



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

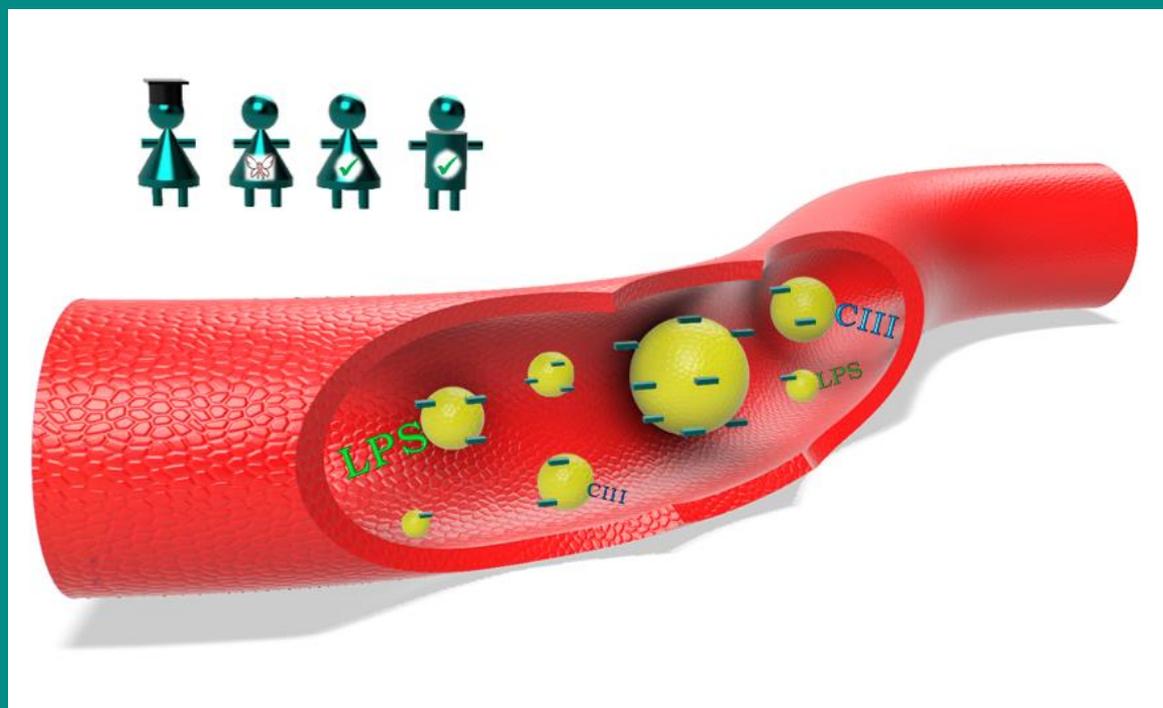
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la 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.

ESTUDIO DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN DEL RIESGO RESIDUAL

MARINA RODRÍGUEZ GARCÍA



TESIS DOCTORAL

2018

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Marina Rodríguez García

**ESTUDIO DE PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS DE LAS
LIPOPROTEÍNAS PARA UNA
MEJOR PREDICCIÓN DEL
RIESGO RESIDUAL**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por:

Dr. Josep Ribalta Vives

Dra. Montse Guardiola Guionnet

Departamento de Medicina y Cirugía

Unidad de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

2018

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García



HAGO CONSTAR que el presente trabajo, titulado “Estudio de propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas para una mejor predicción del riesgo residual”, que presenta Marina Rodríguez García para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Medicina y Cirugía de esta universidad.

Reus, 8 de junio de 2018

Los directores de la tesis doctoral



Josep Ribalta Vives



Montse Guardiola Guionnet

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Ya empiezo a ver la luz al final del túnel, ¿y ahora qué?

Un túnel que representa el camino por el cual han transcurrido mis últimos años, y primeros en la carrera como investigadora. En dicho camino, me han acompañado muchas personas, a las cuales debo y siento la necesidad de agradecer la contribución que han tenido para hacerme ser la persona que soy hoy día.

Primero, me siento en la obligación de dar las gracias a mis directores de tesis, Josep y Montse, por darme su voto de confianza el día que les pregunté si podía realizar el trabajo final de máster con ellos; ya que sin conocerme de nada y después de la cara que puse cuando me propusieron que mi tema de trabajo sería medir la carga eléctrica de las lipoproteínas como si de una batería se tratara, me aceptaron con los brazos abiertos en su grupo de investigación. Ya me conocían un poco más cuando al finalizar el máster les comenté que me gustaría continuar y hacer el doctorado, y renovando ese voto de confianza que habían depositado en mí, me dieron la oportunidad de seguir formando parte del equipo.

En esta primera etapa, no me puedo olvidar de Iris, ella me inició en el mundo de las medidas de carga eléctrica con esas largas jornadas en el Instituto de Ciencia de los Materiales de Barcelona (ICMAB). Afortunadamente, estos viajes se redujeron en tiempo, ya que el grupo Food Innovation & Engineering (FoodIE) del departamento de Ingeniería Química de la URV disponía del querido e indispensable Zetasizer Nano-ZS. Agradecida les estoy que me dejaran utilizarlo; sin su colaboración se hubiera dificultado enormemente la realización de parte de los experimentos y medidas necesarias para esta tesis.

Acto seguido, quisiera agradecer a todas las personas que han colaborado directa- o indirectamente a que la realización de todos los experimentos se pudiera llevar a cabo. En concreto, al director de la unidad, Lluís Masana, a todo el equipo médico de la URLA, UVASMET y demás unidades que han colaborado

en el reclutamiento de pacientes y voluntarios, recogida y procesamiento de muestras. A Antoni Castro y su equipo, sin ellos no hubiera sido posible gran parte de este trabajo, concretamente todo el estudio con pacientes con lupus sistémico eritematoso. Al igual que al Dr. Joan de Pablo por su colaboración en lo referente al estrés y ansiedad.

A Biosfer Teslab y al COS (*Centre for Omics Sciences*) por sus análisis de Resonancia Magnética Nuclear, glicofomas de Apo CIII y LPS y sus componentes.

A todos mis amigos, compañeros de trabajo y estudiantes que, de alguna manera, han contribuido a perfilar mi personalidad y hacerme ver las cosas desde diferentes puntos de vista. En especial a Ricardo, por el apoyo moral en las comidas y facilitar el económico durante un tiempo. También, al personal de la unidad de Farmacología, cabe destacar a Vanessa y Bernat por aguantarme en los últimos momentos de la tesis, que han sido los más duros y de peor humor.

Aunque no es lo más normal en unos agradecimientos, quisiera que tuvieran el protagonismo que se merecen todos aquellos inconvenientes y piedras en el camino con las cuales me he ido tropezado una y otra vez, ya que a veces han sido fundamentales para levantarme, mirar al frente y continuar.

Por último, aunque no por ello menos importante, a toda mi familia, ya que ella es la que lleva conmigo desde el inicio de los tiempos, desde que descubrí que con una bata blanca de laboratorio soy feliz.

A mis padres, Pedro y M^a Rosalía, por su sacrificio constante para que mis hermanos y yo pudiéramos estudiar y ser hombre y mujeres con futuro. Por apoyarme siempre en las decisiones que he tomado, permitirme que estudiara lo que realmente me gustaba; aunque al principio pensaba que sería una médica frustrada, he de reconocer que no me arrepiento del camino seguido. No os sintáis mal porque no haya podido estudiar

medicina, era un mal momento; sino sentiros orgullosos de que logré reconducir la biología hacia lo que me gusta, descubrir el porqué de las cosas y su aplicación para ayudar a los demás como es la biomedicina.

A mis hermanos, Pedro, Palmelia y Ana. A lo mejor no son conscientes de todo lo que han contribuido a que siga adelante. Seguro que si les pregunto de qué va esto, puede que no tengan ni idea, pero sé que se sienten orgullosos de mí, de su hermana la empollona, la rarita que en agosto contaba los días para ver cuánto faltaba para empezar el colegio, la misma a la que ahora le piden consejos de “cosas serias”.

Amor, a ti también, no me olvido de mi compañero de viaje, apoyo incondicional en todo este recorrido, anímica y en algunos casos intelectualmente también. Esta tesis también es tuya, recuerda que eres el principal culpable de todo esto, ya que fuiste la razón por la que acabé en Tarragona. Por esas noches de mal sueño, desayunos y cafés hablando de los artículos, resultados, experimentos, teorías... Por tu paciencia al escuchar mis preocupaciones, aguantar mis cambios de humor (he de reconocer que no han sido pocos), ayudarme a levantarme en cada bache y soportando mi canturreo “tarirorariro, tarirorarera, tirirí” cada vez que estaba contenta e ilusionada por algo.

A los que ya no están y me dejaron a lo largo del camino; abuelo y abuela, por vosotros.

Gracias.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

*“Solo sé que no se nada y, al saber que no sé nada, algo sé;
porque sé que no sé nada”.*
(Sócrates)

I’m only human after all.
(Jamie A. Hartman, Rory Graham)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Índice

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

ÍNDICE DE CONTENIDO

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	7
Presentación y Justificación	13
Introducción.....	19
I. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	21
Riesgo cardiovascular.....	22
II. METABOLISMO LIPÍDICO.....	25
Metabolismo exógeno	26
Metabolismo endógeno	29
Transporte Reverso de Colesterol	32
III. ARTERIOSCLEROSIS	35
Patogénesis de la arteriosclerosis	35
Arteriosclerosis subclínica.....	38
Factores de riesgo	40
IV. ESTRÉS y ANSIEDAD.....	45
Estrés y arteriosclerosis	47
Ansiedad y arteriosclerosis	48
V. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO	50
LES y arteriosclerosis	52
Factores de riesgo cardiovascular en LES.....	53
VI. NUEVAS PROPIEDADES DE LAS LIPOPROTEÍNAS	58
Diámetro y número de partículas.....	60
Carga eléctrica	62
Glicofomas de Apo CIII.....	65
Lipopolisacárido (LPS)	67
Hipótesis y Objetivos	71
Metodología.....	77
I. SELECCIÓN DE PARTICIPANTES	79

Estudio 1. Mujeres jóvenes con estrés y ansiedad	79
Estudio 2. Pacientes con LES y controles	79
Estudios 3, 4 y 5. Hombres jóvenes y sanos	80
II. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL PLASMA.....	81
Obtención de plasma.....	81
Análisis bioquímico	82
III. DIÁMETRO Y NÚMERO DE PARTÍCULAS.....	83
IV. OBTENCIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS.....	85
V. CARGA ELÉCTRICA.....	87
Potencial Z	88
VI. GROSOR DE LA ÍNTIMA-MEDIA (cIMT)	98
VII. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO	100
VIII. GRADO DE ESTRÉS Y DE ANSIEDAD	101
Estrés	101
Ansiedad	101
IX. GLICOFORMAS DE APO CIII.....	103
X. LPS y sus COMPONENTES	105
XI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	107
Resultados	111
ESTUDIO 1. Estrés, ansiedad, diámetro, nº de partículas y carga eléctrica	113
ESTRÉS	114
ANSIEDAD	119
ESTUDIO 2. cIMT y carga eléctrica en LES	125
ESTUDIO 3. Glicofomas de Apo CIII	135
ESTUDIO 4. LPS y sus componentes	144
ESTUDIO 5. Relación entre las glicofomas de Apo CIII, LPS y sus componentes	153
Discusión.....	159
DISCUSIÓN POR ESTUDIOS	161

ESTUDIO 1. Estrés, ansiedad, diámetro, número de partículas y carga eléctrica	161
ESTUDIO 2. cIMT y carga eléctrica en LES.....	164
ESTUDIO 3. Glicoformas de Apo CIII	168
ESTUDIO 4. LPS y sus componentes	170
ESTUDIO 5. Relación entre las glicoformas de Apo CIII, LPS y sus componentes	174
DISCUSIÓN GLOBAL	176
Conclusiones.....	181
CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS	183
ESTUDIO 1. Estrés, ansiedad, diámetro, número de partículas y carga eléctrica	183
ESTUDIO 2. cIMT y carga eléctrica en LES.....	183
ESTUDIO 3. Glicoformas de Apo CIII	184
ESTUDIO 4. LPS y sus componentes	184
ESTUDIO 5. Relación entre las glicoformas de Apo CIII, LPS y sus componentes	185
CONCLUSIÓN GLOBAL.....	185
Referencias.....	187
Anexos	217
ANEXO I. ACR 1997.....	219
ANEXO II. LIPOPROTEÍNAS	221
ANEXO III. ULTRACENTRIFUGACIÓN	227
ANEXO IV. DIÁLISIS	231
ANEXO V. CARGA ELÉCTRICA.....	233
ANEXO VI. CFCA (Cuestionario de Frecuencia de Consumo Alimentario)	236
ANEXO VII. TEST ESTRÉS ACADÉMICO	238
ANEXO VIII. STAI (<i>State-Trait Anxiety Inventory</i>)	241

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas de transporte de las lipoproteínas.	25
Figura 2. Metabolismo exógeno.	26
Figura 3. Formación de quilomicrones en el enterocito.	27
Figura 4. Metabolismo endógeno.	30
Figura 5. Transporte reverso de colesterol.	33
Figura 6. Esquema de la patogenia de la arteriosclerosis.	36
Figura 7. Estructura y componentes principales de las lipoproteínas.	58
Figura 8. Proceso de obtención del plasma.	81
Figura 9. Clasificación de las lipoproteínas según su diámetro.	84
Figura 10. Ultracentrifugación.	86
Figura 11. Capas y potencial Z de una partícula.	89
Figura 12. Cubeta utilizada para el potencial Z.	90
Figura 13. Comparación de la carga eléctrica media de las lipoproteínas en función del volumen inicial de plasma utilizado en la ultracentrifugación secuencial.	92
Figura 14. Comparación de la carga eléctrica de las lipoproteínas antes y después de la determinación de las subclases de lipoproteínas mediante RMN.	93
Figura 15. Valores de carga eléctrica tras la RMN respecto a los valores previos a ésta.	95
Figura 16. Esquema de la medida de la cIMT.	98
Figura 17. Espectro de glicofomas de Apo CIII detectadas.	104
Figura 18. Carga eléctrica de las lipoproteínas de pacientes con LES y controles.	128
Figura 19. Carga eléctrica de las lipoproteínas de pacientes con LES, LES en estado de brote y controles.	129
Figura 20. Distribución de las siete glicofomas de Apo CIII en la población de estudio.	138
Figura 21. Distribución relativa de las glicofomas de Apo CIII en las lipoproteínas de cada individuo.	140

Figura 22. <i>Heatmap</i> de correlaciones entre los TG y las glicoformas de Apo CIII.	142
Figura 23. Distribución de LPS y sus componentes en plasma y las lipoproteínas.	147
Figura 24. Número de moléculas de LPS por cada partícula lipoproteica.	147
Figura 25. Distribución individual del LPS y sus componentes (3-OH FAs) en las lipoproteínas.	150
Figura 26. Visualización medida con el refractómetro.	228
Figura 27. Picnómetro.	228
Figura 28. Gráficos de una medida de buena calidad.	235

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores convencionales y no convencionales de riesgo cardiovascular en LES.....	54
Tabla 2. Características de la población.	114
Tabla 3. Características de los grupos de población según el grado de estrés.....	115
Tabla 4. Perfil lipídico de una población según el grado de estrés.	116
Tabla 5. Modelos de regresión lineal para la variabilidad del estrés.	118
Tabla 6. Características de la población según el grado de ansiedad.	120
Tabla 7. Perfil lipídico de una población según el grado de ansiedad.	121
Tabla 8. Correlaciones entre el perfil lipídico y la ansiedad.	122
Tabla 9. Modelos de regresión lineal para la variabilidad de la ansiedad.	124
Tabla 10. Características de las poblaciones de LES y de controles.	126
Tabla 11. Características del perfil lipídico avanzado por RMN en LES y controles.	127
Tabla 12. Perfil lipídico tradicional de los pacientes con LES y LES en Brote.	130
Tabla 13. Correlaciones entre la carga eléctrica neta de las lipoproteínas y la cIMT en pacientes con LES y controles.....	131
Tabla 14. Predictores independientes de la cIMT en LES.....	132
Tabla 15. Características de los pacientes con LES con y sin placa.	133
Tabla 16. Características antropométricas y de estilo de vida de la población del estudio de Apo CIII.	135
Tabla 17. Perfil lipídico tradicional y avanzado obtenido por RMN de la población del estudio de Apo CIII.	136
Tabla 18. Correlaciones entre la glicofoma Apo CIII-0b, los TG y las TRL.....	141

Tabla 19. Características antropométricas y de estilo de vida de la población del estudio de LPS.	144
Tabla 20. Perfil lipídico tradicional y avanzado obtenido por RMN de la población del estudio de LPS.	145
Tabla 21. Correlación entre los 3-OH FAs y el perfil lipídico avanzado.	152
Tabla 22. Correlaciones entre el LPS y las glicoformas de Apo CIII.	154
Tabla 23. Correlaciones entre los 3-OH FAs del plasma y las glicoformas de Apo CIII.....	155
Tabla 24. Correlaciones entre los 3-OH FAs de las lipoproteínas y las glicoformas de Apo CIII.....	156
Tabla 25. Correlaciones ajustadas por TG del LPS y las glicoformas de Apo CIII.	157
Tabla 26. Correlaciones ajustadas por TG de los 3-OH FAs y las glicoformas de Apo CIII.....	157
Tabla 27. Características y composición de las diferentes lipoproteínas.	221
Tabla 28. Características de las apolipoproteínas.	224
Tabla 29. Composición de las soluciones de densidad.	227
Tabla 30. Composición del PBS.	231
Tabla 31. SOP para la determinación de la carga eléctrica.	233

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Abreviaturas

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

3-OH FAs: Ácidos grasos 3-hidroxilo conjugados o *conjugated 3-hydroxy fatty acids*

Aas: Aminoácidos

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

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

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

ACR: *American College of Rheumatology*

ACV: Accidente cerebrovascular

Apo: Apolipoproteína

CB: Bulbo carotídeo

CCA: Arteria carotídea común

CETP: *Cholesterol ester transfer protein*

Chol: Colesterol

cIMT: Grosor de la íntima-media carotídea o *carotid intima-media thickness*

COS: Centro de Ciencias Ómicas o *Centre for Omics Sciences*

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2

ECA: Arteria carotídea externa

ECV: Enfermedad cardiovascular

FFAs: *Free Fatty Acids* o ácidos grasos libres

HDL: *High-density lipoprotein* o lipoproteína de alta densidad

HDLc: Colesterol HDL

HDL-P: Partículas totales de HDL

HDL-TG: Triglicéridos que contiene la fracción lipoproteica HDL

HPA: Hipotálamo-pituitaria-adrenales

HSPG: Heparán sulfato proteoglicano

HTG: Hipertrigliceridemia

ICA: Arteria carotídea interna

IDL: *Intermediate-density lipoprotein* o lipoproteína de densidad intermedia

IDLc: Colesterol IDL

IDL-P: Partículas totales de IDL

IDL-TG: Triglicéridos que contiene la fracción lipoproteica IDL

IL: Interleucina

IMC: Índice de masa corporal

kDa: Kilodaltons

LBP: Proteína de unión a lipopolisacárido

LCAT: Lecitin Colesterol Acil Transferasa

LDL: *Low-density lipoprotein* o lipoproteína de baja densidad

LDLc: Colesterol LDL

LDLR: Receptor de la LDL

LDL-P: Partículas totales de LDL

LDL-TG: Triglicéridos que contiene la fracción lipoproteica LDL

LE: Lipasa endotelial

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LH: Lipasa hepática

LOX-1: *Lectin-like oxLDL receptor 1*

LPL: Lipoproteína lipasa

LPS: Lipopolisacárido

Lp-PLA₂: Fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas

LRP-1: *LDL receptor-related protein 1*

MAG: Monoacilgliceroles

MTP: *Microsomal triglyceride transfer protein*

NEFA: Ácido graso no esterificado o *non-esterified fatty acid*

OMS: Organización Mundial de la Salud

oxLDL: LDL oxidada

PAFR: *Platelet-activating factor receptor*

PCR: Proteína C reactiva

PCSK9: *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*

PL: Fosfolípidos

PLTP: *Phospholipid transfer protein*

QM: Quilomicrones

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

sdLDL: *Small-dense low-density lipoprotein* o LDL pequeñas y densas

SLEDAI: *Systemic Lupus Erythematosus disease activity index*

SLICC: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*

SNS: Sistema nervioso simpático

SOP: *Standard Operating Procedure*

SR-B1: *Scavenger receptor class B member 1*

STAI: *State-Trait Anxiety Inventory*

TG: Triglicéridos

TLR4: *Toll-like receptor 4*

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TRC: Transporte Reverso de Colesterol

TRL: Lipoproteínas ricas en triglicéridos

VLDL: *Very low-density lipoprotein* o lipoproteína de muy baja densidad

VLDLc: Colesterol VLDL

VLDLR: *Very-low density lipoprotein receptor*

VLDL-P: Partículas totales de VLDL

VLDL-TG: Triglicéridos que contiene la fracción lipoproteica
VLDL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Resumen

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud. Una de sus causas principales es la obstrucción de los vasos sanguíneos debido a depósitos de grasa que impiden que la sangre fluya correctamente. Estos depósitos de grasa en las paredes de la arteria se llevan a cabo en la arteriosclerosis. Además, aproximadamente el 30 – 40 % de los infartos de miocardio suceden en situaciones con niveles normales de colesterol total y colesterol LDL, por lo que no se pueden explicar por los factores de riesgo tradicionales; es lo que se conoce como riesgo residual. Esta situación crea la necesidad de buscar nuevos factores de riesgo a través de análisis más exhaustivos, para así mejorar la predicción del riesgo residual y prevenir el desarrollo de la arteriosclerosis. Los candidatos analizados en esta tesis doctoral son el diámetro y número de partículas lipoproteicas, la carga eléctrica neta, las glicofomas de Apo CIII, principalmente en función de la presencia o ausencia de ácido siálico, y el contenido de LPS y sus componentes (3-OH FAs) y para ello se han utilizado diferentes poblaciones de estudio: pacientes diagnosticados de LES, participantes controles y mujeres y hombres jóvenes y aparentemente sanos.

Para llevar a cabo las determinaciones de estas propiedades de las lipoproteínas se utilizan diferentes técnicas. El diámetro y número de partículas se determinan mediante resonancia magnética nuclear a partir de una muestra de plasma. La carga eléctrica neta se cuantifica en las fracciones lipoproteicas aisladas por ultracentrifugación secuencial mediante la determinación de la movilidad electroforética a través de una técnica denominada M3-PALS, que combina el *Laser Doppler micro-electrophoresis* y *Phase Analysis Light Scattering* (PALS). Las glicofomas de Apo CIII y el contenido de LPS y sus componentes se determinan tanto en plasma como en las lipoproteínas aisladas. Para las glicofomas, se aísla por inmunoafinidad la Apo CIII y posteriormente se analiza por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF). El LPS y sus

componentes se determinan por cromatografía de gases acoplada en tándem a espectrometría de masas (GC-QqQ/MS²).

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran la importancia de análisis exhaustivos en la búsqueda de nuevos factores de riesgo, ya que al determinar las propiedades de las lipoproteínas anteriormente mencionadas a través de este tipo de análisis se obtiene más información útil para el diagnóstico de perfiles lipídicos aterogénicos en diferentes poblaciones.

Por un lado, el diámetro y número de partículas ayudan a identificar un perfil lipídico más aterogénico en situaciones de estrés y ansiedad. En cuanto a la carga eléctrica de las lipoproteínas, también se ve influenciada en casos de estrés y ansiedad y en los pacientes con lupus, tiene un papel importante, ya que tiene un efecto sobre el grosor de la íntima-media carotídea independiente a las características antropométricas, al tabaquismo y al perfil lipídico tradicional obtenido por rutina clínica; así como al diámetro y número de partículas.

Por otro lado, las distintas glicoformas de Apo CIII presentan una distribución relativa de cada una de ellas igual tanto en plasma como en las distintas lipoproteínas y se comportan de maneras diferentes en relación con el perfil lipídico. En el caso del LPS y de sus componentes la distribución es diferente en plasma y las lipoproteínas y se obtienen una gran variedad de correlaciones entre dichos parámetros y el perfil lipídico, las cuales presentan distintos comportamientos en función del componente del LPS y de la lipoproteína en la que se encuentre.

Por último, se demuestra la importancia de estudiar las interacciones entre varias propiedades de las lipoproteínas, ya que las glicoformas de Apo CIII afectan sobre la cantidad de LPS y de sus componentes que se encuentran unidos a las lipoproteínas.

