDL)**.

### 2. Espècimen

Plasma humà.

### 3. Documentació relacionada

### 4. Definicions

### 5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data

### 6. Solucions, reactius i materials



- ANNEXOS -

- Sulfat de Gentamicina Ref. G-1914 Sigma
- NaCl Ref. 0278 J.T. Baker (Medilab)
- Azida Sòdica Ref. 71290 Fluka
- Hepes Ref. H-4034 Sigma
- Aigua destil·lada
- HCl Ref. 84422 Fluka
- NaOH Ref. 71690 Fluka
- Optiprep (iodixanol) Ref. D-1556 Sigma
- Fluorinert Ref. F-9755 Sigma

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Tubs Optiseal	11.2 ml		
Tubs	15 ml		
Tubs Eppendorf	1 ml		
Pipeta <i>pasteur</i> de vidre			Ref. 401006 Afora
Parafilm			
Xeringa	20 ml		
Micropipeta	20-200 µl		
Micropipeta	100-1000 µl		

**7. Instrumentació i equips:**

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT-EE	Observacions
Ultracentrífuga KONTRON	Laboratori 2	012580	61	
Balança tubs ultra	Laboratori 2	012426	01	



Beckman Coulter Fraction Recovery Systems	Laboratori 1	213023120 01 (CIBER)	124	
				Opcional. Només en cas de voler determinar colesterol, triglicèrids, apoA1 i apoB100.
COBAS mira autoanalyzer	Laboratori 2	090862	87	
				Opcional. Només en cas de voler determinar RLPc.
Photal <sup>®</sup> mixer, Model J-100A	Laboratori 2		112	

## 8. Precaucions

1. Si els reactius entren en contacte amb ulls o boca, rentar immediatament amb aigua abundant. En cas d'irritació consultar a metge.
2. El *sodium azide* pot reaccionar amb plom i coure formant metalls àcids potencialment explosius. Si aquests reactius es llencen per la pica cal netejar amb grans quantitats d'aigua.
3. Al treballar amb plasma cal prendre les mesures pertinents.
4. No utilitzar reactius que han estat congelats
5. No utilitzar reactius caducats
6. Netejar abans i després els equips i instrumentació per evitar resultats erronis.

## 9. Procediment

## - ANNEXOS -

### 9.1. Mostres

1. És necessari un volum de mostra de 5 ml de plasma com a mínim. Per tant, calen 3 tubs de 12 ml EDTA per mostra de sang total (en dejú). Si cal es poden fer pools.
2. Per obtenir el plasma cal centrifugar la mostra a 3.000 rpm durant 15 min (4°C). Obtenim aproximadament 2 ml de mostra per tub. La mostra pot ser llavors congelada per posteriors anàlisis o bé sotmesa a la tècnica.
3. Si es desitja es poden retirar els quilomicrons:
  - a. Centrifugar el plasma a 14.000 G durant 30 min (4°C). Cal equilibrar els tubs amb la balança abans de centrifugar.
  - b. Retirar els quilomicrons amb una pipeta de vidre (sobrenedant blanquinós) fent bombolletes.
  - c. Retirar el plasma lliure de quilomicro (volum total necessari 4.5 ml) en un tub de 15 ml.
4. Seguidament afegir 25 µl 5% Sodium azide i 25 µl 5% Gentamicina a la mostra, i preparar les solucions de densitat (veure annex per la preparació de les solucions).

### 9.2. Separació de les lipoproteïnes en els gradients d'iodixanol

- a) La preparació del gradient es pot fer de dues maneres: *undelayer* i *overlayer*, diferenciades bàsicament en l'ordre, ascendent o descendent, del gradient. En ambdós casos cal un tub de 11.2 ml Optiseal i una pipeta de 1000 µl.
  - a. *Underlayer*. Introduir les diferents solucions en el tub Optiseal en aquests ordre: 3 ml de solució 9%, 3 ml de solució 12%, 3 ml de solució 20% (on hi ha inclosa la mostra) i acabar d'omplir amb Hepes 0.1 M (amb 1 ml n'hi ha prou)
  - b. *Overlayer*. Introduir les diferents solucions en el tub Optiseal en aquests ordre: 3 ml de solució 20% (on hi ha inclosa la mostra), 3 ml de solució 12%, 3 ml de solució 9% i acabar d'omplir amb Hepes 0.1 M (amb 1 ml n'hi ha prou)
- b) Centrifugar a 65.000 rpm durant 4 h (4°C). Si la centrifuga no té capacitat per arribar a aquesta velocitat es pot fer a 37.000 rpm durant 24 h.