Todo esto lleva a la conclusión de la importancia de realizar análisis exhaustivos de las propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas tanto en plasma total como en las propias lipoproteínas aisladas, además del estudio de cómo éstas interactúan entre ellas ya que el efecto que tiene una propiedad sobre el perfil lipídico y/o con la arteriosclerosis y el riesgo cardiovascular en última instancia, podría verse afectado por otra propiedad. También, la determinación de estas propiedades se debería introducir dentro de los parámetros a determinar en un análisis de rutina clínica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Presentación y Justificación

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Esta tesis doctoral se ha realizado en la Unidad de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis (URLA), la cual pertenece al Departamento de Medicina y Cirugía de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la *Universitat Rovira i Virgili* (URV). La dirección y tutorización de la tesis las han llevado a cabo el Dr. Josep Ribalta y la Dra. Montse Guardiola.

La enfermedad cardiovascular (ECV) sigue siendo la principal causa de muerte en el mundo según la OMS (Organización Mundial de la Salud) a pesar de los avances en investigación y el empeño en su prevención. Para contribuir a solventar este problema, esta tesis doctoral se basa en el estudio de diversas propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas, el efecto que éstas tienen sobre el riesgo cardiovascular y sus posibles papeles como factores de riesgo independientes. Por tanto, se centra en buscar nuevos factores de riesgo y/o propiedades de las lipoproteínas que nos ayuden a explicar el riesgo residual cardiovascular.

Los análisis de lípidos que se llevan a cabo en la rutina clínica no llegan a explicar todos los casos de ECV; de hecho, hay individuos que presentan niveles normales en su perfil lipídico y aun así presentan un riesgo elevado de padecer algún tipo de enfermedad cardiovascular, es lo que se denomina riesgo residual, o directamente sufren enfermedad cardiovascular. Debido a la importancia de explorar nuevas líneas de investigación para intentar explicar este riesgo residual, la URLA dispone de una línea de investigación puesta en marcha para el estudio de nuevas propiedades de las lipoproteínas. Dentro de estas nuevas propiedades, este trabajo estudia el diámetro y el número de partículas, la carga eléctrica, el contenido de formas sializadas de la apolipoproteína CIII (Apo CIII) y el contenido de lipopolisacárido (LPS) y los metabolitos de éste que se encuentran unidos a las lipoproteínas.

La elección de estas propiedades de las lipoproteínas se debe a que hay evidencias de su relación con el riesgo de enfermedad cardiovascular. Por ejemplo, hay estudios publicados que

relacionan un menor diámetro de las LDL y un mayor número de estas partículas con mayor filtración de lipoproteínas en las arterias. También hay estudios que asocian a las lipoproteínas más electronegativas con un mayor riesgo de arteriosclerosis, además de la importancia de su estudio debido a las interacciones electrostáticas que tienen lugar entre las diferentes moléculas participantes en el metabolismo lipídico y desarrollo de la arteriosclerosis. En cuanto a las glicofomas de Apo CIII, se ha visto que se asocian de forma positiva o negativa con los niveles de triglicéridos en sangre en diferentes tipos de individuos. Finalmente, la aterogenicidad que confiere el LPS a las lipoproteínas, no está del todo clara, pero sí existe cierta relación entre ellos.

En cuanto a la metodología utilizada en esta tesis doctoral, el diámetro y el número de partículas se determinan mediante RMN (Resonancia Magnética Nuclear), técnica ya aceptada por la comunidad científica, al igual que su aplicación para la predicción del riesgo cardiovascular. Sin embargo, la medida de la carga eléctrica, la determinación de las formas sializadas de Apo CIII y el contenido de LPS son nuevas propiedades a explorar que se han obtenido mediante diferentes técnicas. La aplicación en relación con el estudio de las lipoproteínas y el riesgo cardiovascular de las técnicas utilizadas en esta tesis es novedosa. Estas técnicas utilizadas aportan una mayor sensibilidad y fiabilidad en los resultados obtenidos que las empleadas en estudios anteriores.

Actualmente, hay evidencias sobre el interés y la aplicabilidad clínica de estudiar estas nuevas propiedades de las lipoproteínas, pero esta tesis doctoral, a través de la metodología utilizada y las técnicas seleccionadas, aporta una mayor sensibilidad, fiabilidad y un mayor conocimiento en el estudio de todas las lipoproteínas, ya que no nos centramos únicamente en una de ellas, sino que tenemos en cuenta todas las lipoproteínas debido a la importancia que tiene cada una de ellas en el desarrollo de la arteriosclerosis.

El planteamiento central de esta tesis, como se ha expresado anteriormente, es la búsqueda de nuevos factores de riesgo y/o propiedades de las lipoproteínas que nos ayuden a explicar el riesgo cardiovascular. Para ello no nos centramos únicamente en el estudio del plasma, sino que se hace de forma independiente en cada una de las lipoproteínas, incluyendo la IDL, la cual suele ser olvidada por la mayoría de los investigadores. Las técnicas utilizadas mejoran la fiabilidad de los resultados obtenidos y aportan una mayor información. Al tratarse de nuevas aplicaciones técnicas, algunas de ellas se ponen a punto para mejorar la calidad de los resultados, así como para reducir, en la medida de lo posible, el volumen mínimo de muestra necesario para la realización los experimentos.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Introducción

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

I. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La enfermedad cardiovascular (ECV) engloba un conjunto de desórdenes del corazón y vasos sanguíneos, entre los que se encuentran:

- ♦ Accidente cerebro vascular o apoplejía
- ♦ Arritmia
- ♦ **Arteriosclerosis**
- ♦ Cardiopatías coronarias, reumáticas y congénitas
- ♦ Enfermedades cerebrovasculares
- ♦ Hipertensión
- ♦ Infarto de miocardio
- ♦ Insuficiencia cardíaca
- ♦ Trombosis

Estas enfermedades cardiovasculares son la principal causa de defunción en el mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS); concretamente, en 2016, se produjeron 15,2 millones de muertes debidas a cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular (ACV). El hecho más lamentable es que el 80 % de los ACV e infartos de miocardio prematuros son prevenibles si se actúa sobre factores de riesgo modificables y comportamentales, como puede ser la dieta, el consumo de alcohol y tabaco, el sedentarismo y el estrés.

Tanto los ACV como los ataques de corazón suelen ser fenómenos agudos, cuya causa principal es la obstrucción de los vasos sanguíneos debido a depósitos de grasa que impiden que la sangre fluya hacia el cerebro o el corazón, respectivamente. Estos depósitos de grasa en las paredes de la arteria se llevan a cabo en la arteriosclerosis.

La arteriosclerosis (ver capítulo III de la introducción) es un proceso patológico de carácter inflamatorio y lipídico que afecta a los vasos sanguíneos. Se caracteriza por la infiltración y acumulación de lípidos y componentes del sistema inmunitario en la pared vascular, la proliferación de células musculares

lisas y acumulación de componentes del tejido conectivo. Este proceso provoca un engrosamiento y pérdida de elasticidad de la pared de los vasos sanguíneos y, en última instancia, la formación de la placa de ateroma.

Riesgo cardiovascular

Los factores de riesgo cardiovascular se relacionan con un incremento en la mortalidad al determinar la probabilidad de sufrir una ECV.

Existen diferentes tipos de **factores de riesgo**:

- ♦ **Modificables**: son aquellos factores de riesgo que se pueden modificar cambiando nuestro estilo de vida, como por ejemplo la dieta, el tabaquismo o la actividad física.
- ♦ **No modificables**: son factores de riesgo que no se pueden cambiar como la edad, el género, la historia familiar, los condicionantes genéticos, entre otros.

Además, también se pueden clasificar como:

- ♦ **Tradicionales**: comprenden los factores de riesgo más conocidos y aceptados por la comunidad científica como la hipertensión, la obesidad, el estilo de vida, el consumo de tabaco y alcohol, los niveles en sangre de colesterol y triglicéridos, la dieta, la edad, el género, la menopausia, los condicionantes genéticos y la historia familiar.
- ♦ **Emergentes**: son factores de riesgo que están siendo estudiados en los últimos años y de los cuales no se dispone de tanta información. Estos factores pueden ser el diámetro y número de partículas de las lipoproteínas, la carga eléctrica, la composición de las lipoproteínas, las enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES), el estrés y la ansiedad, parámetros inflamatorios, entre otros. El estudio de este tipo de factores de riesgo tiene especial importancia en casos en los cuales hay riesgo cardiovascular, pero los factores de riesgo tradicionales modificables están dentro de la normalidad, es decir, en los cuales hay riesgo residual.

Gracias al control de los factores de riesgo cardiovascular se disminuye significativamente los eventos cardiovasculares, llevando consigo una reducción del 50 % de la mortalidad debida a ECV [1]. De entre todos los factores de riesgo, posiblemente el más relevante es la hiperlipidemia, con una especial importancia el papel del colesterol, ya que es el lípido que se acumula en la placa de ateroma y que finalmente acaba obstruyendo la arteria.

Las concentraciones de colesterol transportado por las LDL (*low-density lipoprotein* o lipoproteínas de baja densidad) correlacionan directamente con la prevalencia e incidencia de eventos cardiovasculares adversos y la muerte. Además, terapias dirigidas a disminuir los niveles del colesterol LDL (LDLc) han demostrado tener gran eficacia en la prevención y tratamiento de la enfermedad coronaria [2]. Las contribuciones claves respecto a lo anterior corresponden al estudio Framingham, cuyo objetivo principal era la identificación de factores que promueven la enfermedad cardiovascular y su seguimiento a lo largo del tiempo en un gran número de participantes [3]. El estudio demostró que tanto el colesterol total como el LDLc son los principales inductores de la arteriosclerosis en gran parte de la población general, pero además hay otros factores de riesgo importantes [4] como niveles bajos de colesterol HDL (HDLc), hipertensión, exceso de peso, hiperglicemia, el consumo de tabaco, ausencia de ejercicio y el estrés, entre otros.

A pesar del conocimiento de todos estos factores de riesgo, aún queda por explicar aproximadamente el 40 % de los casos de cardiopatía isquémica, en los cuales los lípidos plasmáticos (colesterol y triglicéridos) están dentro de los niveles de normalidad [5]; a este riesgo cardiovascular se le denomina **riesgo residual**. Para entender las causas del riesgo residual, se están empezando a estudiar factores de riesgo no convencionales para así poder explicar en mayor medida la arteriosclerosis y tener un mayor número de factores de riesgo candidatos a ser controlados para mejorar la prevención de la

ECV. Si también se tuviera en cuenta estos factores a la hora de evaluar el riesgo cardiovascular, y no solamente los convencionales, se podría llegar a reducir tanto el número de eventos cardiovasculares como los índices de morbilidad y mortalidad debida a ECV.

Incluso en los casos en que las concentraciones de lípidos son normales, la principal causa de ECV son los depósitos de grasa que llegan a obstruir arterias, con lo cual, conocer en detalle el metabolismo de los lípidos es importante para su prevención, así como las propiedades de las lipoproteínas.

II. METABOLISMO LIPÍDICO

Los lípidos son moléculas anfipáticas esenciales para los organismos vivos y presentan una gran variedad estructural. Sus funciones principales son:

- ♦ Estructural: son componentes esenciales de las membranas celulares como, por ejemplo, los fosfolípidos (PL) de la superficie celular.
- ♦ Reguladora: pueden actuar como hormonas (esteroideas) y vitaminas (vitamina D).
- ♦ Reserva: tienen un alto contenido energético y se pueden almacenar en forma de depósitos de grasa.

Para llevar a cabo estas funciones dentro del organismo, los lípidos son transportados por las lipoproteínas a los tejidos mediante tres rutas (Figura 1):

- ♦ Metabolismo exógeno
- ♦ Metabolismo endógeno
- ♦ Transporte Reverso de Colesterol (TRC)

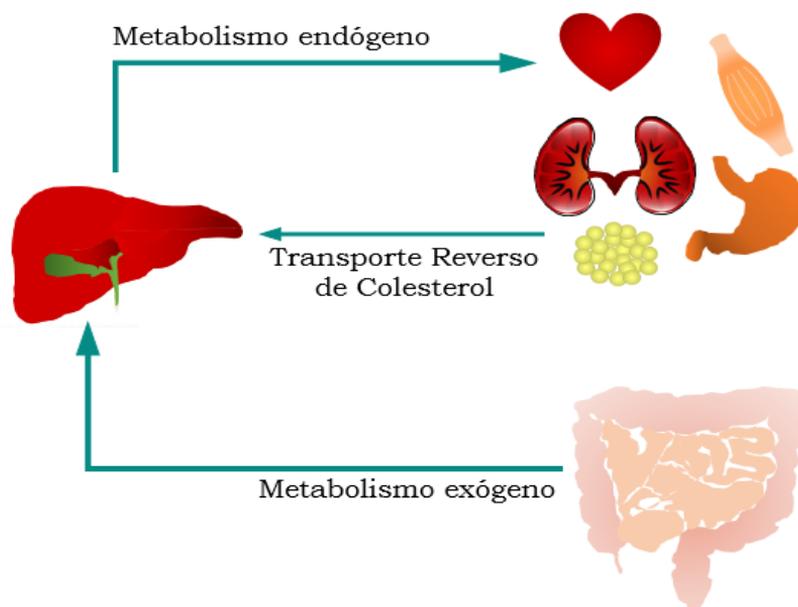


Figura 1. Rutas de transporte de las lipoproteínas.

Metabolismo exógeno

Es el responsable de que los lípidos procedentes de la dieta vayan desde el intestino hasta el hígado (Figura 2). La mayoría son triglicéridos (**TG**) (> 95 %), le siguen los fosfolípidos (**PL**), ácidos grasos libres (**FFAs**), colesterol y vitaminas liposolubles, pero dependiendo de la dieta seguida pueden variar; de hecho, la dieta puede hacer que los PL de las membranas celulares cambien afectando así a las interacciones. También se ha visto que los PL procedentes de la dieta puede tener diversos efectos sobre distintas patologías, entre ellas la ECV [6].

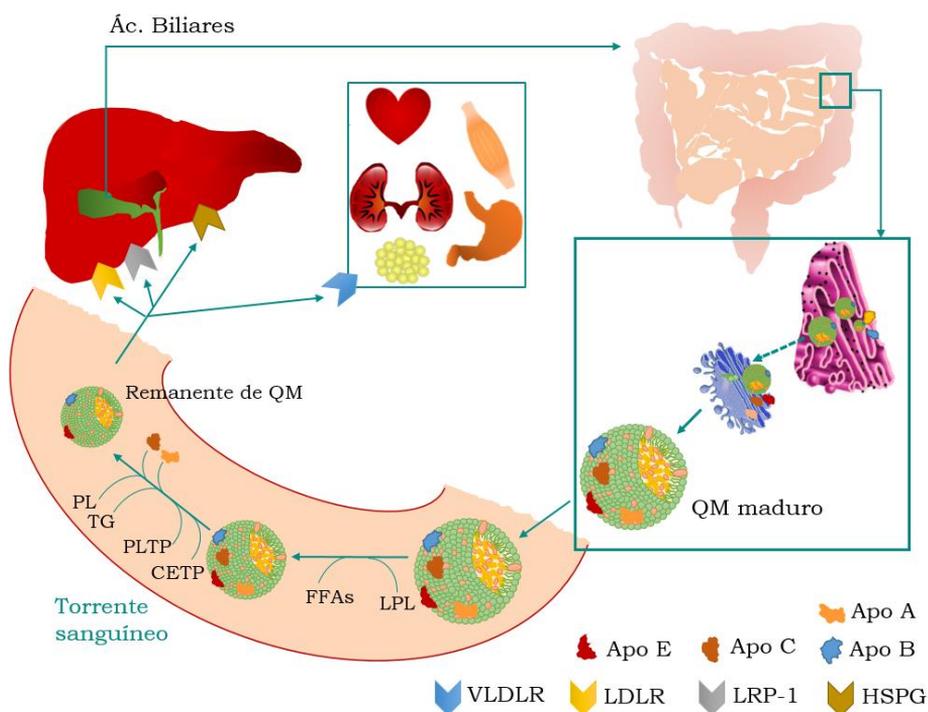


Figura 2. Metabolismo exógeno.

El proceso se inicia en los enterocitos, donde se forman y maduran los quilomicrones. Una vez maduros, pasan a la linfa hasta alcanzar la circulación donde son metabolizados. La LPL hidroliza los TG dando lugar a FFAs. Acto seguido, la CETP y PLTP actúan sobre estos QM haciendo que disminuya su contenido en TG y PL. Además, la Apo A y C son cedidas a las HDL, dando lugar a remanentes de QM, los cuales serán reconocidos por receptores para dar paso a su hidrólisis lisosomal.

QM: quilomicrones; PL: fosfolípidos; TG: triglicéridos; FFAs: ácidos grasos libres; CETP: *cholesterol ester transfer protein*; LPL: lipasa lipoproteica; PLTP: *phospholipid transfer protein*; VLDLR: receptor de las VLDL; LDLR: receptor de las LDL; LRP-1: *LDL receptor-related protein 1*; HSPG: heparán sulfato proteoglicano.

Por un lado, la hidrólisis de los TG produce monoacilgliceroles (MAG) y FFAs gracias a la acción de las lipasas gástrica y pancreática [7, 8]. Por otro lado, los PL dan lisofosfolípidos y FFAs al hidrolizarse; y, finalmente, los ésteres de colesterol formaran FFAs y colesterol libre tras desesterificarse. Los productos de estas digestiones son absorbidos por los enterocitos mediante diversas proteínas transportadoras. Una vez en el interior de éstos, concretamente en el retículo endoplasmático, los MAG se vuelven a esterificar con FFAs hasta formar de nuevo TG y PL donde se pueden almacenar o se pueden ensamblar con la **apolipoproteína (Apo) B48**, sintetizada en el intestino, para dar lugar a los **quilomicrones (QM)** (Figura 3). La transferencia y ensamblaje de los lípidos a la Apo B48 se debe a la acción de la **MTP** (*microsomal triglyceride transfer protein*), esencial para dicho proceso [9].

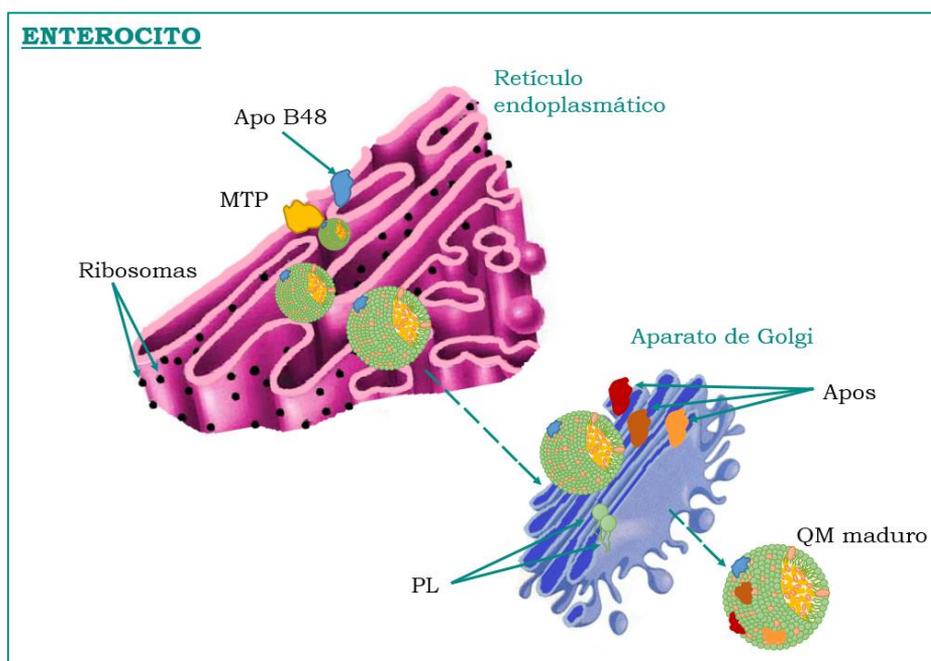


Figura 3. Formación de quilomicrones en el enterocito.

El proceso se inicia en el retículo endoplasmático con la síntesis de la Apo B48, la cual se enriquece en lípidos gracias a la MTP o es degradada. Posteriormente, en el aparato de Golgi se añaden los PL y Apos A para terminar de estabilizar los QM.

Apos: Apolipoproteínas; QM: quilomicrones; MTP: *microsomal triglyceride transfer protein*; PL: fosfolípidos.

El siguiente paso de la formación de los QM tiene lugar en el aparato de Golgi, donde se añaden más PL y **apolipoproteínas A** para estabilizar y terminar de formar los QM [10]. También, se le pueden unir moléculas de lipopolisacárido (**LPS**), que se hayan filtrado al interior del enterocito, las cuales proceden de bacterias Gram negativas y les proporciona más aterogenicidad mediante un mayor poder inflamatorio [11]. Una vez terminado su ensamblaje, los QM pasan al sistema linfático y de éste se drenan a la circulación sanguínea a través del conducto torácico para así llegar a los tejidos periféricos.

En circulación, los QM inician un proceso continuo de cambio de tamaño y composición al interactuar **electrostáticamente** con proteínas de transferencia de lípidos. Son hidrolizados por la **lipoproteína lipasa (LPL)**, la cual es activada por la Apo CII e inhibida por la **Apo CIII** [12, 13]. Los TG se hidrolizan dando glicerol, el cual se incorporará a la gluconeogénesis, y FFAs que pueden ser absorbidos por las células y ser almacenados como fuente de energía. La LPL es una enzima clave en el proceso de eliminación de las lipoproteínas mediante receptor [14], por lo que modificaciones en la interacción de ésta con las lipoproteínas puede afectar significativamente al metabolismo. Dichas modificaciones podrían ser debidas a alteraciones en las distintas propiedades de las lipoproteínas como pueden ser la carga eléctrica o la glicosilación de la Apo CIII por moléculas de ácido siálico, entre otras.

Paralelamente, los QM reciben de las HDL (*high-density lipoprotein* o lipoproteína de alta densidad) la **Apo CII**, activador de la LPL, y la **Apo E**, imprescindible para el reconocimiento por los receptores. Además, por la acción de la **CETP** (*cholesterol ester transfer protein*) y la **PLTP** (*phospholipid transfer protein*) van perdiendo TG y PL. La PLTP distribuye los PL entre las distintas lipoproteínas. En el caso de la CETP, ésta redistribuye los TG de los QM y LDL a las HDL, y ésteres de colesterol de las HDL a los QM y LDL, para así mantener un equilibrio de los lípidos entre lipoproteínas. Debido al importante papel en dicho equilibrio, un déficit de esta proteína tiene un impacto sobre la arteriosclerosis disminuyendo el LDLc y aumentando el HDLc [15]. Por otro lado,

también afecta al diámetro de estas partículas, ya que una menor actividad de esta enzima se asocia con un diámetro medio mayor de LDL [16] y HDL [17]. Tanto la CETP como la PLTP, al igual que transfieren lípidos, también transfieren a las LDL las moléculas de LPS que se hayan filtrado y se encuentren unidas a las HDL haciéndolas más aterogénicas, siendo más efectiva la PLTP [18].

Conforme los QM pierden TG y PL y ceden de nuevo las Apos A y C a las HDL, se van haciendo más pequeños y densos dando lugar a los **remanentes de los QM**, ricos en colesterol y Apo E. Estos remanentes serán retirados de la circulación por el receptor de la LDL (**LDLR**), y en menor medida por el receptor de las VLDL (**VLDLR**), el **LRP-1** (*LDL receptor-related protein 1*) y el heparán sulfato proteoglicano (**HSPG**). La interacción de los remanentes de QM con los receptores se lleva a cabo por la Apo E, dando lugar a la endocitosis del QM y la consiguiente hidrólisis lisosomal. Casi todos los TG de los QM son utilizados por los tejidos periféricos; en cambio, casi todo el colesterol llega intacto al hígado.

Así como los TG se absorben y comienzan su metabolismo con los QM, el colesterol lo hace a través de las **HDL**. La absorción de colesterol en el intestino es un proceso altamente regulado, ya que hay dos vías totalmente independientes: una de QM dependientes de Apo B y MTP, y otra de HDL independiente de Apo B, la cual está mediada por **Apo AI** y **ABCA1** (*ATP-binding cassette sub-family A member 1*) [7, 19, 20], que incrementa el transporte intracelular de colesterol hacia la membrana plasmática [21] y facilita el flujo de colesterol hacia los aceptores extracelulares. Hay que añadir que, al igual que pasa con los QM, en el proceso de formación de las HDL se les pueden unir moléculas de LPS.