### 9.3. Recol·lecció dels gradients

- a) Un cop s'ha centrifugat cal fer la recol·lecció de les fraccions a la càmera freda (4°C):
  - a. Material necessari: *Beckman Coulter Fraction Recovery Systems*, una xeringa de 20 ml, líquid de desplaçament (Fluorinert) i tubs 1 ml (amb una marca que indiqui el volum de 500 µl).
  - b. Col·loquem el tub de la centrifuga al *Beckman Coulter Fraction Recovery Systems*, de manera que queda fixat a l'equip.
  - c. Mitjançant una palanca es forada el tub per la part inferior per on s'extreuen les fraccions. Cal segellar bé les unions entre la xeringa, el tub de plàstic i el *Beckman Coulter Fraction Recovery Systems* (utilitzem parafilm).
  - d. Per la part superior s'injecta el líquid de desplaçament fluorinert, i per la part inferior es recull 500 µl per fracció en tubs ml. Cal anar amb compte amb la formació de bombolletes d'aire a l'injectar fluorinert, doncs poden barrejar els gradients dins del tub.
- b) A l'acabar cal netejar aparell amb 9% sèrum (clorur sòdic), tant entre diferents mostres com un cop finalitzada la utilització de l'aparell.
- c) Analitzar les fraccions obtingudes o bé guardar-les a -80°C

### 9.4. Anàlisi de les fraccions mitjançant COBAS mira autoanalyzer

1. Col·locar els Cubilete porta-sèrum GmbH als suports per les mostres corresponents.
2. La primera mostra de cada suport per les mostres correspon a una mostra control del COBAS (posicions 1, 31, 61, 91).
3. S'encén el COBAS. Comprovar l'aigua del dipòsit i xeringues de mostra i reactiu (per si estiguessin obstruïdes).
4. Introduïm els suports per les mostres.
5. Col·loquem el suports pels reactius dels paràmetres d'interès: colesterol, triglicèrids, apoB i apoA.
6. Col·loquem cada reactiu dins del seu pot corresponent (també marcat) i aquests al suports pels reactius.
7. Polsar RUTINE, introduir el número de les mostres (posició en el suports de les mostres), introduir test d'interès (colesterol,

## - ANNEXOS -

triglicèrids, apoB i apoA), ENTER i START.

8. Anar comprovant l'aigua, els reactius, les cubetes, i el recipient de reactius i aigua sobrant.

Per més informació mirar PNT de la tècnica Cobas - ISO: 7.3 Disseny i desenvolupament de projectes de recerca: PNTs metodològics: adaptacions/PNT-M versió PDF.

### 9.5. Anàlisi de les fraccions mitjançant RLP- cholesterol assay

Les fraccions obtingudes també poden sotmetre's a l'anàlisi immunocromatogràfic per determinar el colesterol romanent contingut en les fraccions.

Veure PNT-URLA-44 RLP-cholesterol assay- ISO: 7.3 Disseny i desenvolupament de projectes de recerca: PNTs metodològics: adaptacions/PNT-M versió word.

## 10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

## 11. Guia de problemes

Problema	Possible causa

## 12. Referències

- 1) Yee, M. S., Pavitt, D. V, Tan, T., Venkatesan, S., Godsland, I. F., Richmond, W., & Johnston, D. G. (2008). Lipoprotein separation in a novel iodixanol density gradient, for composition, density, and phenotype analysis. *Journal of Lipid Research*, 49, 1364–1371.

## 13. Control de la documentació

## 14. Annexos



### Preparació concentracions solucions i reactius:

- a) Preparació 5 ml de 5% Azida Sòdica: 0.25 gr azida sòdica + 5 ml aigua destil·lada.
- b) Preparació de Hepes 0.1 M (amb erlenmeyer 100 ml ho barregem i amb el matràs aforat 100 ho enrasem):
  - a. 0.85 gr NaCl + 90 ml aigua destil·lada + 10 ml 1 M Hepes (ajustar-lo a pH 7.4, o afegint HCl o NaOH)
  - b. 0.85 gr NaCl + 80 ml aigua destil·lada + 20 ml 1 M Hepes (ajustar-lo a pH 7.4, o afegint HCl o NaOH)
- c) Preparació Hepes 1 M:  
 $30 \text{ ml Hepes } 1 = 1 \text{ mol} / 1 \text{ l} \times 1 \text{ l} / 1000 \text{ ml} \times 238.3 \text{ gr} / 1 \text{ mol} = 7.15 \text{ gr Hepes } 1 \text{ en } 30 \text{ ml aigua destil·lada i NaOH (cal ajustar pH 7.4)}$
- d) Dilucions de densitat d'iodixanol:
  - a. 20%: 2.25 ml Optiprep + 4.5 ml plasma
  - b. 12%: 12 ml Optiprep + 48 ml Hepes 0.1 M
  - c. 9%: 9 ml Optiprep + 51 ml Hepes 0.1 M

## ANNEX III PNT RLP-cholesterol assay

### 1. Fonament i objectiu

El *RLP-Cholesterol Immunoseparation Assay* (RLP-Cholesterol Assay) determina el colesterol contingut en les lipoproteïnes romanents (RLP) en plasma o sèrum humà, mitjançant la tècnica de cromatografia d'immunoafinitat<sup>1</sup>

El *RLP-Cholesterol Assay* utilitza dos anticossos monoclonals (Figura 1):

- 1) El primer (JI-H) reconeix l'apoB100 humana. Reconeix un epítop proper a la regió apoB51 pertanyent a la molècula d'apoB100 captant d'aquesta manera a LDL, Lp(a) i VLDL naixents.
- 2) El segon (H-12) reconeix les apoA1, captant, així, HDL.

Els anticossos són conjugats amb sepharose-4B que permet la separació de les lipoproteïnes captades pels anticossos de les RLP que resten a la fracció no unida. És el colesterol d'aquesta fracció no unida el que serà quantificat per assaig enzimàtic (autoanalitzador).

La fracció no unida conté essencialment romanents de quilomicrons i VLDL, els quals es troben enriquits amb *cholesteryl ester* i apoE. RLP aïllades per aquesta metodologia tenen mobilitat  $\beta$  o lenta pre- $\beta$  en AGE, mentre que les VLDL reconegudes per l'anticòs monoclonal JI-H té una mobilitat pre- $\beta$ .

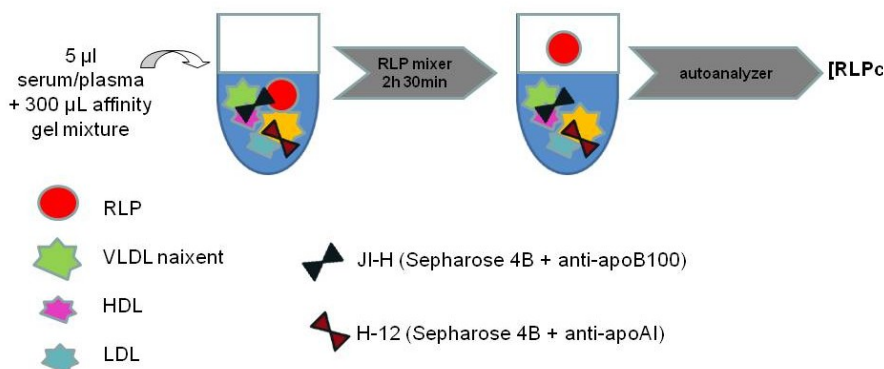


Figura 1.



## 2. Espècimen

Sèrum o plasma humà.

## 3. Documentació relacionada

**Document adjunt:** protocol del kit.

## 4. Definicions

## 5. Historial de revisions

Modificacions efectuades	No de Revisió	Data

## 6. Solucions, reactius i materials

Com es tracta d'un kit comercial, els reactius que són necessaris venen inclosos en el propi kit. Només cal seguir les indicacions del protocol proporcionat per la casa comercial.

Tots els reactius proporcionats estan preparats per fer-los servir, a excepció del *RLP Immunoseparation gel* que cal rentar prèviament.