Metabolismo endógeno

Engloba el transporte de los lípidos que se sintetizan en los hepatocitos hacia los tejidos periféricos (Figura 4). Esta vía se inicia en el hígado, el cual sintetiza los lípidos de origen endógeno a partir de glicerol, ácidos grasos y colesterol. Los ácidos grasos necesarios provienen de:

- ♦ Tejidos periféricos mediante el transporte reverso de colesterol (TRC) y captación de partículas remanentes de las lipoproteínas ricas en TG.
- ♦ Tejido adiposo, debido a su lipólisis y transporte en circulación unido a la albúmina. Este origen predomina en estados de ayuno, en dietas ricas en grasa o en patologías como puede ser la diabetes.
- ♦ Síntesis *de novo* a partir del acetil-Coenzima A predominante en estados postprandiales.

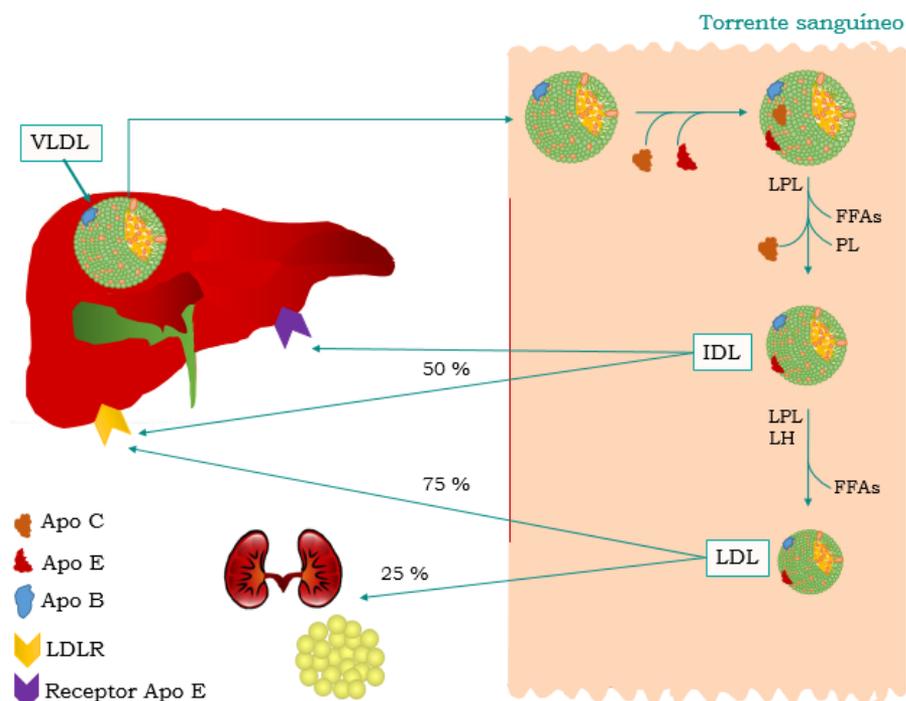


Figura 4. Metabolismo endógeno.

Comienza con la síntesis en el hígado de las VLDL y su secreción. En circulación captan Apo C y E al interactuar con las HDL. La LPL hidroliza los TG dando FFAs; además, los PL y las Apos C pasan de nuevo a las HDL, dando lugar a los remanentes de VLDL o IDL. En condiciones normales, el 50 % de las IDL son captadas por receptores hepáticos para ser eliminadas. Sobre el resto actúa la LPL formándose LDL. El 75 % de la LDL es captada por el hígado y el 25 % por el resto de tejidos.

IDL: *intermediate-density lipoprotein* o lipoproteína de densidad intermedia; LDL: *low-density lipoprotein* o lipoproteína de baja densidad; PL: fosfolípidos; FFAs: ácidos grasos libres; LPL: lipoproteína lipasa; LH: lipasa hepática; VLDL: *very low-density lipoprotein* o lipoproteína de muy baja densidad; LDLR: receptor de las LDL.

Unas de las lipoproteínas que se sintetizan en el hígado son las lipoproteínas de muy baja densidad (**VLDL** o *very low-density lipoprotein*) mediante un proceso similar al de la formación de los QM, con la diferencia de que la apolipoproteína inicial es la **Apo B100**, en lugar de la Apo B48. La síntesis de las VLDL se ve aumentada con la ingesta de hidratos de carbono y grasa.

Las **VLDL nacientes** se componen básicamente de **TG** de origen endógeno y **colesterol** esterificado y libre. Una vez liberadas a la circulación, sufre cambios en cuanto a tamaño y composición al interactuar electrostáticamente con otras lipoproteínas, concretamente las **HDL**. Al interactuar con éstas, intercambian apolipoproteínas (**Apo CI, CII, CIII y E**) y colesterol. Conforme van circulando, la **LPL** de la superficie endotelial hidroliza los TG de las VLDL, y los PL y las Apos C vuelven a las HDL formándose así los **remanentes de las VLDL**. Una porción de ellos es captada por el hígado u otros tejidos y el resto entran en la cascada lipolítica de las lipoproteínas (VLDL-IDL-LDL) que tiene lugar en el plasma.

Los remanentes de las VLDL se transforman en **IDL** (lipoproteínas de densidad intermedia o *intermediate-density lipoprotein*) por acción de la **LPL** y la **LH (lipasa hepática)**. En condiciones normales, aproximadamente el 50 % de las partículas IDL son captadas y eliminadas por el hígado gracias a la interacción entre la **Apo E** y el **LDLR**. El resto de partículas siguen circulando en plasma, sus TG son hidrolizados por la **LH** y se convierten en **LDL**, ya que un incremento de la actividad de la LH da lugar a cambios en el tamaño y la densidad de las lipoproteínas [22].

Las LDL son esencialmente de origen plasmático y constituyen el principal transporte de colesterol hacia los tejidos, siendo el 75 % de éstas captadas en el hígado y el 25 % en el resto de tejidos. En el catabolismo de las LDL, el exceso de colesterol se transforma en ácidos biliares que se secretan a la bilis. Por otro lado, los demás componentes lipídicos son captados por los macrófagos o se utilizan para la síntesis de hormonas esteroideas y la formación de membranas celulares.

La eliminación de partículas LDL de la sangre se lleva a cabo vía **LDLR**, localizado en la superficie de todas las células, excepto en los eritrocitos. El LDLR controla los niveles plasmáticos de colesterol captando por endocitosis y catabolizando las lipoproteínas que contienen Apo B100 (LDL) y Apo E (VLDL, IDL, HDL). Una vez finalizado el proceso, el receptor se recicla en la membrana plasmática. Su expresión transcripcional se regula inversamente según los niveles de colesterol libre intracelular. Por otro lado, su degradación está regulada por la **PCSK9** (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*), ya que al unirse al receptor promueve su degradación lisosomal [23]. Al ser la PCSK9 un regulador del LDLR y ser el LDLR hepático uno de los encargados de eliminar las moléculas de LPS de la circulación [24], hay evidencias que demuestran el papel de la PCSK9 en la endotoxemia metabólica mediante la eliminación hepática del LPS en casos de sepsis, siendo mayor su eliminación al inhibirla [25].

Transporte Reverso de Colesterol

Es el encargado de devolver al hígado el exceso de colesterol de los tejidos periféricos (Figura 5), ya que el hígado y los órganos productores de hormonas esteroideas son los únicos capaces de utilizarlo para la síntesis de componentes celulares.

Las HDL son las encargadas de llevar a cabo este tipo de transporte. Su síntesis comienza con la formación de las **HDL nacientes**, compuestas por **Apo AI** y **PL**. Estas HDL son secretadas a la circulación por el hígado y por el intestino delgado, pero también se pueden formar a partir de lípidos liberados en la lipólisis de lipoproteínas ricas en triglicéridos (**TRL**) por la **LPL** [26]. Estas HDL presentan un efecto ateroprotector al capturar el colesterol de los tejidos periféricos, como pueden ser las arterias, y de los macrófagos.

El colesterol se puede transferir a las HDL por dos procesos:

- ♦ Difusión independiente de receptor: Las moléculas de colesterol se liberan de la membrana celular y se incorporan a las HDL nacientes sin necesidad de interacción con ningún receptor.

- ♦ Interacción con receptores: Las apolipoproteínas presentes en las HDL actúan de aceptores permitiendo que las HDL nacientes interaccionen con receptores de las membranas celulares como pueden ser el **ABCA1** [27] o el **ABCG1** (*ATP-binding cassette sub-family G member 1*) [28].

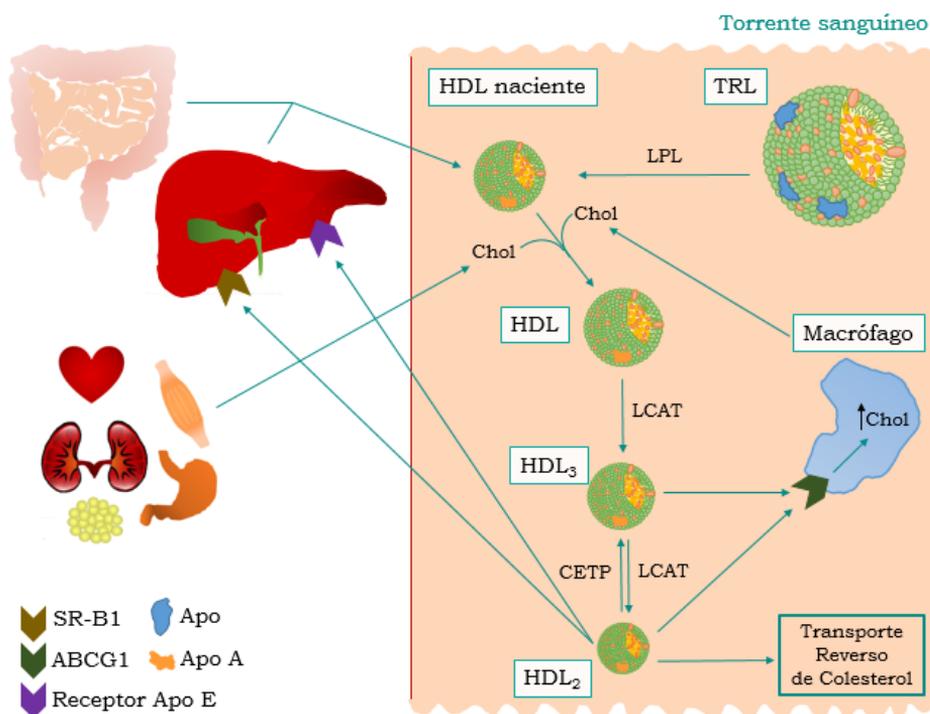


Figura 5. Transporte reverso de colesterol.

Las HDL son las encargadas del TRC. Su síntesis empieza en el hígado e intestino delgado con la formación de las HDL nacientes, o bien proceden de las TRL tras la acción de la LPL. Estas HDL nacientes captan colesterol de los tejidos periféricos y de los macrófagos convirtiéndose en HDL maduras. El colesterol captado se esterifica gracias a la LCAT dando lugar a HDL₃ y posteriormente a HDL₂. Éstas pueden hacer que los macrófagos almacenen más colesterol gracias al ABCG1, pueden volver a iniciar el ciclo o pueden ser captadas por el hígado a través del SR-B1 o el receptor de la Apo E.

HDL: *high-density lipoprotein* o lipoproteína de alta densidad; LPL: lipasa lipoproteica; LCAT: *lecithin cholesterol acyl transferase*; CETP: *cholesterol ester transfer protein*; ABCG1: *ATP-binding cassette sub-family G member 1*; Chol: colesterol; SR-B1: *scavenger receptor class B member 1*.

El colesterol libre que se captura es rápidamente esterificado por la **LCAT** (Lecitin Colesterol Acil Transferasa), enzima unida a la superficie de las HDL y activada por la Apo AI. Una vez esterificado, pasa al núcleo de la partícula, haciendo que las HDL

comiencen a presentar forma esférica, se van agrandando, se transforman en HDL₃ y seguidamente en HDL₂, proceso reversible gracias a la **CETP**. Estas partículas pueden interactuar con ABCG1 y promover una mayor acumulación intracelular de colesterol en los macrófagos [28]. Además de esta formación secuencial de las HDL, partiendo de HDL naciente y pasando por HDL₃ y HDL₂ para dar lugar a las HDL maduras, ha surgido recientemente una nueva teoría basada en la secreción directa a la circulación de cada uno de los tipos de HDL, sin necesidad de que haya una interconversión de tamaños de las distintas HDL, es decir, que se sintetizan y secretan directamente HDL de distintos tamaños [29].

Una vez en circulación, las HDL sufren modificaciones al interactuar electrostáticamente con diferentes enzimas. Además de la acción de la CETP, tras la cual cambian su composición de ésteres de colesterol y TG, la expresión de la **lipasa endotelial (LE)** correlaciona inversamente con los niveles de HDLc al presentar actividad fosfolipasa A1 [30]. El destino de los ésteres de colesterol provenientes de las HDL no está definido. Por un lado, receptores hepáticos, como el **SR-B1** (*scavenger receptor class B member 1*) o el de la Apo E, pueden reconocer directamente a las HDL. Al ser éstas internalizadas, el colesterol puede utilizarse para la síntesis de ácidos biliares, el ensamblaje de nuevas lipoproteínas o ser secretado directamente por la bilis. Las partículas de HDL que no han sido captadas se pueden reciclar en circulación y empezar de nuevo el TRC. Por otro lado, el colesterol de las HDL es transferido indirectamente a otras lipoproteínas que contienen Apo B o es captado por el LRP-1.

Tras conocer cómo funciona el metabolismo lipídico y cómo se forman las distintas lipoproteínas, en el siguiente capítulo se explicarán cómo las lipoproteínas se acumulan en la pared arterial dando lugar a la arteriosclerosis.

III. ARTERIOSCLEROSIS

La arteriosclerosis, principal responsable de las enfermedades cardiovasculares, es un proceso patológico de carácter inflamatorio y lipídico que afecta a los vasos sanguíneos de tamaño medio-grande. Es una enfermedad que cursa progresivamente con el tiempo y no produce manifestaciones clínicas hasta llegar a estadios avanzados. Se caracteriza por la infiltración y acumulación de lípidos y componentes del sistema inmunitario, la proliferación de células musculares lisas y acumulación de componentes del tejido conectivo en la pared vascular (Figura 6). Esto da lugar a la formación de placas de ateroma, que conlleva una pérdida de elasticidad y un engrosamiento de la arteria.

En estadios iniciales, la arteriosclerosis es un proceso reversible si se disminuyen la concentración en plasma de las lipoproteínas que contienen Apo B o su aterogenicidad. En estadios más avanzados o con formación de placa, el proceso es más difícil de revertir, de ahí la importancia de un diagnóstico preventivo.

Patogénesis de la arteriosclerosis

La acumulación de lipoproteínas que contienen Apo B en la pared del vaso sanguíneo es un paso crítico y necesario para el desencadenamiento de la arteriosclerosis [31, 32]. La lesión comienza en la capa **íntima** de la pared arterial y va avanzando progresivamente pudiendo llegar a afectar a su totalidad, incluyendo la capa **media** y la adventicia [33].

En presencia de una mayor concentración de **lipoproteínas** más aterógenas, la monocapa de células endoteliales cambia cualitativamente, dando lugar a una **disfunción endotelial**. Estos cambios cualitativos se traducen en un aumento de la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas inflamatorias y factores protrombóticos y de estrés oxidativo. Además, se produce una modulación anormal del tono vascular, que sumado a lo anterior, provoca una mayor retención local de lipoproteínas en

la matriz extracelular de las células endoteliales, concretamente en los **proteoglicanos** [34, 35], dando lugar a un incremento en la permeabilidad de la pared arterial [36].

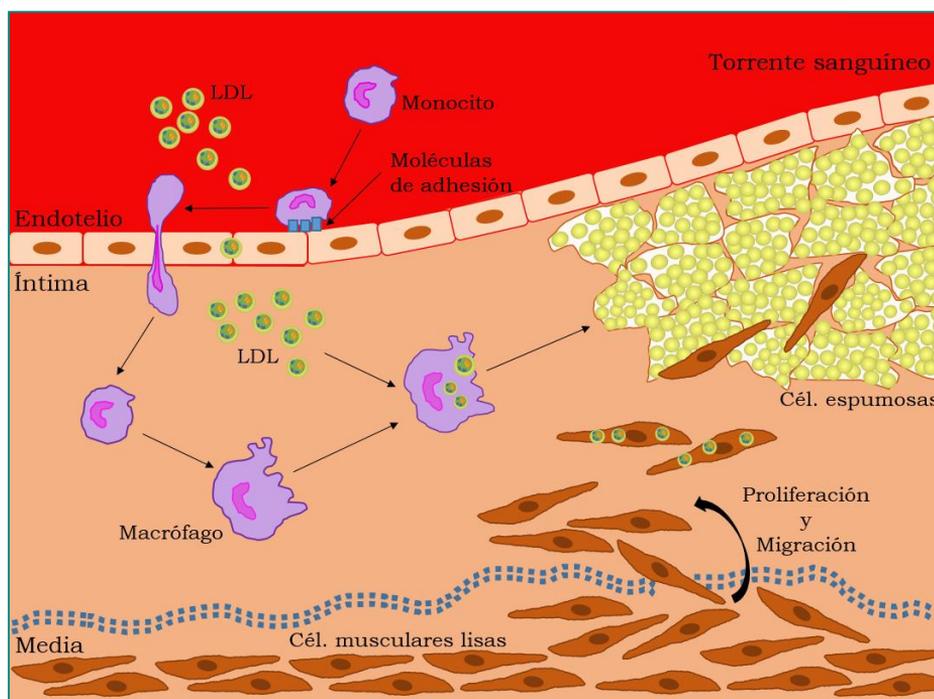


Figura 6. Esquema de la patogenia de la arteriosclerosis.

En presencia de lipoproteínas aterogénicas, el endotelio aumenta la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas..., lo que provoca una mayor filtración de lipoproteínas al espacio subendotelial y el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. Los monocitos traspasan el endotelio y se convierten en macrófagos, los cuales captan las lipoproteínas allí retenidas, convirtiéndose en células espumosas. Desde la capa media hay una proliferación y migración de las células musculares lisas hacia la íntima, las cuales participarán en la formación de la placa de ateroma.

A continuación, las lipoproteínas son retenidas en el espacio subendotelial y sufren modificaciones como la oxidación, agregación, lipólisis, cambios en sus fosfolípidos de membrana por la Lp-PLA₂... Todas estas modificaciones pueden alterar su electronegatividad y hacerlas más aterogénicas, llegando a desencadenar una **respuesta inflamatoria** [37]. En dicha respuesta, los **monocitos** traspasan el endotelio y se diferencian en **macrófagos**, los cuales activan la expresión de **receptores scavenger**, como el SR-B1, y **receptores toll-like**, como el TLR4, para captar las lipoproteínas modificadas que se encuentran

retenidas en el espacio subendotelial. Al captar lipoproteínas, los macrófagos acaban convirtiéndose en células espumosas con alto contenido lipídico en su interior y se van acumulando en la pared vascular.

Una vez la lesión está establecida, **células musculares lisas** migran a la íntima para promover la formación de una capa fibrosa de colágeno y elastina que cubra la **placa de ateroma** y la estabilice. A medida que la lesión progresa, los macrófagos mueren y su insuficiente eliminación (eferocitosis), hace que se acumulen detritos celulares, material procoagulante y protrombótico, proteasas y cristales de colesterol dando lugar a un núcleo necrótico dentro de la placa de ateroma [36, 38]. Paralelamente, los receptores *toll-like* inician una cascada de señales de liberación de óxido nítrico y enzimas proteolíticas dentro de los macrófagos que no han muerto y que se encuentran en la lesión. Estas enzimas proteolíticas degradan la matriz y hacen que la placa se desestabilice. Una placa de ateroma desestabilizada puede romperse y llegar a provocar un accidente vascular trombótico.

Resumiendo, hay tres puntos claves en el proceso aterosclerótico: la filtración de lipoproteínas aterógenas, la retención de éstas en el espacio subendotelial pudiendo afectar a la íntima-media, y la respuesta inflamatoria que se desencadena. Cabe destacar, que sobretodo la retención de las lipoproteínas y la respuesta inflamatoria que éstas provoquen se ven influenciados por las propiedades de las lipoproteínas. Respecto a la **filtración y retención de las lipoproteínas** en la pared de los vasos sanguíneos, hay trabajos que concluyen que la retención de las lipoproteínas en la pared arterial ocurre principalmente a través de **uniones electrostáticas** entre los proteoglicanos de la matriz extracelular y las lipoproteínas, concretamente con la **Apo B** de éstas [34, 35]; incluso estas interacciones se han llegado a proponer como dianas terapéuticas contra la arteriosclerosis [39]. Hay que añadir que para que estas interacciones tengan lugar, ambas moléculas se deben encontrar en la conformación espacial adecuada. En el caso de las lipoproteínas, la Apo B puede sufrir cambios conformacionales, debidos al contenido de la

lipoproteína, que se traducen en cambios en la **carga eléctrica** de la partícula afectando a las interacciones [40]. Además, la **Apo CIII** también se ha asociado con una mayor retención de las lipoproteínas en la pared de las arterias, pero, al contrario que la Apo B, el efecto es indirecto; es decir, no es la propia Apo CIII la que interacciona electrostáticamente con los proteoglicanos de la matriz, sino que ésta provoca un cambio conformacional en la Apo B, el cual facilita la interacción [41, 42]. También hay que tener en cuenta tanto el **diámetro** que presenten las lipoproteínas como el **número de partículas**, ya que partículas más pequeñas presentarán una mayor facilidad de filtración en la pared de los vasos sanguíneos que partículas más grandes y la probabilidad de penetración en dicha pared será mayor cuanto más partículas haya.

Por otro lado, otra propiedad de las lipoproteínas, que en este caso se relaciona con la respuesta inflamatoria, es el contenido de **LPS** presente en éstas. La relación del LPS con la inflamación desencadenada por macrófagos está bien establecida [43, 44]. Como la arteriosclerosis es un proceso, en parte, inflamatorio, la respuesta de los macrófagos a la presencia de LPS puede influir en ella [45]. El LPS es reconocido tanto por el SR-B1 como por el TLR4 presentes en los macrófagos. Al interactuar con el TLR4, lo activa [46] y desencadena un estado de inflamación metabólica [47] en el cual se producen moléculas de adhesión y citoquinas inflamatorias que se suman a las ya producidas en el proceso aterosclerótico, agravando así la situación. Esto hace pensar que una lipoproteína que tenga unido LPS también desencadenará dicho efecto, siendo ésta más aterogénica. En el caso de ser reconocido por el SR-B1, se atenúa la respuesta inflamatoria [48] facilitando la eliminación del LPS [49].

Arteriosclerosis subclínica

La **arteriosclerosis subclínica** se define como la fase asintomática o preclínica de la arteriosclerosis. Intervenir en esta fase es crucial para la prevención de eventos cardiovasculares; de aquí la importancia de buscar nuevos factores de riesgo, para así actuar sobre ellos e intentar evitar el desarrollo de la enfermedad.

El diagnóstico de la arteriosclerosis se enfocaba en el diagnóstico tardío de la enfermedad ya avanzada, algo insuficiente para la prevención de ésta. Desde hace unas décadas, este enfoque ha cambiado y ahora su evaluación clínica es una herramienta que ayuda a estratificar el riesgo cardiovascular [50–52]. De esta manera, las técnicas de imagen y de valoración de funcionalidad de las arterias nos ayudan a una mayor predicción del riesgo cardiovascular individual [53, 54].

Existen diferentes técnicas para la evaluación de la arteriosclerosis subclínica. La determinación del **grosor de la íntima-media carotídea (cIMT)** es una técnica no invasiva realizada por ultrasonido, fiable y reproducible (ver capítulo VI de la metodología). Se basa en medir el grosor de las capas íntima y media conjuntamente para aumentar la factibilidad del método, ya que debido a la resolución del ultrasonido no es posible distinguirlas [55, 56]. A medida que el individuo presenta factores de riesgo como por ejemplo el tabaquismo y/o la hipertensión se facilita la acumulación del colesterol y un aumento del grosor de la íntima-media [57]. Las guías europeas, basadas en estudios epidemiológicos que evalúan los riesgos de ECV en la población general, recomiendan la valoración de la cIMT, así como la determinación de la presencia de placas ateroscleróticas en la arteria carótida [58].

Esta técnica también permite determinar la presencia de **placa** de ateroma en la arteria. La definición de placa de ateroma es algo controvertida, ya que los valores de cIMT a partir de los cuales se considera placa depende del estudio de referencia que se escoja al no haber una estandarización de la medida. Por lo general, se considera placa al rango 1,2 – 1,9 mm o a un engrosamiento focal mayor de 0,5 mm o del 50 % del área colindante [59].

A pesar de que el grosor de la íntima-media y la presencia de placa reflejan un elevado riesgo cardiovascular [59, 60], hay estudios que cuestionan la eficacia de la cIMT más allá de los modelos SCORE y Framingham [61, 62]. A pesar de ello, se recomienda su uso para la clasificación de arteriosclerosis subclínica en individuos con riesgo cardiovascular moderado [51].

Factores de riesgo

La arteriosclerosis es una enfermedad multifactorial en la cual se ven implicados distintos factores de riesgo, tanto genéticos como ambientales. El control de estos factores de riesgo, como se ha mencionado en el capítulo I de esta introducción, se traduce en una reducción del 50 % de la mortalidad cardiovascular y una disminución significativa de los eventos cardiovasculares [1]. A continuación, se explican algunos de los factores de riesgo no genéticos más relevantes:

Edad

La edad es el principal factor de riesgo, ya que el proceso aterosclerótico se inicia en los primeros años de vida y se va desarrollando a lo largo de ésta. Es un factor de riesgo convencional no modificable. Con la edad, se producen cambios en el perfil lipídico debido a las necesidades energéticas que se dan en cada etapa de la vida. Durante la adolescencia, disminuyen los TG circulantes debido a un incremento en la actividad de la LPL [63]; en cambio, el colesterol total no varía respecto a la edad adulta [64]. Por otro lado, los niveles de LDLc, incrementan hasta llegar a mediana edad [65–67] y, por encima de los 65 años, se produce una reducción progresiva de LDLc [68–70]. En el caso del HDLc no está claro su comportamiento, ya que hay controversia debido a que algunos estudios no encuentran ninguna variación en función de la edad [64, 67] y otros observan una disminución de éste [65, 66].

Hay casos en los que existe una arteriosclerosis acelerada en la cual la edad no es el principal factor. Esta **arteriosclerosis acelerada** se da en el caso de niños con hipercolesterolemia familiar, en el cual el factor de riesgo es el nivel de colesterol en sangre que éstos presentan debido a mutaciones genéticas. Otro caso son los pacientes con **lupus eritematoso sistémico (LES)** que pueden llegar a presentar un riesgo aterosclerótico 50 veces mayor a la población general de su mismo rango de edad [71, 72].

Género

Es un factor de riesgo convencional no modificable. Hay estudios que muestran que hay diferencias entre ambos sexos en cuanto a riesgo ateroesclerótico, siendo el género masculino el que presenta mayor riesgo [73]. Los factores de riesgo convencionales son similares en ambos sexos, pero hay que tener en cuenta las diferencias biológicas entre ambos. Mientras que se encuentra una diferencia de 10 años en la mortalidad general entre hombres y mujeres, el número de muertes cardiovasculares se van igualando; y es que una vez las mujeres llegan a la menopausia, el riesgo se iguala en ambos sexos [74]. Unos de los efectos secundarios de la menopausia son cambios lipídicos hacia un perfil más aterogénico, lo que no queda claro es si es resultado de la edad [75, 76], la deficiencia de estrógenos o una combinación de ambos [77].

En contraposición al efecto protector que tiene el género femenino, hay poblaciones específicas de mujeres que no presentan esta protección y que presentan alto riesgo cardiovascular en edad joven [71, 72]. Un ejemplo son las pacientes con **LES**, enfermedad que se explicará más adelante (ver capítulo V de esta introducción).

Índice de masa corporal (IMC)

Un índice de masa corporal elevado se asocia fuertemente con la dislipemia aterógena consistente en niveles elevados de TG, sdLDL (*small-dense LDL* o LDL pequeñas y densas) y lipoproteínas remanentes, y bajos niveles de HDL. Este perfil aterogénico se asocia a un mayor riesgo de ECV en individuos sanos con sobrepeso [78], a mayor cIMT en hombres [79] y a calcificaciones coronarias en mujeres post-menopáusicas [80]. Además, un incremento en el peso también se asocia a VLDL más grandes y LDL y HDL más pequeñas [81]. Sin embargo, cuando el IMC se encuentra dentro de los valores normales (20 – 25 kg/m²), el riesgo se ve reducido [82–84].

Inflamación

Se sabe que la inflamación juega un papel importante en la arteriosclerosis [85, 86] siendo las vías inflamatorias importantes en el desarrollo y progresión de ésta [87, 88]. Su relevancia en el desarrollo de ECV, está bien reflejada en estudios que relacionan marcadores inflamatorios, como la **PCR** (proteína C reactiva), y los eventos cardiovasculares [86, 89]. Medidores de inflamación como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) o la interleucina 1 favorecen la unión de la LDL al endotelio, su internalización y posterior retención. A continuación, los macrófagos se convierten en células espumosas al captarlas, desencadenando todo el proceso aterosclerótico [85]. Por el contrario, las HDL presentan propiedades antiinflamatorias que pueden evitar o revertir estos procesos [90].

Dislipemia

Los parámetros con mayor asociación con el riesgo de ECV son el LDLc y el HDLc. Se ha demostrado que el control de ambos, mediante cambios en el estilo de vida, cambios en la dieta o fármacos, disminuye el riesgo cardiovascular.

Estudios epidemiológicos y meta-análisis demuestran que la bajada de los niveles de **LDLc** es clave para la prevención de ECV reduciendo su riesgo, incluso llegando a niveles extremadamente bajos [91]. Se ha visto que una disminución de 1 mmol/l (39 mg/dl) de LDLc se relaciona con una reducción del 26,6 % de sufrir algún accidente cardiovascular y del 28 % del riesgo relativo de mortalidad cardiovascular [92]

Por otro lado, niveles bajos de **HDLc** son considerados como factor de riesgo independiente de ECV [93–95], con lo cual están emergiendo nuevas terapias dirigidas a corregirlo como el aumento del ejercicio físico, la disminución del consumo de alcohol y tabaco o el tratamiento con inhibidores de la CETP [15]. Se estima que un incremento de 1 mg/dl de HDLc se asocia a una reducción de la mortalidad por ECV del 3,7 % en hombres y del 4,7 % en mujeres [96]. Sin embargo, en un meta-análisis, donde se incluyen 108 ensayos clínicos con un total de casi 300000

participantes con riesgo cardiovascular, no se muestran ninguna asociación significativa entre el HDLc y el riesgo de muerte o accidente cardiovascular tras ajustar por los niveles de LDLc [97].

Respecto a los niveles de **TG**, existe cierta controversia, ya que hay estudios epidemiológicos que sugieren que sí son un factor de riesgo independiente de ECV [98–100], y en otros pierden el valor predictivo después de ajustar por los niveles de HDLc y otros factores [101–103]. Además, si distinguimos por género, en el *Framingham Heart Study* se concluye que los TG son un factor de riesgo independiente en mujeres, pero no en hombres [104]; en cambio, en un meta-análisis es independiente en ambos géneros en una población general [105]. Esta controversia existente se puede explicar debido a la variabilidad de los niveles de TG a lo largo de la vida y en respuesta a la ingesta, ya que los TG presentan una variabilidad biológica del 23 % frente al 9,5 % del LDLc [106]. A esto hay que añadir la limitación de que cuando se determinan los TG en plasma, se obtiene un valor global y no en qué lipoproteína se encuentran, característica muy importante debido a que la aterogenicidad de los TG depende de las lipoproteínas en las cuales se transporta, lo que avala la importancia de estudios más en detalle de las lipoproteínas, sus propiedades y constituyentes.

Otros factores de riesgo

Enfermedades (comorbilidades):

El padecer algunas enfermedades hace que se tenga un mayor riesgo cardiovascular.

- ♦ El **estrés** se ha asociado con la hipertensión [107] y cambios en los niveles plasmáticos de los lípidos hacia un perfil más aterogénico [107, 108] (ver capítulo IV de la introducción).
- ♦ En estados de **ansiedad** se muestra un perfil más aterogénico referente a los niveles de HDLc y ratios en los que éste se ve involucrado (colesterol/HDLc y LDLc/HDLc) [109, 110]. Además, se asocian directamente la ansiedad con la incidencia de enfermedad coronaria, llegando a proponerla como un factor de riesgo independiente [111] (ver capítulo IV de la introducción).

- ◆ Enfermedades autoinmunes como el **lupus eritematoso sistémico (LES)** (ver capítulo V de la introducción) presentan un riesgo cardiovascular elevado [112], incluso hay estudios que concluyen que dicho riesgo no se explica por los factores de riesgo tradicionales [113].

Propiedades de las lipoproteínas:

La importancia de las lipoproteínas en el riesgo cardiovascular es bastante conocida y aceptada dentro de la comunidad científica, pero el estudio de sus propiedades no está muy avanzado. Es cierto que hay propiedades, como el diámetro de las partículas, que sí se han estudiado, pero otras como la carga eléctrica neta, la unión de moléculas de LPS o la presencia de ácido siálico en sus apolipoproteínas que se desconocen en gran medida. Respecto a la carga eléctrica de las lipoproteínas, sí hay estudios sobre la LDL electronegativa, pero no tienen en cuenta el resto de LDL ni las demás lipoproteínas, de las cuales ya se ha mencionado anteriormente que están involucradas en el metabolismo lipídico y asociadas al riesgo de sufrir ECV.

En los siguientes capítulos de la introducción se explicarán más en detalle las evidencias científicas que relacionan al estrés y la ansiedad (Capítulo IV) y al LES (Capítulo V), con el riesgo cardiovascular. Igualmente, se procederá a explicar cada una de estas “nuevas” propiedades de las lipoproteínas y su relación con la ECV (capítulo VI).

IV. ESTRÉS y ANSIEDAD

Hay patologías en las que aparentemente no hay una implicación directa de los lípidos y lipoproteínas, como pueden ser el estrés y la ansiedad, pero que predisponen a tener mayor riesgo cardiovascular a través de un perfil lipídico más aterogénico.

ESTRÉS

El estrés es un proceso natural que responde a la necesidad de adaptarnos al entorno que nos rodea, normalmente a situaciones que nos resultan amenazadoras o desafiantes [114, 115]. Esta respuesta resulta perjudicial si se prolonga en el tiempo o si es muy intenso, aunque no siempre es negativo, ya que puede presentar oportunidades para poner en marcha nuevos recursos personales, fortaleciendo así la autoestima e incrementando las posibilidades de éxito en el futuro.

Este estado da lugar a una reacción fisiológica como respuesta física ante determinados estímulos. Se pueden distinguir tres **fases del estrés** [116]:

- ♦ Fase de alarma: La respuesta inmediata que se produce frente a un estímulo de un agente estresante es la activación del sistema nervioso simpático (SNS) y el eje HPA (hipotálamo-pituitaria-adrenales). El SNS actúa sobre la médula adrenal haciendo que se segreguen catecolaminas. A los 30 – 60 minutos del estímulo, se inicia una serie de reacciones bioquímicas como la activación de receptores corticotrópicos para la producción del precursor de la ACTH (hormona adrenocorticotropa) y endorfina [117]. La **ACTH** provoca la secreción de **cortisol** (hormona catabólica) y dehidroepiandrosterona (DHEA) (anabólica) [114]. El grado de percepción y afectación del estrés depende del equilibrio entre ambas. Además de estas reacciones, también se produce hiperglucemia, aumento de la presión arterial e hipertrigliceridemia por lipólisis, características de un perfil aterogénico.

- ♦ Fase de adaptación o resistencia: En esta fase el organismo intenta equilibrar su homeostasis ante la permanencia del agente estresante, lo que requiere un gran esfuerzo metabólico.
- ♦ Fase de descompensación o agotamiento: Si el agente estresante continúa, puede haber un agotamiento a la hora de mantener la homeostasis y se entra en un estado de fatiga crónica.

El sistema nervioso simpático responde rápidamente a agentes estresantes, pero por otro lado, también regula otros sistemas como el cardiovascular, el respiratorio, el gastrointestinal y el renal [118]. Con lo cual, el sufrir estrés se ha relacionado con diferentes afecciones como pueden ser la obesidad [119], la ECV, la inflamación, la respuesta inmune... A continuación, se explicará más en detalle la relación entre el estrés y los factores de riesgo de ECV.

Estrés e inflamación

La respuesta inflamatoria se puede dar bien por una agresión externa bioquímica, como puede ser un agente infeccioso, o bien por una agresión psíquica como puede ser el estrés. Al producirse el estrés, se aumentan los niveles de los glucocorticoides, los cuales presentan un efecto antiinflamatorio [120–122] al inhibir la expresión de mediadores inflamatorios [123]. Por otro lado, se produce la **IL-6** (interleucina 6), entre otros, por los linfocitos y monocitos en estado de estrés. Esta IL-6 induce la síntesis de la **PCR** y ambas se asocian con el desarrollo de ECV.

Estrés y obesidad

Durante la situación de estrés se encuentran elevados los niveles de **cortisol** y éste mantiene en constante activación a la **LPL**, que liberará ácidos grasos de las lipoproteínas para la producción de energía en forma de **TG**. Estos TG se acumularán en los adipocitos, lo que se traduce en obesidad a largo plazo. Paralelamente, el cortisol también mantiene elevados los niveles de insulina, inhibiendo la lipólisis y así favorecer aún más la acumulación de grasa.

Estrés y arteriosclerosis

Hay evidencias de la implicación de muchos agentes estresantes, tanto físicos como psicológicos, en el desarrollo de la arteriosclerosis [124, 125]. Por un lado, la formación de **placas de ateroma** es la cumbre de un largo proceso inflamatorio, el cual puede verse favorecido tras la exposición a un agente estresante como se ha mencionado anteriormente. A esto hay que añadir que la síntesis de **PCR** se encuentra inducida por la IL-6 durante el estrés. Un desequilibrio en la secreción de citoquinas y un aumento del estrés oxidativo son las causas de la aceleración de la formación de placas de ateroma que, junto con un aumento de la **presión arterial** producida también por el estrés, se traduce en una mayor progresión de ECV. Además, la **migración** de las células de músculo liso, necesaria para la formación de las placas, también se ve aumentada en situaciones de estrés, ya que responsables de la quimiotaxis que tiene lugar, como el TNF- α y la IL-1, se encuentran aumentados. Por otro lado, en situaciones de estrés agudo se puede provocar hemoconcentración intravascular aguda debido al descenso del volumen plasmático, que se traduce en un aumento en la concentración de células sanguíneas, proteínas plasmáticas y lipoproteínas [126]. El aumento de estas lipoproteínas se debe a la imposibilidad de éstas de cruzar pasivamente la pared vascular y con ello se observa un **perfil lipídico más perjudicial**, concretamente con niveles superiores de colesterol total, LDLc y HDLc [108].

Hay que añadir que el cortisol regula genes que codifican para los receptores de las lipoproteínas y enzimas del metabolismo [127], y que las catecolaminas tienen efectos sobre la función de las plaquetas, como por ejemplo, su agregación [128], lo cual repercute posteriormente en la ECV.

Debido a que, como se mencionó en el capítulo I de la introducción, la formación de las placas de ateroma se debe principalmente a la acumulación de lípidos en la pared arterial, y que el cortisol, como agente regulador del estrés, tiene una estructura química similar a los lípidos, es interesante estudiar si existe relación entre los lípidos y el estrés. Concretamente, hay

artículos que ya han descrito una relación entre los niveles de cortisol y un el perfil más aterogénico en situación de estrés académico, es decir, el debido al proceso de exámenes [129, 130], pero hasta la fecha no hay evidencias que lo relacionen con un estudio más avanzado de las lipoproteínas que incluya, por ejemplo, el perfil de lipoproteínas medido por RMN (Resonancia Magnética Nuclear) o la carga eléctrica.

ANSIEDAD

Es el estrés que continúa después de que el factor estresante haya desaparecido, es decir, el estado anímico como consecuencia de la activación del sistema nervioso ante una señal de alarma. Su prevalencia en España es del 6,2 %, siendo más frecuente en las mujeres [131].

La ansiedad puede ser generalizada, social... y entre los trastornos más comunes se encuentran fobias, estados de pánico, trastornos obsesivos-compulsivos, etc. Como en el caso del estrés, la ansiedad a partir de una cierta intensidad o prolongada en el tiempo puede ser perjudicial y pudiendo aumentar el riesgo cardiovascular.

Ansiedad y arteriosclerosis

La relación entre ansiedad y ECV no está tan clara como la existente entre otros trastornos mentales, como la depresión, y la ECV, llegándose a considerar la depresión como factor de riesgo cardiovascular [132]. Sin embargo en un meta-análisis la ansiedad se relaciona con un mayor riesgo de ECV; concretamente con un 26 % más de riesgo [111]. También, en el mismo estudio se llega a considerar a la ansiedad como un nuevo factor de riesgo, independiente al efecto de la depresión, que se asocia a un aumento del 48 % de la mortalidad cardíaca, infarto de miocardio [133] e incidencia de ECV [111]. En otro estudio relacionan la ansiedad con la arteriosclerosis mediante la progresión de la cIMT. Lo que observan es que hombres con un mayor grado de ansiedad presentan un incremento de cIMT y de riesgo de presencia de placas ateroscleróticas [134].

El incremento de riesgo debido a la ansiedad podría explicarse por la presencia incrementada de **VLDL y TG** [135]. Además, los resultados obtenidos por Huang *et al.* sugieren que los valores de **HDLc**, así como los **ratios** de **colesterol total** y **LDLc** con el HDLc podrían ser marcadores de ansiedad y mejores predictores que el colesterol total [110].

Tanto en el caso del estrés como en el de la ansiedad se produce una **hiperactivación del SNS**, la cual puede causar daño a nivel del endotelio y, por consiguiente, favorecer la arteriosclerosis subclínica [136]. A esto hay que sumarle el hecho de que niveles elevados de noradrenalina, neurotransmisor implicado en la ansiedad y el estrés, se asocian con mayores niveles de colesterol total y LDLc [107]. Hay evidencias de que factores psicológicos y comportamentales (estrés, ansiedad, depresión...) se asocian con una disminución en el control autonómico del corazón, lo que induce una mayor variabilidad en la presión arterial debida a efectos en el endotelio y formación de placas de ateroma [137]. Estos factores también pueden afectar al estilo de vida, predominando un patrón más perjudicial caracterizado por menor actividad física, mayor consumo de tabaco y hábitos dietéticos menos saludables, lo que se traduce en un perfil lipídico más aterogénico [138–140].

Por otro lado, hay estudios que relacionan estos dos estados, estrés y ansiedad, con un perfil lipídico más perjudicial, pero no existen estudios en los que se haya estudiado en profundidad esta relación con las diferentes lipoproteínas y sus propiedades.

V. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, sistémica, crónica e inflamatoria que se caracteriza por un conjunto de manifestaciones clínicas asociadas a la presencia de auto-anticuerpos. El lupus afecta principalmente a mujeres en **edad** fértil [141], aunque se puede manifestar a cualquier edad. Sobre ella influyen la **etnia**, siendo más frecuente en etnias africanas, hispanas y asiáticas, y menos en caucásicas [142] y la predisposición genética [143]. Hay una gran variabilidad en sus manifestaciones clínicas y se manifiesta de manera fluctuante, alternando períodos de inactividad (remisión) y períodos de mayor actividad (exacerbación o brote), los cuales son difíciles de controlar.

Hasta la primera mitad del siglo XX, el lupus se consideraba una enfermedad progresiva terminal [144] con una esperanza de vida de, aproximadamente, 3 años desde las primeras manifestaciones de la enfermedad [145]. Las muertes se producían por infecciones y complicaciones renales [146]. Una vez introducido el uso de esteroides e inmunosupresores, la supervivencia de los enfermos de lupus mejora, dando lugar a casos crónicos. En las últimas décadas, la incidencia de lupus se ha visto triplicada debido a mejoras en el diagnóstico.

La incidencia y la prevalencia del LES varía en función del área geográfica y la etnia. En España, según el estudio EPISER de la Sociedad Española de Reumatología, la **incidencia** es de 2/100000 habitantes por año [147] y la **prevalencia** de 34 – 91 por cada 100000, una de las más altas de Europa [141]. Sin embargo, el LES afecta a mujeres en el 90 % de los casos [148], pudiendo llegar a ser el ratio 12:1 en mujeres en edad fértil [149].

Las observaciones del incremento de la prevalencia sugieren que **factores hormonales** juegan un papel importante en la patogenia del LES; concretamente se le ha atribuido al efecto hormonal del estrógeno [150, 151]. En situaciones de alteración hormonal, como puede ser el uso de anticonceptivos orales [152, 153], una

menstruación prematura o la sustitución hormonal durante la menopausia, las mujeres presentan mayor riesgo de padecer LES [150, 154].

En cuanto a los **factores hereditarios**, el 27 % de los hijos de madres con lupus presentan anticuerpos antinucleares [155]. Además, se han identificado diversos polimorfismos genéticos que predisponen a padecer LES [156–159].

También, existen **factores ambientales** que podrían desencadenar un cuadro clínico de lupus a través de sus efectos sobre el sistema inmune. Algunos de estos factores pueden ser el tabaquismo [160], las infecciones [161], la exposición a radiación ultravioleta [162] o la ingesta de fármacos [163].

A pesar del mayor conocimiento de la enfermedad y de los factores que puedan contribuir a su desarrollo, la mortalidad es tres veces superior a la de la población general de igual sexo y edad y es debida a la ECV [164, 165].

Se sabe que la actividad de la enfermedad a lo largo del tiempo es un predictor importante de mortalidad y se relaciona con el daño presentado. Tanto la medida de la actividad como la del daño producido es importante y para ello hay varios índices válidos, fiables y comparables [166]. El **SLEDAI** (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) es el más fácil de utilizar para la medida de la actividad. Por otro lado, hay un consenso internacional para determinar el daño producido: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology* (**SLICC/ACR**) *Damage index* [167, 168].

Diagnóstico del LES

Debido a que el LES es una enfermedad multifactorial y al amplio espectro de sus manifestaciones clínicas, no hay pruebas de laboratorio o cuadro clínico específico para su diagnóstico. El diagnóstico del lupus se basa en unos **criterios de clasificación** que se establecieron en 1982 por el *American College of Rheumatology* y que se revisaron en 1997 [169] (ver ANEXO I).

Posteriormente, se presentaron unos criterios de clasificación, **SLICC 2012**, que definen mejor algunas características clínicas, da más valor a alteraciones hematológicas y establece que se han de cumplir criterios tanto clínicos como inmunológicos [170]. Gracias a la aplicación de los nuevos criterios de clasificación, se puede realizar un diagnóstico más precoz y sensible; en cambio, se pierde en especificidad, de ahí que se sigan utilizando los criterios de 1997 [169].

Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas varían entre individuos, al igual que con la edad, género y etnia. Las más frecuentes son de carácter general y articular, hematológicas [171], cardiopulmonares, cutáneas, renales [171, 172], neuropsiquiátricas [172], oculares [172] y vasculares; pero las que presentan una mayor mortalidad son las renales y las cardiovasculares.

Las manifestaciones renales dan lugar a la **nefropatía lúpica**. Suele ser grave y reduce la supervivencia de aquellos pacientes con LES que la padecen, en torno al 60 % [173].

Las manifestaciones cardiovasculares, sus causas y sus consecuencias se explicarán a continuación.

LES y arteriosclerosis

Los enfermos de lupus presentan una alta mortalidad cardiovascular [164, 174–177], ya que el riesgo de ACV es 7 veces mayor en pacientes con LES que en la población general [178]. Además, tienen un incremento de riesgo cardiovascular incluso teniendo en cuenta los factores de riesgo de Framingham [179].

La prevalencia de la ECV en el lupus incrementa en función de la edad y la duración de la enfermedad [164, 180, 181]. Dicho incremento puede consistir en tener un riesgo de padecer arteriosclerosis acelerada seis veces mayor que en la población general, llegando a ser el infarto de miocardio hasta ser 50 veces mayor en mujeres de 35 – 44 años [72]. Este hecho es sorprendente, ya que la arteriosclerosis aumenta con la edad en

la población general, y son precisamente las mujeres jóvenes el grupo más protegido contra ésta gracias al efecto protector de los estrógenos [182]. Por otro lado, en grupos de mayor edad, el riesgo entre pacientes con LES y controles no presenta diferencias significativas [183].

La patogénesis de la ECV prematura en el lupus probablemente es debida al origen multifactorial de la enfermedad, y como resultado se presentan diversas manifestaciones clínicas como la artritis, la trombosis o la embolia; y subclínicas como la arteriosclerosis [184].

En cuanto a la arteriosclerosis, se observa moderada o severa en el 52 % de las autopsias que se han llevado a cabo en pacientes con lupus [176, 185, 186]. También, se ha detectado una prevalencia de arteriosclerosis subclínica un 40 % superior en LES que en la población general [112, 187]. Además, entre un 40 % [187] y un 54 % de las mujeres con lupus presentan placa aterosclerótica, estando calcificada en un 76 % [188]. La prevalencia se reparte según la edad, siendo un 21 % en menores de 35 años y un 100 % en mayores de 65 [187, 188]. Paradójicamente, las mujeres jóvenes, son las que tienen mayor riesgo de ECV en el LES. No es sólo que la arteriosclerosis sea más frecuente, sino que está más acelerada, progresando $0,011 \pm 0,030$ mm al año [189], de ahí la importancia de estudiar nuevos posibles factores de riesgo cardiovascular que se vean incrementados en esta patología.