1. *RLP Immunoseparation gel* (30 ml)
2. *Cholesterol reagent R1* (35 ml)
3. *Cholesterol reagent R2* (15 ml)
4. *Cholesterol standard solution* (50 mg/dl, 2 ml)
5. *RLP buffer* (0.05 M, 150 ml)

Nota #1: El volum indicat permet l'anàlisi de 100 mostres (per kit).

Nota #2. Conservació a 2-8 °C

Nota #3. Un cop oberts els reactius aquests són estables durant 1 mes.

Material	Capacitat	Tractament Previ	Observacions
Micro-sample	0.5 ml		



- ANNEXOS -

cups	
Boletes metàl·liques d'acer	Ø 3.2 mm
Tub de plàstic 30 ml	
Cubilet porta- sèrum GmbH	0.5 ml

**7. Instrumentació i equips:**

Equip	Ubicació	Núm. Inventari	Núm. PNT- EE	Observacions
Centrífuga multifuge 3X FR heraeus	Laboratori 2	205669	120	
Balança tubs ultra	Laboratori 2	012426	01	
Dispensador de boletes metàl·liques d'acer	Laboratori 2			Dins una capseta de cartró al costat del mixer.
Micropipeta multidispens adora 5000 µl				
Micropipeta 0.5-5 µl				
Micropipeta 20-200 µl				



---

Micropipeta			
100-1000 µl			
<hr/>			
Photal <sup>®</sup>			
mixer, Model	Laboratori 2		112
J-100A			
<hr/>			
COBAS mira	Laboratori 2	090862	87
autoanalyzer			
<hr/>			

## 8. Precaucions

1. Si els reactius entren en contacte amb ulls o boca, rentar immediatament amb aigua abundant. En cas d'irritació consultar a metge.
2. EL *RLP Immunoseparation gel*, el *reagent R1*, el *reagent R2* i el *RLP buffer* contenen *sodium azide* com a conservant. El *sodium azide* pot reaccionar amb plom i coure formant metalls àcids potencialment explosius. Si aquests reactius es llencen per la pica cal netejar amb grans quantitats d'aigua.
3. Al treballar amb sèrum i plasma cal prendre les mesures pertinents.
4. No utilitzar reactius que han estat congelats
5. No utilitzar reactius caducats
6. No barrejar reactius de diferents lots.
7. Netejar abans i després els equips i instrumentació per evitar resultats erronis.

## 9. Procediment

Nota #1. Aquest kit comercial inclou un protocol proporcionat per la casa comercial; s'indica seguir les instruccions de procediment proporcionades per la casa comercial.

### 9.1. Mostres

1. Extracció de les mostres del congelador.
2. Recordar que cada assaig requereix de control intern (pool de sèrum amb concentració coneguda de RLPc).

## 9.2. Preparació del *RLP Immunoseparation gel*

Nota #1. El *RLP Immunoseparation gel* cal que sigui rentat amb el *RLP Buffer* abans de ser utilitzat. El gel ha de ser utilitzat el mateix dia que ha sigut rentat. Cada mostra necessita 300 µl d'aquest gel.

1. Posar en marxa la *centrífuga multifuge 3X FR heraeus* perquè assoleixi els 4°C requerits.
2. Barrejar manualment el *RLP Immunoseparation gel* invertint repetidament el tub on es troba, fins que aquest quedi completament resuspès.
3. Transferir tot el gel en un tub de 30 ml.
4. Posar el tub a la centrífuga (800 rpm, 5 min, 4°C). Cal posar un tub per equilibrar de igual pes (utilitzar balança tubs ultra).
5. Descartar el sobrenedant. Millor fer-ho a la càmera extractora on hi ha un recipient on dipositar el sobrenedant que es descarta.
6. Reomplir fins a 30 ml amb *RLP buffer* i repetir els passos 2-6 tres cops més (en total cal fer 4 rentats). L'últim cop que es reomple el tub fins a 30 ml posar-ne 1 ml més sobre el total (així s'assegura una reserva per si s'ha de descartar algun Micro-sample cup).