Factores de riesgo cardiovascular en LES

El origen de la arteriosclerosis en el lupus es multifactorial. Observaciones clínicas epidemiológicas sugieren que tanto los factores de riesgo convencionales como los no convencionales, así como la interacción entre ambos, promueven la arteriosclerosis acelerada en el LES. En la Tabla 1 se muestran los principales factores de riesgo.

Tabla 1. Factores convencionales y no convencionales de riesgo cardiovascular en LES.

Convencionales	No convencionales
Sedentarismo	LDL oxidada
Historia de ECV	Anticuerpos antifosfolípidos
Tabaquismo	Sistema del complemento [190]
Diabetes <i>mellitus</i>	Tratamiento lupus
Obesidad	Marcadores inflamatorios
Síndrome metabólico	Enfermedad renal
Hipertensión arterial	Diámetro lipoproteínas [191]
Dislipemia lúpica	Nº partículas lipoproteínas [191]

ECV: enfermedad cardiovascular; LDL: *low-density lipoprotein* o lipoproteína de baja densidad.

Extraída y adaptada de Sinicato *et al.* [192].

Factores de riesgo convencionales

Los factores de riesgo convencionales descritos para la arteriosclerosis difieren de los que se dan en la arteriosclerosis acelerada del lupus.

Para comenzar, ni la **edad** ni el **género** masculino son factores de riesgo en el lupus, ya que el 90 % de los casos de LES son mujeres [148] y son las jóvenes las que presentan un mayor riesgo ateroesclerótico [72].

Además, hay cierta controversia sobre la prevalencia de otros factores de riesgo convencionales. Hay estudios con alta prevalencia de éstos, pero habría que tener en cuenta su asociación con la etnia de los individuos [193, 194]. Algunos proponen al tabaquismo como el principal factor de riesgo en LES [195, 196]; en cambio, otros proponen al síndrome metabólico [197–199] o a la hipertensión [174].

Por otro lado, la **dislipemia lúpica**, caracterizada por niveles plasmáticos de TG y VLDL elevados y de HDLc disminuidos [200, 201], está ampliamente aceptada como factor de riesgo, pero los mecanismos por los que se produce no se conocen bien y hay diversas interpretaciones. Se ha observado que los TG están

elevados incluso en pacientes que no están en tratamiento con corticoesteroides (asociados a su incremento), e incluso se encuentran más aumentados en estados de brote [202]. Respecto a las HDL, se presentan cambios tanto cuantitativos como cualitativos, consistentes en la presencia de HDL disfuncionales cuyas capacidades antiinflamatoria y antioxidante se han perdido [203–205] en el 40 % de los pacientes con LES. Además, la composición lipoproteica es importante para estas funciones, ya que pueden promover daño en el endotelio [204] y provocar una disminución en la adhesión endotelial [206, 207].

Todos estos parámetros no explican por sí solos el incremento de riesgo de los pacientes con lupus, ya que siguen presentando dicho incremento después de ajustar por los factores de riesgo de Framingham [179]. Este hecho puede ser explicado debido a las limitaciones en el uso de estos factores teniendo en cuenta que la mayoría de pacientes son mujeres jóvenes y en Framingham el peso de la edad y el hecho de ser hombre es muy importante.

Factores de riesgo no convencionales

Teniendo en cuenta tanto que el lupus se considera un factor de riesgo de arteriosclerosis independiente [113, 179, 184, 208] como que únicamente los factores de riesgo convencionales no explican el riesgo de arteriosclerosis acelerada en estos pacientes, se sugiere que hay otros factores relacionados con la fisiopatología del LES a tener en cuenta (Tabla 1). Un aspecto importante que destacar es que todos estos factores intervienen en los cambios que se producen en el perfil lipídico.

Como es bien sabido, el LES es una enfermedad inflamatoria crónica y, como se explicó anteriormente (capítulo III de esta introducción), la **inflamación** es un factor de riesgo aterosclerótico. Además, la presencia de células inmunes activadas, como los macrófagos, es típica de inflamación sistémica [209, 210] y de lesiones ateroscleróticas [85]. Como resultado de la inflamación, se liberan mediadores inflamatorios relacionados con la ECV [211] e incrementados en LES [212, 213]. Algunos de estos marcadores se asocian con características

de la dislipemia lúpica como el TNF α que se asocia a bajos niveles de HDLc y altos de TG [214, 215]. Respecto a la PCR, se ha asociado con la presencia de placa aterosclerótica [187] y con valores elevados de cIMT [216]. Por otro lado, citoquinas [217], otros mediadores de la inflamación [218–220], o factores coagulantes [112, 197, 221] parece que jueguen un papel importante en la arteriosclerosis del LES, pero los resultados no son del todo concluyentes [194].

Al estado de inflamación hay que añadir la producción de **anticuerpos** debido a la respuesta autoinmune que tiene lugar en los pacientes con LES. La participación de estos anticuerpos en la arteriosclerosis subclínica está ampliamente estudiada [222–225] y se sabe que causan lesiones en el endotelio y alteran el metabolismo de las lipoproteínas. Por ejemplo, los anticuerpos anti β_2 glicoproteína 1 o Apo H inducen el incremento de las LDL oxidadas (oxLDL). El incremento de éstas podría promover la formación de anticuerpos anti-oxLDL [226, 227], cuyos niveles son bajos al inicio del proceso aterosclerótico y altos en estados posteriores [228] En cambio, hay controversia en cuanto al papel que juegan, ya que un tipo de anticuerpo tiene un papel protector mientras que otro es aterogénico [229].

A continuación, por la acción autoinmunitaria de los anticuerpos, se forman complejos inmunes que activan al **sistema del complemento**, siendo comunes los desequilibrios en los mecanismos del sistema del complemento en el LES, los cuales también pueden contribuir al desarrollo de ECV [230].

Por último, otro factor de riesgo no convencional para la arteriosclerosis en el lupus es el uso de **corticoesteroides**, ya que se asocian a disfunción endotelial [231], presencia de placa [187], riesgo aterosclerótico [232], mortalidad [72, 174, 187, 227, 232–234] e incremento de los TG y las VLDL [235]. Este efecto perjudicial se ha observado en pacientes con dosis altas y con tiempos prolongados de tratamiento. En cambio, dosis bajas pueden ser protectoras [234].

Otro tipo de tratamiento utilizado en el lupus son los **antipalúdicos**, que mejoran el perfil lipídico disminuyendo el colesterol total [233], LDLc y TG, y aumentando el HDLc, sobre todo si se toman conjuntamente con los corticoesteroides [236]. Además, su uso se asocia negativamente con la placa de ateroma [208] y con una menor mortalidad.

A pesar del conocimiento de los factores de riesgo tradicionales y los estudios con algunos factores de riesgo no convencionales, los pacientes con lupus siguen presentando arteriosclerosis acelerada. Esto nos lleva a la búsqueda de nuevos factores de riesgo como podría ser la carga eléctrica de las lipoproteínas (capítulo VI de la introducción).

VI. NUEVAS PROPIEDADES DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Las **lipoproteínas** plasmáticas son el principal transportador de lípidos, distribuyéndolos a todos los tejidos y órganos, donde se pueden modificar, almacenar o utilizar como fuente de energía (capítulo II de la introducción). Están compuestas por una capa externa, formada por fracciones proteicas (**apolipoproteínas o apoproteínas (Apo)**) y lípidos polares como el colesterol (Chol) no esterificado y los fosfolípidos (PL); y un núcleo interno apolar de triglicéridos (TG) y ésteres de colesterol (Figura 7). En definitiva, presentan estructura de pseudomicela con una parte externa polar, que es la que está en contacto con el medio acuoso, y un corazón hidrofóbico.

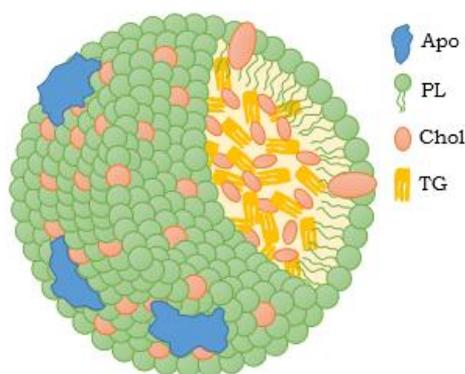


Figura 7. Estructura y componentes principales de las lipoproteínas.

Son un grupo altamente heterogéneo de partículas que difieren en diversas características como pueden ser la composición lipídica y proteica, el diámetro, el número de partículas, la carga eléctrica, la función fisiológica y la unión de otras moléculas como el lipopolisacárido (LPS), entre otras. Además, durante su trascurso por el torrente sanguíneo, pueden intercambiar componentes, lo que hace que estas características cambien.

Se conocen cinco lipoproteínas diferentes, los quilomicrones (QM), únicamente presentes en estados post-absortivos, y las presentes en un estado de ayuno normal y que se denominan según la densidad que presentan: de muy baja densidad o VLDL (*very low-density lipoprotein*), de densidad intermedia o IDL (*intermediate-density lipoprotein*), de baja densidad o LDL (*low-density lipoprotein*) y de alta densidad o HDL (*high-density lipoprotein*). Para más información sobre las lipoproteínas y apolipoproteínas ver ANEXO II.

La relación existente entre las lipoproteínas y la arteriosclerosis está bien establecida y, debido a que la ECV es la principal causa de muerte mundial según la OMS, es de vital importancia seguir investigando sobre los distintos factores de riesgo y mecanismos de protección y prevención de la enfermedad.

Durante muchos años se ha centrado la atención en el estudio de LDLc y HDLc, pero sigue habiendo un número muy significativo, aproximadamente un 40 %, de los infartos de miocardio en individuos con un perfil lipídico normal con niveles de TG < 150 mg/dl, LDLc < 115 mg/dl y HDLc > 40 mg/dl en hombres y > 45 mg/dl en mujeres [1, 5, 237, 238].

Además, las lipoproteínas y sus apolipoproteínas pueden sufrir alteraciones que afecten a su estructura, funcionalidad, composición y concentración en sangre. Estos cambios se pueden traducir en una menor o mayor afinidad por sus receptores u otras moléculas, lo que afecta al tiempo que permanecen en circulación permitiendo que sufran modificaciones que aumenten su capacidad para acumularse en la pared arterial y para desencadenar una respuesta inmune mayor. Esto aumenta su aterogenicidad, facilitando el desarrollo de la arteriosclerosis y con ello una complicación cardiovascular mayor. Debido a esto, es importante explorar distintas propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas como pueden ser el **diámetro** y **número de partículas**, la **carga eléctrica**, el contenido de las distintas **glicofomas de Apo CIII** o la cantidad de **LPS** que se encuentra unido a las lipoproteínas, para intentar darle explicación al **riesgo residual**.

Diámetro y número de partículas

Hay situaciones en las que el LDLc es un pobre predictor del riesgo cardiovascular, y determinar el perfil lipoproteico mediante **resonancia magnética nuclear (RMN)**, consistente en diámetro y número de partículas, ayuda a predecir el riesgo de ECV [190, 191, 239–241].

Diámetro

El diámetro de las lipoproteínas es una propiedad que puede ayudar a iniciar el proceso aterosclerótico, ya que puede facilitar la retención de las lipoproteínas en el endotelio, concretamente de las lipoproteínas pequeñas [242–247] a excepción de las **VLDL**, que cuanto más **grandes** más aterógenas [240, 248]. A diferencia del efecto directo del diámetro de las LDL con la arteriosclerosis, las VLDL grandes son más aterógenas debido a que su metabolismo genera sdLDL y son éstas las que presentan dicho efecto aterogénico directo. Hay estudios en los que se han observado distintas distribuciones de lipoproteínas según el género, incluso en estados no patológicos, presentando las mujeres **HDL** y **LDL** más **grandes** que los hombres [249–251], lo que corresponde a un perfil más beneficioso.

Debido al protagonismo que siempre se le ha dado a la LDL como factor de riesgo cardiovascular, ha sido objeto de numerosas investigaciones. La mayoría de los estudios relacionan las **LDL pequeñas** [242–247] con un mayor poder aterogénico, aunque hay otros en los que no se observa esta relación [252–254]. También hay evidencias de que en algunos casos las **LDL grandes** tienen un papel aterogénico [255–258]; por ejemplo, en algunos pacientes con enfermedad coronaria predomina la LDL grande frente a otras subclases [256]. Por otro lado, en hombres sanos se ha observado que la LDL grande es un determinante independiente de la cIMT [257] y en el estudio MESA, se correlaciona con la cIMT de igual forma que las LDL pequeñas, aunque las pequeñas son más aterogénicas [258]. La divergencia que presentan estos resultados puede explicarse debido a que en casos en los cuales los niveles de TG son bajos, la LDL grande puede ser un factor predictivo del riesgo coronario [259].

En el caso de las HDL, las **HDL pequeñas** presentes en la dislipemia aterógena muestran modificaciones cualitativas respecto a las grandes, pudiendo perder sus funciones antiaterogénicas (flujo reverso de colesterol y actividades antioxidante y antiinflamatoria) y convirtiéndose en HDL disfuncionales [260]. Sin embargo, hay controversia a la hora de confirmar la implicación del diámetro de las HDL como factor predictivo de la ECV [261]. Por un lado, hay estudios que asocian, de forma independiente al HDLc y a las HDL pequeñas con ECV y mayor cIMT [262–265] y a las **HDL grandes** con una mayor capacidad antiaterosclerótica [80, 241, 266–272]. Por otro lado, algunos autores han descrito una asociación positiva de las HDL pequeñas con factores inhibidores de la arteriosclerosis [273, 274]; en cambio, otros no discriminan según el diámetro las partículas aterogénicas y las antiaterogénicas [275, 276].

Número de partículas

Otra propiedad muy relacionada con el riesgo de ECV, y con el diámetro de las lipoproteínas, es el número de partículas determinado por RMN o por los niveles de Apo B en el caso de las LDL, ya que, debido a su tamaño, en una partícula de LDL sólo se encuentra una molécula de Apo B. Por ejemplo, Sniderman *et al.* concluyen que la Apo B es un marcador de riesgo cardiovascular más potente que el LDLc y el no-HDLc [277].

Hay estudios en los cuales no se observa la capacidad aterogénica de las LDL pequeñas, pero sí describen al número de partículas totales como mejor predictor de riesgo cardiovascular, bien se refieran a partículas totales de LDL (LDL-P) [258, 278–281] o a HDL-P (partículas totales de HDL) [282]; de hecho, hay casos en los que el 70 % de las diferencias interindividuales son debidas al número de partículas y no al diámetro de éstas [283]. Además, la acumulación de lípidos en la pared arterial, punto crítico del inicio de la arteriosclerosis, se encuentra directamente relacionada con la cantidad de lipoproteínas circulantes, es decir, con el número de partículas [284].

Respecto al diámetro y al número de partículas, en 2003, se introdujo el concepto de **análisis de discordancia** en un análisis del *Quebec Cardiovascular Study* [285] basado en la comparación de factores de riesgo cuando sus predicciones difieren en lugar de ser las mismas. El análisis de discordancia se puede aplicar en casos en los que alto contenido de LDLc no se corresponde a un alto número de LDL-P, y viceversa, lo que indica que puede haber riesgo de ECV debido a las LDL-P pequeñas que queda enmascarado bajo una aparente normalidad de LDLc [286].

Carga eléctrica

Otra propiedad que poseen las lipoproteínas, y que es interesante estudiar respecto al riesgo arteriosclerótico, es la carga eléctrica, debido a que la mayor parte de las interacciones a nivel molecular son electroestáticas. Esta carga eléctrica afecta al metabolismo lipídico al controlar las interacciones con enzimas [287–289] y con moléculas de la superficie celular [290–292], por lo que modificaciones en la carga de las lipoproteínas afectan a las rutas metabólicas de almacenamiento de colesterol y metabolismo de TG [40].

Desde hace más de 50 años, las lipoproteínas son consideradas como moléculas cargadas eléctricamente [293]. Pocos años después se desarrollaron técnicas que permitían separar e identificar distintos patrones electroforéticos [294]; incluso, se estableció una clasificación de desórdenes lipídicos basada en las anomalías del perfil electroforético que se presentaba [295].

Todas las lipoproteínas presentan carga eléctrica neta **negativa**, siendo la HDL la más electronegativa, seguida de la VLDL y LDL [296]. Dicha carga es determinada por los constituyentes lipídicos y apolipoproteínas de cada lipoproteína [297]; concretamente, se han asociado a la carga eléctrica de las lipoproteínas cambios en los niveles de colesterol libre [298–300] y esterificado [300, 301], ácidos grasos no esterificados (NEFAs) [300], TG [298–300, 302–311], PL [300, 304] y apolipoproteínas [299–301, 303, 304, 306–314], en cuyo caso no sólo afectan sus niveles, sino también la conformación que adopten [296, 297, 315].

Debido a la asociación de la carga eléctrica y los constituyentes lipoproteicos, hay estudios que relacionan la electronegatividad de las lipoproteínas con el riesgo de ECV. Un aspecto a destacar es la casi exclusividad de los trabajos publicados en estudiar la electronegatividad de las LDL, habiendo muy pocos artículos referentes a la VLDL [303] y HDL [316–318]; ni que decir que hasta la fecha no hay ningún estudio que determine la carga eléctrica en las IDL. En general, el poseer una carga eléctrica más negativa se asocia con un mayor riesgo cardiovascular.

Carga eléctrica de la VLDL

En primer lugar, respecto a la **VLDL**, se ha observado que la V5 (subfracción de VLDL más electronegativa) se encuentra casi 3 veces incrementada en pacientes con síndrome metabólico y no es sólo debido a que éstos presentan una mayor cantidad total de VLDL, sino que la proporción de la V5 respecto a las demás también es mayor. La V5 de estos pacientes presenta menor Apo B100 y mayor Apo E y C; además, se correlaciona con los TG y con el colesterol total. Por otro lado, experimentos *in vitro* demostraron que la V5 induce apoptosis y estrés oxidativo en células humanas del endotelio arterial y que esta inducción se ve reducida conforme disminuye la electronegatividad de las VLDL. Por último, la internalización de la V5 por estas células mediante el VLDLR es más rápida que la de las otras subfracciones de VLDL cuya carga es menos negativa [303].

Carga eléctrica de la HDL

En segundo lugar, se referencia a la carga eléctrica de la **HDL**. Hay estudios que muestran que la carga eléctrica de las HDL es un factor determinante para la correcta actividad de la LCAT [316], de la CETP y de la PLTP [317–319] y para el proceso de transferencia de lípidos entre lipoproteínas, lo cual puede repercutir en gran medida en el metabolismo lipídico al tener estas enzimas papeles clave en éste (capítulo II de la introducción). Además, el eflujo de colesterol también se ve afectado por la electronegatividad, siendo menor la efectividad de las H5 en este proceso [316]. Como se mencionó anteriormente, la carga eléctrica de las lipoproteínas puede variar en función de

los componentes de éstas; concretamente, en las HDL se ha visto que el mayor determinante de su carga eléctrica es el núcleo de lípidos neutros debido a cambios conformacionales que genera en la Apo AI, bien por las interacciones que tienen lugar entre la Apo AI y los lípidos neutros o por el cambio global de la partícula de HDL de una forma más discoidal a una más esférica. Además, se han observado modificaciones en el contenido de Apo AI, CIII y E, colesterol libre y TG [297, 316, 318].

Carga eléctrica de la LDL

Por último, respecto a la electronegatividad de la **LDL**, se le ha llegado a considerar como un nuevo índice para predecir la ECV [312, 320]. La LDL con mayor carga negativa (L5) al igual que la VLDL, también se encuentra elevada en pacientes con riesgo cardiovascular y se asocia de manera dosis-dependiente con mayores niveles de PCR [321]. La L5 se caracteriza por presentar una mayor afinidad hacia los proteoglicanos [314, 322] y por incrementar la capacidad de agregación de las LDL, lo que se asocia con un incremento del riesgo cardiovascular [314, 323]. Además, induce inflamación [304], disfunción endotelial [324], activación plaquetaria [325], producción de citoquinas [326–328] y apoptosis en células endoteliales a través de los receptores PAFR (*platelet-activating factor receptor*) [327] y LOX-1 (*lectin-like oxLDL receptor-1*) [329], lo que contribuye a la progresión de la arteriosclerosis.

Respecto a su composición, Avogaro observa un incremento en los niveles de colesterol libre y PL [330], pero por otro lado, otros investigadores no sólo no observan esto, sino que ven niveles incrementados de TG y NEFAs [302, 306, 311, 326, 331]; estas diferencias pueden ser debidas al tipo de sujetos que se estudia. El contenido en apolipoproteínas también se ve modificado; mientras la LDL con menor carga negativa tiene en su totalidad Apo B100, la L5, además de la Apo B100, en ocasiones mal plegada favoreciendo la agregación [332], tiene Apo E, AI, AII, CIII, D, F J y Lp-PLA₂ (fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas) [300, 311]. Por otro lado, la LDL electronegativa presenta actividad esfingomielinasa, la cual hidroliza la esfingomielina

dando lugar a ceramida y fosfolina. La acumulación de los productos de dicha actividad se asocia a un estado mayor de inflamación y agregación de lipoproteínas [333]. Como se ha demostrado mediante las evidencias mencionadas, la LDL con mayor carga eléctrica negativa tiene un papel aterogénico ampliamente demostrado pudiéndose considerar la carga eléctrica como un nuevo factor de riesgo a estudiar.

Finalmente, otro aspecto a tener en cuenta sobre la carga eléctrica es que prácticamente en todos los estudios no se cuantifican los valores de dicha carga, sino que se separan las lipoproteínas en diferentes grupos en función de su electronegatividad, V1 – V5, L1 – L5 y H1 – H3 o H1 – H5, siendo la V5, L5 y H3 o H5 las más electronegativas y las que se encuentran en menor proporción. El hecho de no cuantificar estas subfracciones lipoproteicas hace imposible la comparación de sus efectos observados por distintos investigadores, ya que no tienen por qué tener la misma carga.

Glicoformas de Apo CIII

Por un lado, el efecto aterogénico de los TG se describió por primera vez en 1979 [334] recogiendo en diversos estudios su papel como factor de riesgo de ECV independiente [105, 335–337]. Por otro lado, la Apo CIII es un regulador clave de los niveles plasmáticos de TG y se asocia con la hipertrigliceridemia [338] fuertemente, por lo que teniendo en cuenta estas dos afirmaciones, es importante el estudio de la Apo CIII en relación al riesgo cardiovascular.

La Apo CIII regula los niveles de TG a través de 4 mecanismos:

- ◆ Inhibición de la lipólisis de los TG por inhibición no competitiva de la LPL [12].
- ◆ Inhibición de la eliminación de lipoproteínas que contienen Apo B al interferir en la unión de éstas con los receptores hepáticos de Apo B y E [339–341].
- ◆ Inhibición de la HL [342].
- ◆ Estimulación de la síntesis de VLDL más grandes relacionada con la inhibición de la degradación de Apo B

mediada por proteosoma, la cual resulta en un incremento de Apo B [343].

Además del efecto de la Apo CIII sobre los niveles de TG, también está implicada en otros procesos que ayudan a desencadenar la arteriosclerosis. Uno de ellos es que atenúa el efecto protector de las HDL, ya que su presencia hace que se induzca un mayor riesgo cardiovascular [344] al alterar la función de las HDL y estimular, en vez de bloquear, rutas potencialmente proapoptóticas [345]. Otro es que tiene un papel regulador del estado proinflamatorio, ya que promueve la adhesión de monocitos a la superficie de las células endoteliales [346–348]. También parece estar implicada en la formación de sdLDL [340].

Referente a estudios genéticos, se ha visto que mutaciones de pérdida de función en el gen de la Apo CIII se asocian a una reducción del riesgo cardiovascular [338, 349, 350]. Además, la Apo CIII se puede considerar como un factor de riesgo independiente, especialmente cuando se encuentra en lipoproteínas que contienen Apo B [351, 352]. Sin embargo, su papel en el metabolismo lipídico, así como en el progreso de la arteriosclerosis, puede verse afectado dependiendo de las glicofomas de Apo CIII que se encuentren en mayor proporción.

La Apo CIII, al igual que todas las demás proteínas, puede sufrir modificaciones post-traduccionales, dando lugar a diferentes glicofomas. Las más comunes difieren en el contenido de **ácido siálico** que presentan, cero (**Apo CIII-0**), una (**Apo CIII-1**), o dos moléculas (**Apo CIII-2**) [353, 354]. La proporción en la que se encuentra cada una de estas glicofomas difiere entre ellas, siendo la más abundante la Apo CIII-1 y menos la Apo CIII-0 [355, 356]. La relevancia de la sialización de la Apo CIII depende de la presencia relativa de cada glicofoma. En base a diversos estudios, parece que la adición de ácido siálico se relaciona con el control del metabolismo. Por ejemplo, en situaciones de pérdida de peso se ve reducido el ratio Apo CIII-1/Apo CIII-2 [357]; sin embargo, un incremento de Apo CIII-0 se relaciona con el consumo de carbohidratos [358] y una reducción de Apo CIII-2 con síndrome metabólico [359]. Además, un bajo contenido de

ácido siálico se relaciona con la hiperlipidemia familiar combinada [360] y con un mayor efecto inhibitorio en la eliminación de las TRL [361].

A pesar de que la importancia del estudio de las glicofomas de Apo CIII sí está bien clara, ya que dependiendo del contenido de ácido siálico que presente, se comporta de distinta manera, pudiendo ser perjudicial o bien tener un efecto protector frente a patologías metabólicas y arteriosclerosis, el hándicap de los escasos trabajos científicos disponibles es que la mayoría determinan las formas sializadas de Apo CIII en plasma, no suelen diferenciar en qué lipoproteína se encuentran, y si lo hacen no las determinan en todas ellas, algo importante a tener en cuenta. Esta falta de estudios, sumada a la importancia del estudio individualizado de las distintas lipoproteínas, nos lleva a tomar la decisión de determinar las formas sializadas de Apo CIII en cada una de ellas, además de en el plasma.

Lipopolisacárido (LPS)

El **lipopolisacárido (LPS)** es el componente principal de la membrana externa de la pared celular de las bacterias **Gram negativas** [362] y juega un papel importante en la patogenia de las infecciones por bacterias al ser una endotoxina, es decir, una toxina que se encuentra en la pared celular de estas bacterias y que es liberada tras la destrucción de dicha pared.

El LPS es una molécula compleja con dos partes bien diferenciadas; una hidrofílica y otra hidrofóbica. La **porción hidrofílica** se compone del **antígeno O** y de un núcleo de **polisacáridos**, con alta variabilidad estructural. Por otro lado, la **porción hidrofóbica** consta de un glucolípido denominado **lípidio A**; el cual se encuentra muy conservado entre especies y es el componente bioactivo del LPS responsable de sus propiedades patofisiológicas [363]. El lípidio A se compone de un disacárido de glucosamina esterificado en cuatro posiciones con ácidos grasos y con un grupo fosfato en las dos posiciones restantes. Dichos ácidos grasos son *3-hydroxy fatty acids* (**3-OH FAs**) y son considerados marcadores químicos de endotoxinas [364].

Respecto a su patogenicidad, el LPS es una potente endotoxina involucrada en la respuesta en fase aguda de las infecciones bacterianas e induce una respuesta inflamatoria sistémica mediada por una gran cantidad de citoquinas y una potente activación de macrófagos [365]. Hay que añadir que el LPS causa endotoxemia metabólica, caracterizada por concentraciones elevadas de LPS en circulación [366]. La endotoxemia metabólica desencadena un estado crónico de inflamación que incrementa potencialmente el riesgo de diabetes [367, 368], de enfermedad vascular [369] y de arteriosclerosis [370]. Este hecho se sustenta con la detección de concentraciones más altas de LPS en pacientes con factores de riesgo cardiovascular [371, 372]. Además, el LPS correlaciona positivamente con diferentes parámetros lipídicos como los TG [373], el colesterol total, el LDLc y el HDLc [374].

Ya en los años 80, un grupo de investigadores demostraron que el LPS se puede unir a las lipoproteínas en función de la concentración plasmática de lipoproteínas ricas en colesterol, que esta unión se da posiblemente entre el lípido A y fosfolípidos de las lipoproteínas, la cual es estable, y que la captación de los complejos LDL-LPS es mediante endocitosis a través del LDLR [375]. Esta unión puede darse directamente o mediante el ensamblaje de la proteína de unión a lipopolisacárido (LBP), la cual facilita la unión del LPS a los QM y HDL que se forman tras la digestión [18]. Hay que añadir que prácticamente todo el LPS presente en circulación se encuentra unido a lipoproteínas [376] y, con ayuda de proteínas transferidoras de lípidos como la PLTP [377], CETP, LCAT o LPL, su distribución en las distintas lipoproteínas puede variar.

Se postula que la unión de las lipoproteínas al LPS atenúa la respuesta inflamatoria de éste facilitando su neutralización y eliminación [378, 379], con lo cual sería un mecanismo de protección al disminuir su toxicidad [380, 381]. Sin embargo, las evidencias no coinciden en el tipo de lipoproteína que realiza este efecto, ya que en algunos casos esta función recae sobre la LDL, en otros sobre la HDL [382] y en otros se distribuye de manera uniforme entre todas las lipoproteínas [376]. Sumado a esta

discrepancia, Vergès *et al.* observaron diferencias significativas en cuanto a la concentración de LPS unido a cada lipoproteína al comparar pacientes con diabetes tipo 2 y un grupo control; sin embargo, no había diferencias en el contenido total de LPS en plasma [376].

Los resultados obtenidos hasta ahora presentan cierta controversia entre ellos. La variabilidad de estos resultados puede ser debida a la metodología utilizada en cada caso para la determinación del LPS, ya que no hay un método de referencia bien estandarizado para ello. Además, las técnicas utilizadas pueden no llegar a ser lo suficientemente sensibles en algunos casos, con lo cual estudios con una metodología robusta podrían ayudar a elucidar estas discrepancias.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Hipótesis y Objetivos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

HIPÓTESIS

Como se mencionó al inicio de esta tesis doctoral, todavía en la actualidad se suceden infartos de miocardio y aparición de arteriosclerosis en individuos que presentan un perfil lipídico, medido por métodos tradicionales de la rutina clínica, aparentemente normal.

Debido a esto, se plantea la necesidad de una búsqueda más exhaustiva de nuevos factores de riesgo cardiovascular, así como explorar nuevas propiedades de las lipoproteínas mediante métodos avanzados de análisis para intentar dar explicación a la presencia de enfermedad cardiovascular con perfiles lipídicos aparentemente normales. Con todo esto, la hipótesis planteada en esta tesis es la siguiente:

“Un análisis avanzado del perfil lipídico basado en el estudio de nuevas propiedades de las lipoproteínas como son el diámetro y número de partículas, la carga eléctrica, las glicofomas de Apo CIII y el contenido de LPS, aporta mayor información que la obtenida por rutina clínica, útil para la detección de un perfil aterogénico, así como para la prevención de la arteriosclerosis.”

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que un estudio más detallado que el realizado en la rutina clínica aporta más información útil para la detección de perfiles lipídicos aterogénicos y la prevención de la arteriosclerosis.

Para llevar a cabo este objetivo general, se han realizado diversos estudios, los cuales presentan distintos objetivos específicos que se exponen a continuación:

OBJETIVOS POR ESTUDIOS

ESTUDIO 1:

En este estudio se quiere elucidar la importancia del análisis lipídico avanzado frente al de rutina clínica en relación con el estrés y la ansiedad y para ello se disponen los siguientes objetivos:

- ◆ Determinar en mujeres estudiantes de medicina:
 - El perfil lipídico tradicional utilizado en la rutina clínica.
 - El perfil lipídico avanzado basado en el diámetro y número de partículas y carga eléctrica.
 - Determinar el grado de ansiedad como estado y como rasgo de personalidad’.
 - Determinar del grado de estrés actual y global; éste último clasificado en general, académico y social.
- ◆ Establecer asociaciones entre ambos perfiles lipídicos, el tradicional y el avanzado, y los grados de estrés y ansiedad.

ESTUDIO 2:

Comprobar si la carga eléctrica de las lipoproteínas contribuye de forma significativa a la arteriosclerosis subclínica (cIMT) en pacientes con LES:

- ◆ Determinar la carga eléctrica de cada una de las lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL y HDL) obtenidas por ultracentrifugación secuencial en pacientes diagnosticados de LES y controles.
- ◆ Comparación de grupos:
 - LES vs controles
 - LES sin y con placa aterosclerótica
- ◆ Establecer asociación entre la carga eléctrica de las lipoproteínas y la cIMT en LES.
- ◆ Comprobar si el efecto de la carga eléctrica sobre la cIMT es dependiente o independiente del resto de parámetros lipídicos.

ESTUDIO 3:

Determinar el efecto de las distintas glicoformas de Apo CIII, detectadas en plasma y en las distintas lipoproteínas, sobre el perfil lipídico:

- ◆ Determinar el perfil lipídico tradicional y avanzado por RMN (diámetro y número de partículas).
- ◆ Determinación de las distintas glicoformas de Apo CIII en plasma y cada una de las lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL y HDL) obtenidas por ultracentrifugación secuencial.
- ◆ Establecer asociaciones entre las distintas glicoformas de Apo CIII y el perfil lipídico.

ESTUDIO 4:

Determinar el efecto del contenido de LPS total y de cada uno de sus componentes, detectado en plasma y en las distintas lipoproteínas, sobre el perfil lipídico:

- ◆ Determinar el perfil lipídico tradicional y de las distintas subclases de lipoproteínas mediante RMN.
- ◆ Cuantificar el contenido total de LPS y de sus distintos componentes (3-OH FAs) en plasma y cada una de las lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL y HDL) obtenidas por ultracentrifugación secuencial.
- ◆ Establecer asociaciones entre el LPS y sus componentes y el perfil lipídico.

ESTUDIO 5:

Estudiar la existencia de posibles relaciones entre las glicoformas de Apo CIII y el LPS, así como con los componentes de éste.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Metodología

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

I. SELECCIÓN DE PARTICIPANTES

Todos los estudios que aparecen en esta tesis fueron aprobados por el **Comité Ético** del Hospital Universitario Sant Joan de Reus y todos los voluntarios firmaron el **consentimiento informado** para su participación en el estudio correspondiente.

Estudio 1. Mujeres jóvenes con estrés y ansiedad

Se busca una población compuesta por individuos con alto y bajo grado de estrés y ansiedad sin otros factores de riesgo cardiovascular aparentes. Para ello, se seleccionan en una primera fase a 210 estudiantes de medicina, con edades comprendidas entre los 18 y 25 años. Se decide que continúan en el proceso de selección las 146 mujeres participantes, para así tener una población más homogénea. Tras completar los cuestionarios STAI y de estrés académico para medir el grado de ansiedad y estrés, detallados más adelante, se seleccionan 69 según la puntuación obtenida en dichos test, quedándonos con las puntuaciones extremas. Finalmente, 46 acceden a pasar a la siguiente fase.

Cálculo del tamaño de la muestra

Para determinar el tamaño mínimo de la muestra, se selecciona la diferencia media del nº de partículas LDL pequeñas entre sujetos con normopeso y sujetos con sobrepeso, teniendo en cuenta la desviación estándar media procedente de un estudio previo de nuestro grupo en el cual se buscan diferencias en el perfil lipídico [78]. Se asume un error alfa de 0,05 y una potencia del 80 %, el tamaño mínimo necesario es de 14 sujetos por grupo.

Estudio 2. Pacientes con LES y controles

Por un lado, se usa una colección de **pacientes** diagnosticados de **LES** reclutados con anterioridad en la Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del Hospital Universitario Sant Joan de Reus. Los criterios de inclusión fueron cumplir al menos cuatro de los criterios de diagnóstico

desarrollados por el *American College of Rheumatology* (ver ANEXO I) [169] y no presentar actividad de la enfermedad en el momento del reclutamiento (índice SLEDAI < 4), ni daño orgánico crónico. Los criterios de exclusión fueron la presencia de diabetes *mellitus*, síndrome nefrítico, hipertensión o haber sufrido algún evento cardiovascular adverso o isquémico. Se seleccionan **78** pacientes. La información disponible con anterioridad a esta tesis era edad, género, IMC, hábito tabáquico, cIMT, perfil lipídico tradicional y avanzado obtenido por RMN. Durante la realización del estudio, 13 pacientes presentaron manifestaciones clínicas, encontrándose en estado de brote, con lo que se procedió a la obtención de muestra sanguínea e inclusión de éstos al estudio.

Por otro lado, **32 voluntarias control**, previamente reclutadas por la Unidad de Medicina Vascular y Metabolismo del mismo hospital, se introducen en el estudio. Estas voluntarias son todas mujeres y ninguna presentaba factores de riesgo cardiovascular.

Finalmente, ningún participante del estudio, indistintamente al grupo al que pertenece, estaba bajo tratamiento hipolipemiente.

Cálculo del tamaño de la muestra

El tamaño mínimo de muestra se calculó a partir de datos de carga eléctrica obtenidos en un estudio piloto previo. El número mínimo de participantes obtenido para cada grupo fue de 17 al asumir un error alfa de 0,05 y una potencia del 80 %.

Estudios 3, 4 y 5. Hombres jóvenes y sanos

Se reclutan a 25 hombres. Los criterios de inclusión son: ser joven, mayor de 18 años y aparentemente sano, ya que se busca una población lo más homogénea posible para evitar variabilidad.

Cálculo del tamaño de la muestra

Se calcula tomando los datos medios de LPS [364] y de glicosilación de Apo CIII [383]. Se selecciona una diferencia del 10 % en ambos parámetros, asumiendo un error alfa de 0,05 y una potencia del 80 %, el tamaño mínimo necesario es de 12 sujetos.

II. ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL PLASMA

Obtención de plasma

En primer lugar, se citan a los participantes a primera hora de la mañana para que acudan en ayunas, se realiza una punción endovenosa y se extrae sangre en un tubo de EDTA- Na_2 . Se centrifuga inmediatamente a 4 °C y 1500 x g durante 15 minutos. Se obtienen tres capas bien diferenciadas:

- ♦ Una capa inferior roja en la cual se encuentran los eritrocitos.
- ♦ Una capa intermedia fina blanca en la cual se encuentran las plaquetas y los leucocitos.
- ♦ Una capa superior amarillenta que corresponde al **plasma**.

En el caso de los participantes que ya estuvieran reclutados y formadas las colecciones, este paso es previo a la realización de esta tesis doctoral. Las muestras de dichos participantes de obtuvieron del biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV).

Una vez separado el plasma, se realizan alícuotas que se conservaran a -80 °C hasta su procesamiento (Figura 8).

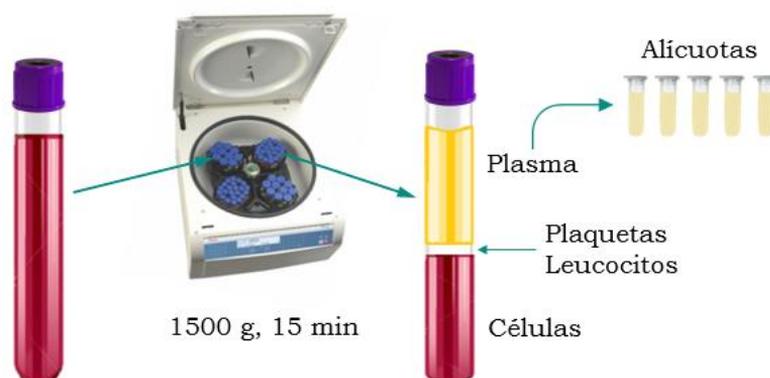


Figura 8. Proceso de obtención del plasma.

Análisis bioquímico

En todos los estudios que engloba este trabajo se determinan el **colesterol total**, los **TG** y el **HDLc** mediante métodos enzimáticos colorimétricos. El **LDLc** se calcula utilizando la ecuación de Friedewald [384]. Las apolipoproteínas se cuantifican con anticuerpos específicos para la **Apo AI** y **B100** mediante inmunoturbidimetría.

En el caso del **estudio 2**, también se analizan los niveles de **glucosa**, mediante un método enzimático colorimétrico, y **PCR ultrasensible** por inmunoensayo.

En las muestras de los **estudios 3, 4 y 5** también se determina la concentración plasmática total de **Apo CIII** con anticuerpos específicos mediante inmunoturbidimetría.

Todas estas determinaciones bioquímicas del plasma fueron realizadas mediante kits comerciales (SPINREACT, España) y se adaptaron a un auto-analizador Cobas Mira-Plus (Roche Diagnosis, España).

III. DIÁMETRO Y NÚMERO DE PARTÍCULAS

Para la obtención de un perfil lipídico más detallado, se determina simultáneamente el diámetro y número de partículas por **RMN** (Resonancia Magnética Nuclear). Esta técnica se desarrolló en 1992 [385] y se ha demostrado que es de gran ayuda para ampliar el espectro de factores de riesgo cardiovascular en poblaciones específicas [272]. Se ha desarrollado una nueva versión de la técnica denominada **Liposcale®: 2D diffusion-ordered ¹H NMR spectroscopy (DOSY)** [386], cuyas ventajas respecto a la anterior son: una medida más precisa del diámetro de las partículas y la capacidad para determinar el contenido de colesterol y TG en cada una de las lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL y HDL). Además, tiene una alta sensibilidad, la manipulación de las muestras es fácil y casi mínima y la obtención de los resultados es rápida. Una limitación de este método es que se trata de una técnica analítica, no preparativa, con lo cual solamente podremos obtener los valores a determinar, no un aislamiento de las lipoproteínas según los parámetros medidos.

Brevemente, la técnica consiste en la deconvolución matemática de las diversas señales de resonancia dada por los grupos metilos del núcleo lipídico de las lipoproteínas [272, 386]; las partículas pequeñas resuenan a bajas frecuencias y viceversa. El Liposcale® test permite obtener **9 subclases de lipoproteínas**: VLDL, LDL y HDL grandes, medianas y pequeñas (Figura 9); además también se obtiene el diámetro medio de las VLDL, LDL y HDL, el contenido en colesterol y TG de éstas y de la IDL y el n° de partículas totales de cada lipoproteína (VLDL-P, LDL-P HDL-P).

Debido al error intrínseco de la técnica, no se determinan el diámetro y el n° de partículas de las IDL, con lo que quedarán incluidas dentro de las LDL, concretamente de las LDL grandes. Esta nueva versión de la técnica (Liposcale® test) es la que se utiliza en los estudios que comprende esta tesis doctoral, a excepción del estudio 2 en el que los valores de diámetro y número de partículas se determinaron mediante LipoProfile® test comercializado por Liposcience [272], ya que estos datos se obtuvieron con anterioridad. Debido a esto, en el estudio 2, los

valores de IDL si se determinaron (IDL-P) y en el caso de las partículas LDL se obtuvieron 4 grupos: grandes, medianas, pequeñas y muy pequeñas.

La determinación del diámetro y del número de partículas lo determina la empresa Biosfer Teslab (Reus, España) a partir de $\approx 300 - 500 \mu\text{l}$ de plasma obtenido de los participantes como se explicó anteriormente en el capítulo II de la metodología.

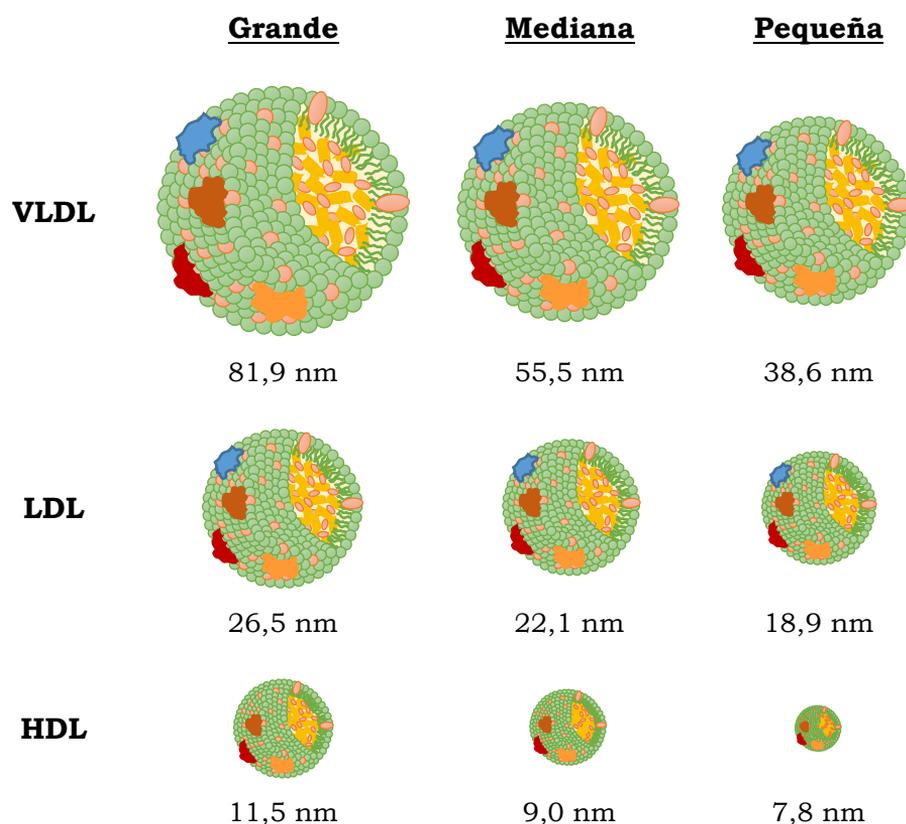


Figura 9. Clasificación de las lipoproteínas según su diámetro.

Extraída y adaptada de Mallol *et al.* [386].

VLDL: *Very low-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; HDL: *High-density lipoprotein*.

IV. OBTENCIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS

El método de referencia para la separación de las lipoproteínas es la **ultracentrifugación secuencial** descrita por Havel *et al.* [387], la cual separa las lipoproteínas en base a su densidad, derivando de ahí la nomenclatura de éstas [388]. Es un método fiable y robusto y es utilizado en todos los estudios de esta tesis doctoral.

Las distintas lipoproteínas se obtienen mediante este método, usando una ultracentrífuga modelo Optima XPN-100 (Beckman Coulter, EEUU) con rotor de ángulo fijo Kontron 45.6. Para la obtención de cada lipoproteína es necesaria una densidad determinada (1,006, 1,019, 1,063, 1,239 g/ml para las VLDL, IDL, LDL y HDL, respectivamente). Brevemente, se pone en cada tubo el volumen de plasma del que se dispone (normalmente 2 ml) y se le añade la solución de densidad correspondiente para cada lipoproteína. Estas densidades se consiguen mediante la combinación de soluciones de densidad compuestas por diferentes concentraciones de distintas sales. Se centrifuga a **37000 rpm** y **4 °C** durante **16 h** en el caso de las **VLDL**, se extrae la fracción lipoproteica, se añade la solución de densidad correspondiente y se vuelve a centrifugar durante **20 h** para las **IDL**. Se repite el proceso para las **LDL** y en el caso de las **HDL** se centrifuga durante **40 h** (Figura 10). En el ANEXO III se explica más en detalle el proceso de separación de lipoproteínas mediante ultracentrifugación secuencial, así como la composición de las distintas soluciones de densidad.

Dependiendo del experimento que se quiera realizar tras la separación de las lipoproteínas, será necesaria realizar una **diálisis** de las fracciones lipoproteicas aisladas para eliminar el contenido de sales proveniente de las soluciones de densidad. Dicha diálisis se realiza poniendo la muestra dentro de una membrana de diálisis y ésta en un matraz con **PBS**, dejándose durante toda la **noche** en **agitación** a **4 °C**. La diálisis se realiza en las muestras de los estudios 1, 2 y 3. En el ANEXO IV se explica en detalle dicho proceso.

Es muy importante mantener siempre el pH a 7,4 en todo el proceso, tanto en las soluciones de densidad como en el PBS, ya que, en el caso de querer medir posteriormente la carga eléctrica de las lipoproteínas, ésta podría verse alterada si no se controla el pH.



Figura 10. Ultracentrifugación.

A y B. Ejemplos de VLDL y LDL separadas por ultracentrifugación secuencial, respectivamente.

V. CARGA ELÉCTRICA

Para llevar a cabo la determinación de la carga eléctrica, en forma de **potencial Z**, de las lipoproteínas se utiliza un **Zetasizer Nano-ZS** (Malvern, Reino Unido), inicialmente disponible en el Instituto de Ciencia de los Materiales de Barcelona (ICMAB) y posteriormente en el grupo Food Innovation & Engineering (FoodIE) del departamento de Ingeniería Química de la URV.

El Zetasizer Nano-ZS utiliza una técnica denominada **M3-PALS**, que combina el **Laser Doppler micro-electrophoresis** y **Phase Analysis Light Scattering (PALS)** para determinar la movilidad electroforética, ofreciendo también los valores de potencial Z y conductividad, entre otros. Además, esta combinación permite obtener un patrón de distribución de la movilidad electroforética que hace posible analizar muestras cuya movilidad es baja.