## 9.3. Preparació del Photal<sup>®</sup> mixer

1. Mentre es fa el rentat del gel, disposar els Micro-sample cups al mixer.
2. Posar amb el dispensador les boletes d'acer, una per Micro-sample cup.
3. Pipetejar 300 µl de *RLP Immunoseparation gel* per Micro-sample cup. Cada deu Micro-sample cups barrejar el *RLP Immunoseparation gel*, sinó precipita el gel al fons del tub de 30 ml.
4. Comprovar que tots els Micro-sample cups tenen aproximadament la mateixa quantitat de gel (esperar 10 min perquè es dipositi el gel al fons de tots els Micro-sample cups)
5. Pipetejar 5 µl de mostra per cada Micro-sample cup (prestar especial atenció doncs es tracta d'un volum molt petit).
6. Posar en funcionament el mixer (encendre, botó ON part posterior del mixer fa que s'encengui un botó taronja a la part anterior). Automàticament el mixer funcionarà durant 2 hores i deixarà en repòs 30 minuts més els Micro-sample cups per permetre la separació entre gel i sobrenedant.
7. Transferir 200 µl del sobrenedant de cada Micro-sample cup a un Cubilet porta-sèrum GmbH.



#### 9.4. COBAS mira autoanalyzer

1. Col·locar els Cubilet porta-sèrum GmbH als suports per les mostres (*racks*) corresponents (del *rack* 1 al *rack* 4, per 100 mostres mixer necessitarem 104 posicions COBAS).
2. La primera mostra de cada *rack* correspon a una mostra control (posicions 1, 31, 61, 9).
3. S'encén el COBAS. Comprovar l'aigua del dipòsit i xeringues de mostra i reactiu (per si estiguessin obstruïdes).
4. Introduïm els *racks*.
5. Col·loquem el *rack* dels reactius (cal buscar el *rack* de reactius on marcat hi ha les posicions de RLP buffer, RLP R1 i RLP R2)
6. Col·loquem cada reactiu dins del seu pot corresponent (també marcat) i aquests al *rack*.
7. Pulsar RUTINE, introduir el número de les mostres (posició en el *rack*), introduir test RLP colesterol, ENTER i START.
8. Anar comprovant l'aigua, els reactius, les cubetes, i el recipient de reactius i aigua sobrant. Per més informació mirar PNT- Cobas mira plus (Roche)

### 10. Verificació de la tècnica i interpretació de resultats

#### 10.1. Controls:

- a) Control intern RLP mixer: En cada assaig es posen dues mostres control intern que fan tot el procés de determinació del RLPc. Existeix un pool de sèrum de concentració de RLP coneguda que es posa al mixer com a control intern en cada assaig. Valors: [RLPc] intra-assaig: 5.85 mg/dl (7.23-4.47); [RLPc] inter-assaig: 5.65 mg/dl (8.71 – 1.71).
- b) Control extern COBAS mira plus autoanalyzer: En un eppendorf 1.5 ml es posa 1200 µl de *RLP buffer* i 30 µl de *Cholesterol standard solution*, per tal d'aconseguir la concentració de colesterol 50 mg/dl. En posem 300 µl en cada primer cubilet de cada *rack* (com que per fer 100 mostres necessitem 4 *racks* calen 4 mostres control intern: 300 µl x 4 = 1200 µl).

10.2. Programa del COBAS mira plus autoanalyzer:

Es llegeix a 550 nm, i la determinació es fa construint una corba a 6 punts (0.0625 a 2 mg/dl).

Per més informació mirar PNT de la tècnica d'adaptació al Cobas (ISO: 7.3 Disseny i desenvolupament de projectes de recerca: PNTs metodològics: adaptacions/PNT-M versió PDF).

## 11. Guia de problemes

Problema	Possible causa
----------	----------------

## 12. Referències

- 1) Nakajima K, Saito T, Tamura A, Suzuki M, Nakano T, Adachi M, Tanaka A, Tada N, Nakamura H, Campos E, et al. Cholesterol in **remnant-like lipoproteins** in human serum using **monoclonal** anti apo B-100 and anti apo A-I immunoaffinity mixed gels. Clin Chim Acta. 1993 Dec 31;223(1-2):53-71.

## 13. Control de la documentació

## 14. Annexos



## ANNEX IV Criteris de classificació de SLICC 2012.

Requeriments: s'han de complir  $\geq 4$  criteris incloent com a mínim un criteri clínic i un d'immunològic o una biòpsia que provi lupus nefritis en la presència d'ANAs o anti-dsDNA.