La técnica utilizada para su determinación se basa en la medida de la velocidad a la cual se mueven las partículas en un determinado dispersante cuando se les aplica un campo eléctrico, a lo que se le denomina **movilidad electroforética (U_E)**. Teniendo en cuenta diferentes parámetros como la **viscosidad (η)** del dispersante, la **constante dieléctrica (ϵ)** y la movilidad electroforética medida, se puede calcular el **potencial Z (ζ)** a través de la **ecuación de Henry**, donde $F(Ka)$ es la función de Henry:

$$U_E = \frac{2 \epsilon \zeta F(Ka)}{3 \eta}$$

$F(Ka)$ puede tomar dos valores dependiendo del tipo de dispersante, habiendo dos aproximaciones a la hora de convertir la movilidad electroforética en potencial Z:

- ♦ 1: cuando el medio es no polar, se sigue la aproximación de Huckel.
- ♦ 1,5: en el caso de que el dispersante sea polar se usa la aproximación de Smoluchowski.

El parámetro que se va a utilizar para referirnos a la carga eléctrica neta de las lipoproteínas es el **potencial Z** expresado en **mV**.

Potencial Z

Es una propiedad física que presenta cualquier partícula que se encuentra en **suspensión**. Depende de las condiciones químicas de la superficie de la partícula y del dispersante en el que se encuentre; por lo que es importante hacer todas las medidas en las mismas condiciones para que sean comparables; por ejemplo, pequeños cambios en el **pH** provocan cambios en el potencial Z.

Cuando una partícula se encuentra en suspensión, hay una capa líquida que la rodea denominada **doble capa eléctrica o *electrical double layer***, en la cual se pueden diferenciar dos partes. Una región interna, denominada ***Stern layer***, en la que los iones están fuertemente unidos; y una región externa (**capa difusa**) en la que están menos firmemente asociadas (Figura 11). Dentro de la capa difusa hay un límite teórico dentro del cual los iones y las partículas forman una entidad estable. Cuando una partícula se mueve (por ejemplo, debido a la gravedad), los iones dentro del límite se mueven junto a ésta; en cambio, los iones más allá de la frontera permanecen con el dispersante. El potencial en este límite (superficie de corte hidrodinámico) es el **potencial Z**.

Los valores del potencial Z pueden oscilar entre +100 y -100 mV y dan una idea de cuán **estable** es la muestra en un sistema coloidal; así como de la capacidad de interacción de las moléculas, ya que es una medida de la magnitud de las fuerzas de atracción y repulsión entre partículas. Si todas las partículas en suspensión tienen un gran potencial Z negativo o positivo, tenderán a repelerse entre sí y no habrá tendencia a que las partículas se junten. Sin embargo, si las partículas tienen bajos valores de potencial zeta (próximos a 0), entonces no habrá fuerza para evitar que las partículas se junten y sedimenten. La línea divisoria general entre suspensiones estables e inestables se encuentra generalmente a **+30 y -30 mV**; es decir, las partículas

con potencial Z más positivo que +30 mV o más negativo que -30 mV se consideran normalmente estables.

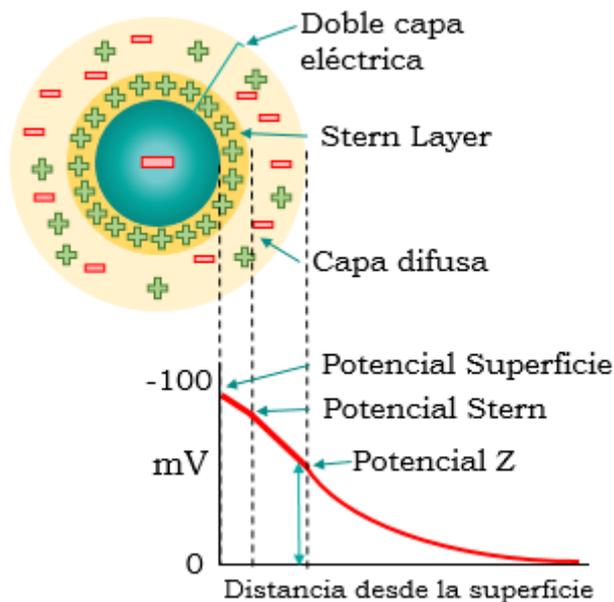


Figura 11. Capas y potencial Z de una partícula.

Medida del potencial Z

La determinación de la carga eléctrica de las lipoproteínas se realiza una vez se han aislado las lipoproteínas del plasma. En este caso es muy importante **dializar** cada una de las lipoproteínas obtenidas (VLDL, IDL, LDL y HDL) y así eliminar la mayor cantidad posible de sales de la solución y conseguir una conductividad **< 1 mS/cm**. De no ser así, los electrodos de la cubeta utilizada se queman rápidamente disminuyendo la vida útil de ésta; además de afectar considerablemente a la medida de la carga eléctrica. Además de la diálisis, también se debe hacer una **dilución** adecuada de la muestra con agua Milli Q (1:100 ó 1:50), ya que, si ésta está muy concentrada o muy diluida, no se realiza una buena medida. Dicha dilución se prepara justo en el momento de realizar la medida para así evitar que la muestra sedimente y/o se agreguen las partículas.

Una vez preparada la dilución, se pone la muestra en la cubeta con los electrodos, se introduce en el Zetasizer, se programa el

software creando un **SOP** (*Standard Operating Procedure*) que se utilizará en todas las medidas, para así asegurarnos de que todas se realizan de igual manera y sean comparables posteriormente (ver ANEXO V). Al realizar la medida, se aplica el campo eléctrico provocando el movimiento de las partículas cargadas. Un haz de rayo láser incide sobre las partículas, en la parte baja de la cubeta (Figura 12). La intensidad de luz que llega a las partículas la regula el **atenuador**, permitiendo que pase más o menos luz. El valor que adapte este atenuador; es decir, la cantidad de luz que incide en cada muestra, debe ser igual en todas las medidas para que éstas se puedan comparar, ya que las partículas al incidirle el láser, se excitan y se ponen en movimiento, provocando un cambio en la frecuencia (**efecto Doppler**) proporcional a la velocidad a la que se mueven. La tecnología utilizada por el Zetasizer es capaz de medir esa diferencia de frecuencia, la cual es proporcional a la movilidad electroforética y de ésta se obtiene el potencial Z mediante la ecuación de Henry explicada anteriormente.

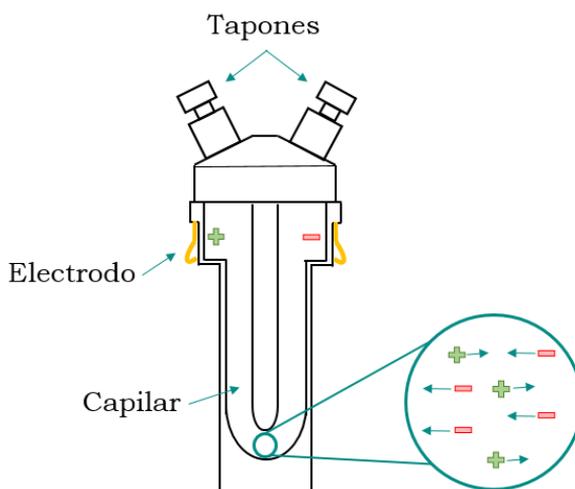


Figura 12. Cubeta utilizada para el potencial Z.

Cabe destacar, la novedad en la aplicación de dicha técnica para determinar la carga eléctrica de las lipoproteínas, ya que es la primera vez que se utiliza con este fin, de ahí la extensión de este capítulo y la puesta a punto explicada a continuación.

Optimización del volumen mínimo necesario y reutilización de muestras para la medida del potencial Z

Por norma general, con el rotor y tubos empleados para la separación de las lipoproteínas el volumen inicial de plasma que se utiliza y el de fracción lipoproteica que se obtiene es de 2 ml. Debido a la dificultad de la obtención de muestras de este volumen, bien directamente de los participantes a reclutar o bien de las colecciones creadas con anterioridad, se crea la necesidad de reducir el volumen mínimo necesario para la realización de una ultracentrifugación secuencial que separe correctamente las distintas lipoproteínas. Por otro lado, el volumen de fracción lipoproteica ya aislada para la determinación del potencial Z es pequeño (10 – 50 μ l) debido a la dilución posterior que hay que preparar justo antes de su determinación, por lo que en principio no es necesario la obtención de tanto volumen final ni la de una fracción lipoproteica sin diluir. Todo esto nos condujo a determinar el **volumen mínimo** necesario para la **ultracentrifugación** y posterior determinación del **potencial Z**.

Partimos de cuatro volúmenes iniciales diferentes: 200, 300, 500 y 1000 μ l del mismo pool de plasma. En el proceso de ultracentrifugación secuencial se saca 1 ml de fracción lipoproteica, independientemente del volumen inicial del que se parta. Hay que tener en cuenta que en este caso, el protocolo a seguir difiere únicamente del explicado con anterioridad en el capítulo IV de la metodología (ANEXO III) en los volúmenes de solución de densidad que hay que extraer del tubo y añadir posteriormente, pero siempre obteniendo la densidad necesaria. Una vez obtenidas las lipoproteínas, se determina la carga eléctrica de éstas haciendo una dilución 1:100 con agua Milli Q.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13. En el caso de la VLDL e IDL, la carga eléctrica de la fracción obtenida a partir del volumen inicial de 200 μ l es diferente de forma estadísticamente significativa de la obtenida a partir de los demás volúmenes iniciales de plasma. En la carga eléctrica de la LDL no se observan diferencias estadísticamente significativas. Los resultados de carga eléctrica de la HDL son concluyentes para

decidir el volumen mínimo necesario para la ultracentrifugación sin que se vea afectada la determinación de la carga eléctrica. En este caso se observa que el único volumen utilizado que no muestra diferencias significativas respecto al de 1 ml es el de 500 μl .

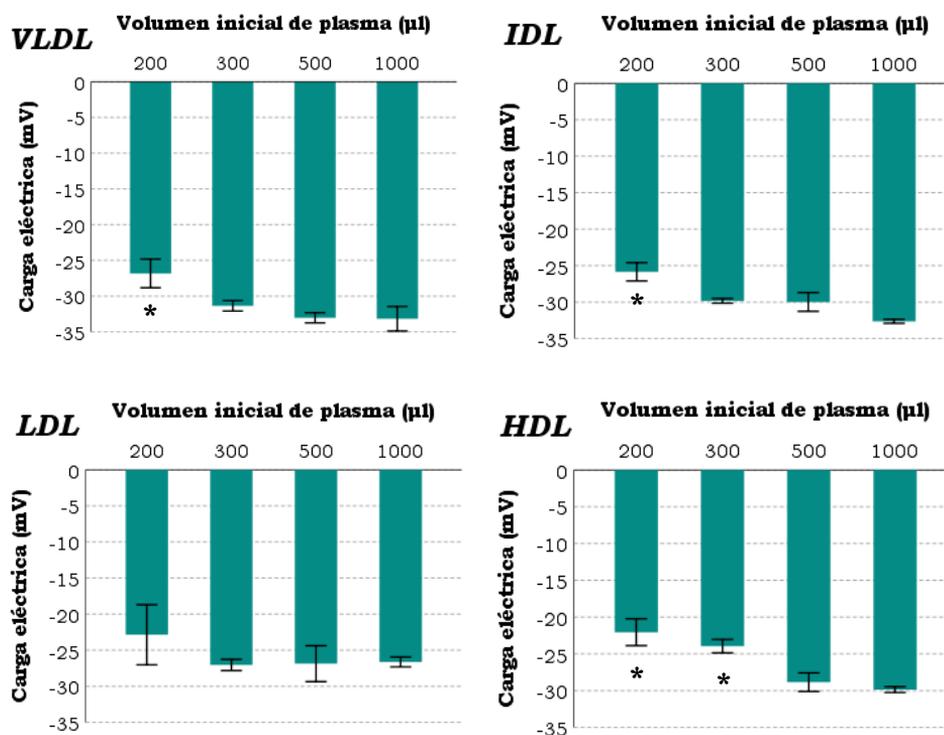


Figura 13. Comparación de la carga eléctrica media de las lipoproteínas en función del volumen inicial de plasma utilizado en la ultracentrifugación secuencial.

Datos expresados como media y desviación estándar.

VLDL: *Very low-density lipoprotein* o lipoproteína de muy baja densidad; IDL: *Intermediate-density lipoprotein* o lipoproteína de densidad intermedia; LDL: *Low-density lipoprotein* o lipoproteína de baja densidad; HDL: *High-density lipoprotein* o lipoproteína de alta densidad; mV: milivoltios; μl : microlitros.

* $p < 0,05$

Después de esta primera optimización, se quiso comprobar si el **volumen** utilizado (500 μl en nuestro caso) para la clasificación de las diferentes subclases de lipoproteínas mediante **RMN** se podía **reutilizar** para la determinación de la **carga eléctrica**.

En este caso se utiliza el plasma de las **46 participantes** que integran el estudio 1, aprovechando que para dicho estudio era necesario la determinación de la carga eléctrica de las lipoproteínas. La carga eléctrica media, a nivel poblacional, de las lipoproteínas aisladas de un plasma intacto y de otro el cual se ha sometido a RMN para la determinación de las subclases de lipoproteínas se muestra en la Figura 14. **No** se observan **diferencias** significativas entre la **carga eléctrica** de ambos grupos, **excepto** en el caso de la **VLDL** ($p < 0,05$), perdiendo electronegatividad tras la determinación por RMN de las subclases de lipoproteínas.

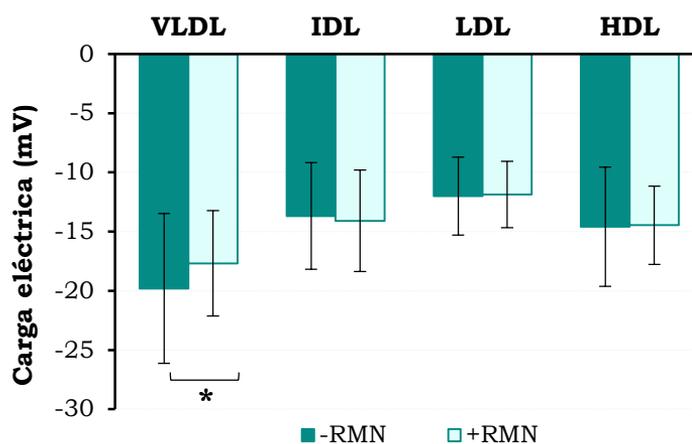


Figura 14. Comparación de la carga eléctrica de las lipoproteínas antes y después de la determinación de las subclases de lipoproteínas mediante RMN.

Datos expresados como media y desviación estándar.

VLDL: *Very low-density lipoprotein* o lipoproteína de muy baja densidad; IDL: *Intermediate-density lipoprotein* o lipoproteína de densidad intermedia; LDL: *Low-density lipoprotein* o lipoproteína de baja densidad; HDL: *High-density lipoprotein* o lipoproteína de alta densidad; mV: milivoltios. RMN: Resonancia magnética nuclear.

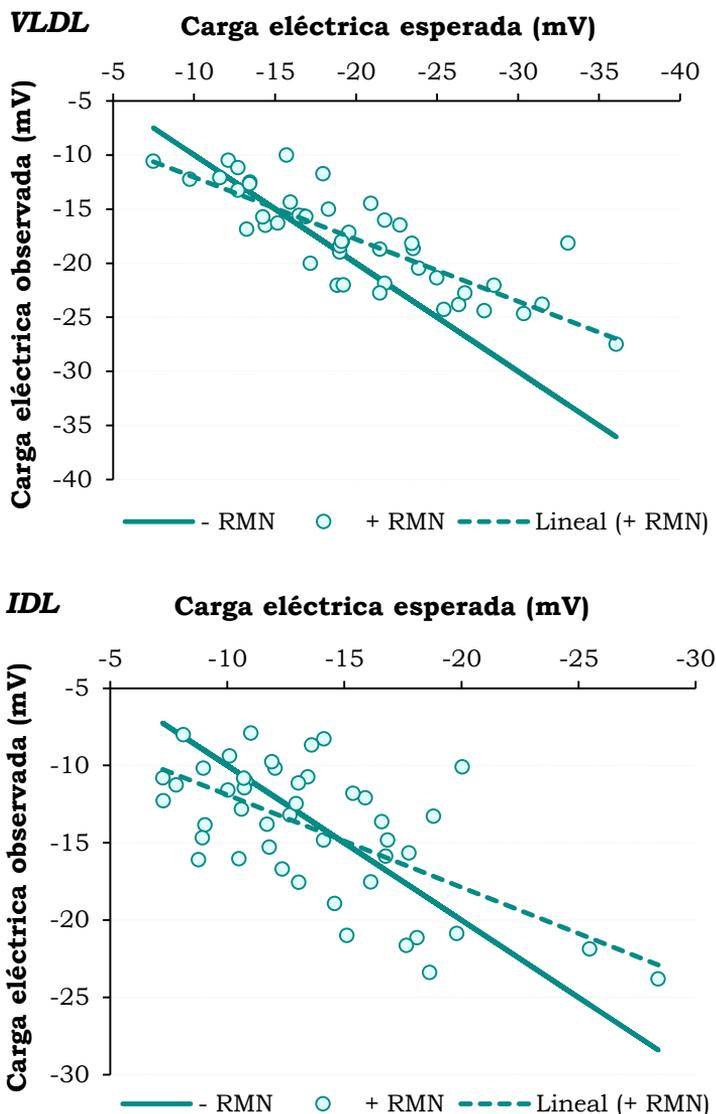
* $p < 0,05$

A pesar de existir esta diferencia, existen **correlaciones** altas estadísticamente significativas entre los valores de carga eléctrica de ambos grupos:

- ♦ VLDL: $r = 0,818^{**}$
- ♦ IDL: $r = 0,629^{**}$
- ♦ LDL: $r = 0,743^{**}$
- ♦ HDL: $r = 0,750^{**}$

** $p < 0,01$

Si en vez de realizar el estudio a nivel poblacional, se hace a **nivel de individuo**, se observa que todas las medidas presentan alguna diferencia en mV tras la RMN al representar la carga eléctrica observada tras la RMN frente a la esperada, que es la obtenida de forma previa (Figura 15).



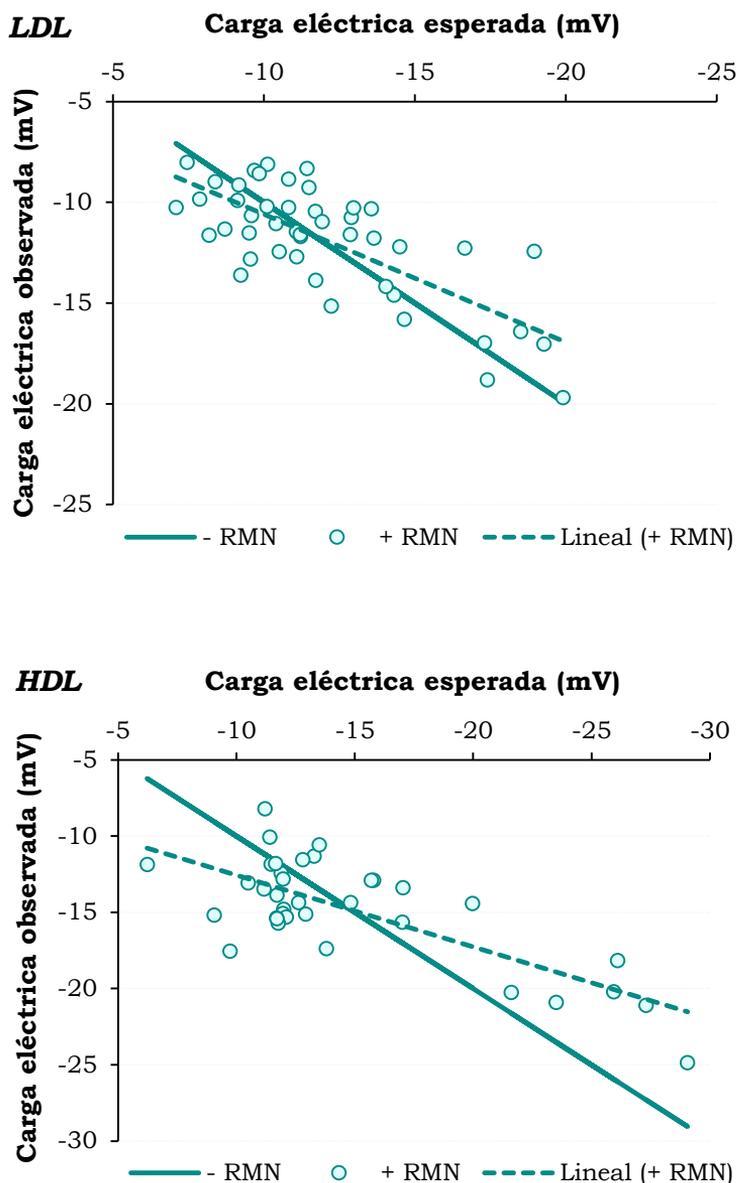


Figura 15. Valores de carga eléctrica tras la RMN respecto a los valores previos a ésta.

VLDL: *Very low-density lipoprotein* o lipoproteína de muy baja densidad; IDL: *Intermediate-density lipoprotein* o lipoproteína de densidad intermedia; LDL: *Low-density lipoprotein* o lipoproteína de baja densidad; HDL: *High-density lipoprotein* o lipoproteína de alta densidad; RMN: Resonancia magnética nuclear; mV: milivoltios.

Cabe destacar que, a pesar de que la incertidumbre de las medidas pueda explicar estas diferencias encontradas en los valores de carga eléctrica, se puede observar cómo dichos valores tienden a disminuir la pendiente de la recta en todos los casos, **igualándose** así los valores entre los individuos. El efecto de la RMN sobre la carga eléctrica cambia a ambos lados del **punto de intersección** de las rectas, teniendo un valor ≈ -15 mV en las VLDL, IDL y HDL, y ≈ -12 mV en las LDL.

Todas estas variaciones en los valores de carga eléctrica se podrían explicar por la **incertidumbre** en las medidas realizadas. Dicha incertidumbre se ha calculado siguiendo el método publicado por la Cooperación Europea para la Acreditación [389], tiene en cuenta la estabilidad de la medida y la calibración del equipo (A), la resolución del equipo (B) y la repetibilidad de las medidas (C), siendo la ecuación utilizada para un intervalo de confianza del 95 %:

$$\text{Incertidumbre(mV)} = k \cdot \sqrt{A^2 + B^2 + C^2}$$

Siendo:

- ♦ Calibración + estabilidad (A): Media de las desviaciones estándares de las diferentes medidas de cada muestra / 2
- ♦ Resolución (B): 0,05 mV
- ♦ Repetibilidad (C): Desviación estándar / n° de medidas
- ♦ $k = 1,96$

En este caso, la repetibilidad tiene en cuenta tanto la variabilidad como el error cometido por el personal manipulador de las muestras. Para cada muestra se obtienen 6 valores de carga eléctrica, procedentes de duplicados reales y triplicados técnicos.

Hay que añadir que la incertidumbre observada en las medidas es debida, principalmente, a la **inestabilidad** que presentan las muestras, siendo su aportación tres veces **superior** a la **repetibilidad**. Esto indica que el **método** utilizado es **bueno** y que lo importante a tener en cuenta es la calidad y/o estabilidad de la muestra.

Por tanto, de esta comparación de la carga eléctrica de las lipoproteínas antes y después de someter al plasma a RMN, se llega a la conclusión de que **sí** se puede **reutilizar el plasma** utilizado para la determinación de las subclases de lipoproteínas por RMN, ya que no se puede asegurar que las diferencias encontradas sean debidas exclusivamente a la RMN, ya que se pueden explicar por la incertidumbre de las medidas. Aun así, el que en todas las lipoproteínas se observe la misma tendencia en cuanto a la pendiente de las rectas, hace sospechar de la existencia de un efecto del proceso de determinación de las subclases de lipoproteínas por RMN sobre la carga eléctrica, bien sea directamente por el proceso fisicoquímico de la RMN, por la temperatura a la cual se determinan o por el ciclo de descongelación/congelación extra que sufre el plasma utilizado para RMN respecto al intacto. Hay que señalar que el proceso de ultracentrifugación, diálisis y determinación de la carga eléctrica ha sido exactamente igual en ambos grupos.

Por último, se aconsejaría utilizar un plasma intacto siempre que sea posible, ya que se minimizarían las variaciones en las medidas.

VI. GROSOR DE LA ÍNTIMA-MEDIA (cIMT)

La determinación del **grosor de la íntima-media carotídea (cIMT)** se realiza por ultrasonido y es una técnica relativamente económica, no invasiva, fiable y reproducible para la detección precoz de la arteriosclerosis subclínica (Figura 16).