### Criteris immunològics

- I. Anticossos antinuclears (ANA): concentració elevadament anormal per immunofluorescència o un anàlisi semblant en qualsevol moment en absència de fàrmacs que n'indueixin formació.
- II. Autoanticossos anti-dsDNA: concentració per damunt dels nivells de referència de laboratori o el doble del rang de referència si és determinat per ELISA.
- III. Presència d'autoanticossos anti-Sm.
- IV. Presència d'autoanticossos anti-fosfolípids determinada per:
  - i. test positiu per lupus anticoagulant,
  - ii. test fals positiu per reagina plasmàtica ràpida,
  - iii. títols mitjans o alts de nivells d'anticossos (IgA, IgG o IgM)
  - iv. test positiu per anti-2-glicoproteïna (IgA, IgG o IgM)
- V. Nivells baixos de complement C3, C4 o CH50.
- VI. Test de Coombs directe (en absència d'anèmia hemolítica).

### Criteris clínics

- I. Lupus agut O subagut cutani:
  - i. Lupus agut cutani: eritema malar (no compta si és discoide), lupus bullós (ampolles), necròlisis epidèrmica tòxica variant de SLE, erupció maculo - papular, erupció per fotosensibilitat (en absència de dermatomiositis).
  - ii. Lupus subagut cutani: lesions cutànies psoriaformes no endurides i/o anulars policíclics que resolen sense cicatrius, encara que ocasionalment amb despigmentació o telangièctasis post-inflamatòries.
- II. Lupus cutani crònic: eritema discoide localitzat damunt del coll o generalitzat (damunt i sota del coll), lupus hipertròfic, panniculitis luposa, lupus mucós, lupus Eritematós tumidus, lupus penellós, lupus discoide sobreposat amb liquen pla.

- ANNEXOS -

- 
- III. Úlceres orals O nasals en absència d'altres causes com la vasculitis, la malaltia de Behçet, infeccions, malalties intestinals inflamatòries, artritis reactiva i menjars àcids.
- IV. Alopècia no cicatritzant: Difusa fragilitat i aprimament del cabell amb pèls trencats visibles i en absència d'altres causes com alopècia areata, fàrmacs, deficiència de ferro i alopècia androgènica.
- V. Sinovitis en dues o més articulacions O sensibilitat en dues o més articulacions i com a mínim 30 minuts de rigidesa matinal.
- VI. Serositis:
- i. pleuritis durant més d'un dia O vessament pleural O fregament pleural
  - ii. dolor pericardíac per més d'un dia O vessament pericardíac O fregament pericardíac
  - iii. pericarditis determinada mitjançant ecografia en absència d'altres causes com infecció, urèmia i pericarditis de Dressler.
- VII. Alteracions renals: ràtio proteïna urinària - creatinina (o 24 h de proteïna urinària) que representi 500 mg de proteïna en 24 hores O restes d'eritròcits en orina.
- VIII. Alteracions neurològiques: convulsions, psicosis, mononeuritis múltiple (en absència d'altres causes conegudes com la vasculitis primària), mielitis, neuropatia perifèrica o cranial (en absència d'altres causes conegudes com la vasculitis primària, infecció i la DM), estats de confusió aguts (en absència d'altres causes com les toxico-metabòliques, la urèmia i fàrmacs)
- IX. Anèmia hematolítica.
- X. Leucopènia (<4000/ µl) com a mínim una vegada en absència d'altres causes conegudes com el síndrome de Felty, fàrmacs i la hipertensió portal; O limfopènia (<1000/ µl) com a mínim una vegada en absència d'altres causes conegudes com els corticosteroides, fàrmacs i les infeccions.
- XI. Trombocitopènia (<100.000/ µl) com a mínim una vegada en absència d'altres causes conegudes com fàrmacs, la hipertensió portal i la trombocitopènia.
-

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
ESTUDI DELS CANVIS EN LA DISTRIBUCIÓ DE LES SUBCLASSES DE LIPOPROTEÏNES I PARTÍCULES  
ROMANENTS EN DIFERENTS CONDICIONS ASSOCIADES A RISC ARTERIOSCLERÒTIC: MÉS ENLLÀ DEL COLESTEROL  
Marta González Muñoz