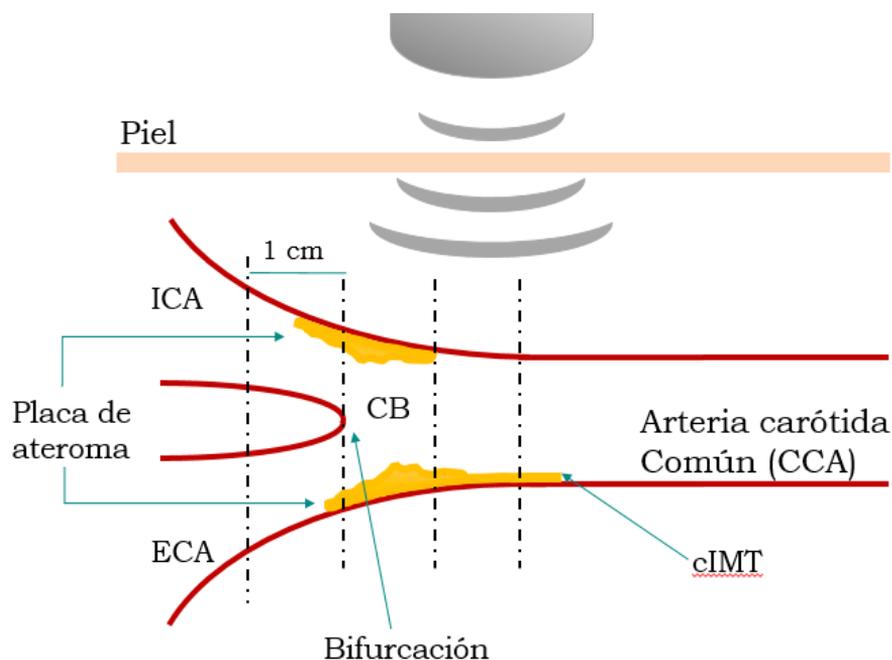


Figura 16. Esquema de la medida de la cIMT.

cIMT: grosor de la íntima-media carotídea o *carotid intima-media thickness*; CCA: arteria carótida común; CB: bulbo carotídeo; ICA: arteria carótida interna; ECA: arteria carótida externa.

Se utiliza un **sonógrafo** MyLab 50 XVision (Esaote SpA, España) equipado con una sonda de ultrasonido de matriz lineal de banda variable (5 - 12 MHz), para identificar y digitalizar la pared de las **arterias carótíneas comunes (CCAs)** izquierda y derecha a 1 cm de la parte proximal de la bifurcación, el bulbo carotídeo (CB) en la bifurcación y la arteria carótida interna (ICA) a 1 cm de la parte distal de la bifurcación. Las medidas de **cIMT** se representan como puntos predefinidos usando el procesador de imágenes ThickSoft software [390] y se determina mediante medidas en tres imágenes estáticas de las arterias carótíneas izquierda y derecha para obtener la cIMT media.

Esta cIMT sólo se ha determinado en los sujetos del estudio 2 y la ha realizado el equipo médico de la URLA y UVASMET en el Hospital Universitario Sant Joan de Reus.

VII. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO

El **Cuestionario de Frecuencia de Consumo Alimentario** (CFCA) tiene como objetivo conocer la frecuencia con la que se consume un alimento o grupo de alimentos en un período concreto de tiempo (ver ANEXO VI).

Los alimentos que se seleccionan para el cuestionario dependerán de lo que se quiera valorar posteriormente. Si se compara con otros test, éste ofrece una información más global al poder abarcar períodos de tiempo más amplios y más grupos de alimentos, pero menos precisa desde el punto de vista cualitativo.

Este cuestionario únicamente se ha utilizado en el estudio 1.

VIII. GRADO DE ESTRÉS Y DE ANSIEDAD

La determinación del grado de estrés y ansiedad se lleva a cabo únicamente en los participantes del estudio 1.

Estrés

El estrés se evalúa según la escala de estrés académico publicada por De Pablo *et al.* [391]. El test a realizar (ver ANEXO VII) está compuesto por 18 ítems y se basa en la evaluación de las fuentes de intensidad del estrés directamente relacionado con la actividad académica, ofreciendo información sobre:

- ♦ **Estrés actual:** es aquel existente en las semanas previas a la realización del test (ítem 4).
- ♦ **Estrés global:** se subdivide en 3 subescalas asociadas a actividades académicas potencialmente estresantes.
 - Estrés general: relacionado con la actividad académica en general (ítems 7, 8, 10, 11, 12, 13, y 15).
 - Estrés en los exámenes: el presente en períodos de exámenes (ítems 1, 3, 5, 17 y 18).
 - Estrés social: asociado a actividades académicas con interacción social como realizar una presentación de un trabajo en público o ser preguntado en clase (ítems 2, 6, 9 14 y 16).

Ansiedad

Para evaluar el grado de ansiedad se utiliza el cuestionario **STAI** (State-Trait Anxiety Inventory), el cual destaca por ser una de las primeras herramientas en ser validadas en España y de las más utilizadas en investigación [392].

Este cuestionario se divide en dos partes, las cuales se componen de 20 ítems cada una (ver ANEXO VIII) [393]:

- ♦ La primera parte evalúa la ansiedad como **estado**. Concretamente evalúa un estado emocional transitorio caracterizado por sentimientos subjetivos de tensión y aprensión, así como por hiperactividad del sistema nervioso autónomo en el momento que se realiza el test. La

intensidad puede fluctuar y variar con el tiempo, aumentando frente a distintos tipos de tensión y disminuyendo en respuesta a técnicas de relajación.

- ♦ La segunda evalúa la ansiedad como **rasgo** de personalidad. Señala una tendencia ansiosa, relativamente estable, que caracteriza a los individuos a percibir situaciones como amenazadoras. La ansiedad como rasgo posee características que permanecen latentes hasta que son activadas por estímulos y que suelen ser residuos de experiencias pasadas que predisponen a ver el mundo de una manera determinada.

En general, las personas con una mayor ansiedad tipo rasgo presentarán mayor ansiedad estado, ya que verán muchas más situaciones como amenazadoras.

IX. GLICOFORMAS DE APO CIII

Las glicofomas de Apo CIII se han determinado tanto en plasma como en las lipoproteínas ya aisladas, únicamente, de los participantes del estudio 3, es decir, en el conjunto de 25 hombres voluntarios, jóvenes y aparentemente sanos. Esta metodología se ha llevado a cabo el Centro de Ciencias Ómicas (COS) de Reus.

La técnica utilizada para su determinación fue descrita por Trenchevska *et al.* [383] y posteriormente aplicada por Koska *et al.* [394]. Consta de dos partes:

- ♦ Primera parte en la cual se aísla la **Apo CIII** por **inmunoafinidad**. Para ello se dializan las muestras en PBS y se incuban con un anticuerpo biotinilado contra la Apo CIII humana (Academy Bio-Medical Co., Hölzel Diagnostika, Alemania). Acto seguido, se inmovilizan sobre cartuchos de estreptavidina (AssayMAP Streptavidin cartridges, Agilent Technologies, España) de manera automatizada mediante la tecnología *AssayMap* del robot BRAVO (Agilent Technologies, España). Finalmente, se eluye la Apo CIII con ácido fórmico al 1 %, se secan bajo una corriente de nitrógeno en forma de gas y se resuspenden en una solución de 15 mg/ml de ácido sinapínico en un 33 % de acetonitrilo y un 0,4 % de ácido trifluoroacético.
- ♦ Segunda parte donde se identifican y cuantifican de forma relativa las diferentes **formas sializadas**. Para ello, se ponen las muestras eluidas en una placa *Ground Steel Target Plate* de Bruker y se analizan por **MALDI-TOF/TOF** (MALDI ultrafleXtreme®, Alemania). La obtención de los espectros se realiza con el software FlexControl (Bruker, Alemania) con un método lineal en modo positivo y con un rango de 4 a 20 kDa. Además, para el calibrado del método se utiliza el *Protein Standard I* (Bruker, Germany) y para el procesado de espectros y detección de picos se usa el software FlexAnalysis (Bruker, Alemania).

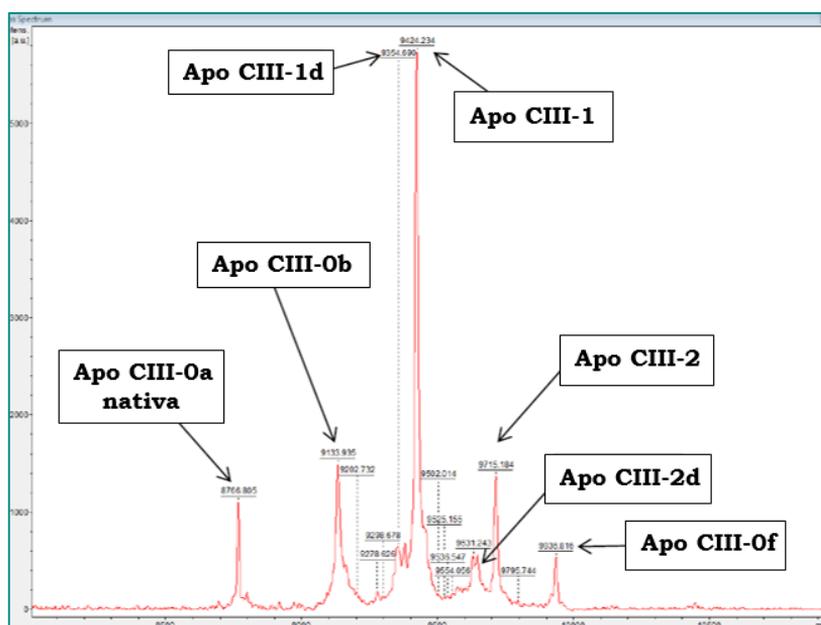


Figura 17. Espectro de glicofomas de Apo CIII detectadas.

Apo: apolipoproteína; Apo CIII-0a: nativa; Apo CIII-0b: nativa + galactosa + N-acetilgalactosamina; Apo CIII-Of: nativa + galactosa + 2 N-acetilgalactosamina + 3 fucosa; Apo CIII-1: nativa + 1 ácido siálico; Apo CIII-1d: nativa + 1 ácido siálico - 1 alanina; Apo CIII-2: nativa + 2 ácido siálico; Apo CIII-2d: nativa + 2 ácido siálico - 1 alanina.

En la Figura 17 se muestra un espectro tipo con los picos correspondientes a las distintas glicofomas de Apo CIII detectadas, las cuales presentan distintas modificaciones químicas que se explican a continuación:

- ♦ **Apo CIII-0a:** nativa.
- ♦ **Apo CIII-0b:** glicosilada con una molécula de galactosa y otra de N-acetilgalactosamina.
- ♦ **Apo CIII-Of:** es una Apo CIII-0a nativa con una molécula de galactosa, dos de N-Acetilgalactosamina y tres de fucosa.
- ♦ **Apo CIII-1:** presenta una molécula de ácido siálico.
- ♦ **Apo CIII-1d:** presenta una molécula de ácido siálico, pero ha perdido una alanina.
- ♦ **Apo CIII-2:** presenta dos moléculas de ácido siálico.
- ♦ **Apo CIII-2d:** presenta dos moléculas de ácido siálico, pero, al igual que la 1d, ha perdido una alanina.

X. LPS y sus COMPONENTES

La determinación del LPS y sus componentes se lleva a cabo mediante la cuantificación de los **ácidos grasos 3-hidroxilo conjugados o conjugated 3-hydroxy fatty acids (3-OH FAs)** por cromatografía de gases acoplada en tándem a la espectrometría de masas (**GC-QqQ/MS²**). Al igual que en el caso anterior de la Apo CIII, el LPS total y sus componentes se han determinado tanto en plasma como en las lipoproteínas ya aisladas, únicamente, de los participantes del estudio 4, es decir, en el conjunto de 25 hombres voluntarios, jóvenes y aparentemente sanos. Además, esta metodología también se ha llevado a cabo en el Centro de Ciencias Ómicas (COS) de Reus.

Como se ha explicado en el capítulo VI de la introducción, estos **3-OH FAs** son componentes estructurales del LPS con lo cual, si los cuantificamos, se puede determinar la cantidad de LPS presente en la muestra. Con esta metodología se detectan hasta seis 3-OH FAs, en beneficio de los tres [395], cuatro [364] o cinco [396] detectados por otros investigadores:

- ♦ 3-OH C:8: ácido caprílico
- ♦ 3-OH C:10: ácido cáprico
- ♦ 3-OH C:12: ácido láurico
- ♦ 3-OH C:14: ácido mirístico
- ♦ 3-OH C:16: ácido palmítico
- ♦ 3-OH C:18: ácido esteárico

Debido a que estos 3-OH FAs también son productos de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, pueden representar una limitación al poder interferir los de origen mitocondrial en los análisis [396]. Esto se solventa analizando los 3-OH FAs libres y totales que hay en cada muestra, obteniendo así los 3-OH FAs procedentes del LPS mediante la diferencia entre los totales y los libres. Finalmente, el contenido de **LPS total** de cada muestra se calcula como la **suma** de los nanomoles de cada **3-OH FAs** detectado dividido por 4, ya que se asume que por cada molécula de LPS hay 4 moléculas de 3-OH FAs [395]. En el caso de

determinar estos 3-OH FAs en las lipoproteínas, no habría influencia de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, pero el procedimiento a seguir en el caso de las fracciones lipoproteicas ha sido el mismo que en el plasma, ya que así es como lo tienen optimizado en el COS.

Para llevar a cabo esta técnica y, por tanto, la determinación de los distintos 3-OH FAs, se han de preparar las muestras de plasma y lipoproteínas. Se realiza una hidrólisis alcalina con NaOH 10M para la determinación de los 3-OH FAs totales. En el caso de los 3-OH FAs libres, se añade agua ultrapura para tener un volumen final igual al de los tubos en los cuales se lleva a cabo la hidrólisis alcalina. En ambos casos se le añade también un estándar interno y se lleva a cabo una **extracción líquido-líquido** con cloroformo. Dicha extracción consiste en separar en dos fases líquidas el contenido de la muestra. La fracción que nos interesa es la **fase orgánica**, ya que en ella es en la que se encuentran los ácidos grasos a determinar. Esta fase se seca bajo un **flujo de N₂ gas**. A continuación, se derivatizan los componentes de las muestras mediante la adición de N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida con trimetilclorosilano al 10 % y 10 % de piridina. Después de 1 h a temperatura ambiente, las muestras se analizan por **GC-QqQ/MS²** (Agilent Technologies, España) dentro de las próximas 24 horas.

XI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Toda la estadística realizada en esta tesis doctoral se ha llevado a cabo utilizando el software SPSS versiones 23, 24 y 25 (Chicago, EEUU). Se fija la significación estadística en $p < 0,05$ (*), aunque también se destaca la significancia $p < 0,01$ (**).

TEST DE NORMALIDAD:

- ♦ Kolmogorov-Smirnov para los casos en los que el tamaño poblacional sea > 50 .
- ♦ Shapiro-Wilk para poblaciones cuyo tamaño sea < 50 .

Si alguna variable no presenta distribución normal, ésta se intenta normalizar realizando su logaritmo en base 10, en primer lugar, y posteriormente otras operaciones matemáticas. De no conseguir la normalización de las variables, las correspondientes se tratarán como variables no normales.

DESCRIPTIVOS:

- ♦ Media \pm desviación estándar para variables cuantitativas con distribución normal.
- ♦ Mediana (rango intercuartílico) para variables cuantitativas con distribución no normal.
- ♦ Frecuencia para variables cualitativas.

Además de mostrar los descriptivos de las variables de las poblaciones estudiadas, también se han comparado los valores de estas variables en busca de diferencias significativas. Para ello se realizan diferentes test:

- ♦ T-Student: para comparar medias de variables cuantitativas con distribución normal y que se encuentren emparejadas.
- ♦ ANOVA: para comparar medias de variables cuantitativas con distribución normal. En el caso de que las variables estén clasificadas en más de 2 categorías, se realiza un ANOVA con el ajuste post-hoc de Bonferroni.

- ♦ U-Mann-Whitney: para variables cuantitativas con distribución no normal.
- ♦ X²: para comparar la frecuencia de las variables cualitativas.

CORRELACIONES LINEALES:

Se realizan para estudiar posibles asociaciones de forma lineal entre distintas variables cuantitativas de una población.

- ♦ Correlación bivariada de Pearson: para variables con distribución normal.
- ♦ Correlación bivariada de Spearman: para variables con distribución no normal.
- ♦ Correlaciones parciales: para estudiar asociaciones de forma lineal entre variables cuantitativas teniendo en cuenta los valores de otra/s variable/s con los que ajustamos dicha correlación.

REGRESIÓN LINEAL:

Se realizan para buscar las variables predictoras (independientes) de la variable de interés (dependiente). Los modelos de regresión utilizados en esta tesis son:

- ♦ Por pasos: introduce a la variable independiente que no se encuentre ya en la ecuación y que tenga la probabilidad para F más pequeña, si esa probabilidad es suficientemente pequeña. Las variables ya introducidas en el modelo de regresión se eliminan de él si su probabilidad F llega a ser insuficientemente grande. Termina cuando ya no hay más variables candidatas a ser incluidas o excluidas.
- ♦ Hacia adelante: las variables se introducen secuencialmente en el modelo. La primera será la que tenga mayor correlación, positiva o negativa, con la variable dependiente. A continuación, se considera la variable independiente cuya correlación parcial sea mayor y que aún no esté en el modelo. Termina cuando ya no quedan variables que cumplan el criterio de entrada.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Resultados

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

ESTUDIO 1. Estrés, ansiedad, diámetro, nº de partículas y carga eléctrica

El objetivo principal de este estudio es demostrar que un análisis más detallado y avanzado de los lípidos y lipoproteínas medido por **RMN**, sumado a la determinación de la **carga eléctrica** neta de cada una de las lipoproteínas aisladas por ultracentrifugación secuencial, permite identificar alteraciones en el perfil lipídico y lipoproteico relacionadas con el grado de **estrés** y **ansiedad** y que no pueden ser detectadas con análisis de rutina clínica. Para ello, se reclutan mujeres estudiantes de medicina, jóvenes y aparentemente sanas, siendo 46 las que terminan por completar el proceso de reclutamiento y pruebas a realizar. Se les realiza el cuestionario STAI, el test de estrés académico y el CFCA en el mismo momento en el que se le realiza una extracción de sangre. Se lleva a cabo un análisis lipídico tradicional y otro avanzado consistente en lípidos, diámetro y número de partículas por RMN y la determinación de la carga eléctrica neta de las lipoproteínas. Se establecen asociaciones entre ambos perfiles lipídicos, el tradicional y el avanzado, y los diferentes grados de estrés y ansiedad; al igual que la carga eléctrica.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Características de la población

En la Tabla 2 se muestran las características antropométricas, de estilo de vida y parámetros lipídicos tradicionales de las 46 mujeres participantes. Los resultados obtenidos corroboran que se trata de una población joven, sana y con hábitos de vida saludables.

Tabla 2. Características de la población.

Características	N=46
Edad, años	20,5 (20,0 – 21,0)
IMC, kg/m²	20,7 (19,4 – 22,2)
Normal (IMC < 25), %	95,6
Sobrepeso (25 < IMC < 30), %	2,2
Obesidad (IMC ≥ 30), %	2,2
Tabaquismo, % sí	10,9
Ejercicio físico, % sí	71,7
Colesterol total, mg/dl	156,6 (146,7 – 177,7)
TG, mg/dl	62,4 (49,8 – 75,9)
LDLc, mg/dl	83,3 ± 18,6
HDLc, mg/dl	63,3 (54,7 – 70,1)
Apo AI, mg/dl	144 (132,3 – 161,3)
Apo B100, mg/dl	71,2 ± 14,6

Datos expresados como mediana (rango intercuartílico) o media ± desviación estándar, excepto en los que a variable se expresa como %.
IMC: índice de masa corporal; TG: triglicéridos; HDLc: colesterol HDL; LDLc: colesterol LDL; Apo: apolipoproteína.

ESTRÉS

Características de la población según el grado de estrés

Las participantes del estudio se han dividido en dos grupos dependiendo de la puntuación obtenida en el test de estrés académico, quedando dividida en grupos de bajo (< percentil 50) y alto (> percentil 50) grado de estrés. Cabe mencionar que, del total de las 46 participantes, 43 fueron las que completaron correctamente el test, ya que en 3 test se encontraron errores en las respuestas, como por ejemplo dejar alguna pregunta sin contestar.

Las características antropométricas, estilo de vida y parámetros psicológicos de los grupos con bajo y alto grado de estrés se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los grupos de población según el grado de estrés.

Características	ESTRÉS	
	Bajo (N = 20)	Alto (N = 23)
Edad, años	20,5 (20,0 – 21,0)	20,0 (19,0 – 21,0)
IMC, kg/m²	21,1 (19,5 – 22,2)	20,8 (19,3 – 22,7)
Tabaquismo, % sí	10,0	13,0
Medicación, % sí	40,0	39,1
Ejercicio físico, % sí	75,0	69,6
Grasa total, g/semana	361,9 (249,1 – 411,9)	363,3 (307,6 – 404,3)
Alcohol, g/semana	2,6 (0,7 – 4,7)	2,9 (0,0 – 4,4)
Carbohidratos, g/semana	723,5 ± 200,8	780,3 ± 203,6
Estrés global	69,5 (61,8 – 79,8)	104,0 (91,0 – 121,0)**
Estrés social	20,6 ± 7,4	31,5 ± 6,9**
Estrés de exámenes	34,5 ± 6,2	43,5 ± 6,4**
Estrés general	14,0 (12,0 – 15,7)	31,0 (23,0 – 38,0)**
Estrés actual	28,6 ± 14,8	48,1 ± 22,7**
Ansiedad rasgo	13,0 (10,5 – 28,0)	34,0 (13,5 – 37,5)**
Ansiedad estado	12,0 (7,0 – 13,2)	21,0 (15,0 – 28,5)**

Datos expresados como media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico), excepto en los casos en los que la variable se expresa como %.

** $p < 0,01$

Referente a las características antropométricas y estilo de vida, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de bajo y alto grado de estrés. Sin embargo, hay una tendencia en cuanto a la práctica de ejercicio físico, y es que ésta es mayor en el grupo de bajo grado de estrés. En cuanto a los datos obtenidos en el cuestionario de frecuencia de consumo alimentario, se detecta la tendencia de una mayor ingesta de carbohidratos y de grasas en el grupo de alto grado de estrés.

Por otro lado, el grupo de alto grado de estrés presenta mayores niveles de estrés global y de los diferentes tipos de estrés detectados, así como de ansiedad estado y ansiedad rasgo.

Caracterización del perfil lipídico de la población con bajo y alto grado de estrés

En cuanto a los parámetros lipídicos, se determinaron los lípidos tradicionales de rutina clínica como el colesterol total, el LDLc y HDLc, los triglicéridos y las apolipoproteínas AI y B100. También se realizó un estudio avanzado del perfil lipídico en el cual se determina el diámetro medio, el nº de partículas y las subclases de lipoproteínas mediante RMN, así como la carga eléctrica de las lipoproteínas. Al comparar los valores de todos los parámetros determinados en ambos grupos (bajo y alto grado de estrés), no se observan diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil lipídico de una población según el grado de estrés.

ESTRÉS		
	Bajo (N = 20)	Alto (N = 23)
LÍPIDOS TRADICIONALES		
Colesterol total (mg/dl)	160,5 ± 23,7	162,2 ± 28,0
TG (mg/dl)	67,7 (50,7 – 79,9)	61,1 (46,9 – 70,8)
LDLc (mg/dl)	81,1 ± 13,5	83,5 ± 21,9
HDLc (mg/dl)	61,0 (56,2 – 68,5)	64,5 (54,4 – 74,5)
Apo AI (mg/dl)	143,0 (129,3 – 162,0)	146,0 (133,0 – 161,0)
Apo B100 (mg/dl)	65,5 (63,0 – 76,8)	68,0 (58,0 – 79,0)
LÍPIDOS MEDIDOS POR RMN		
VLDL-TG (mg/dl)	37,3 (30,8 – 43,2)	35,5 (30,9 – 43,3)
IDL-TG (mg/dl)	4,9 (4,6 – 6,0)	4,6 (4,2 – 5,9)
LDL-TG (mg/dl)	5,0 (4,0 – 6,1)	4,7 (4,0 – 6,0)
HDL-TG (mg/dl)	7,9 (7,4 – 10,4)	8,0 (6,5 – 8,9)
VLDLc (mg/dl)	5,2 (3,5 – 6,8)	5,4 (3,7 – 6,4)
IDLc (mg/dl)	2,6 (2,1 – 3,8)	2,1 (1,5 – 3,0)
LDLc (mg/dl)	70,8 ± 6,8	72,1 ± 8,9
HDLc (mg/dl)	49,5 (45,3 – 53,9)	47,5 (43,6 – 55,1)

Continúa en la página siguiente.

Continuación Tabla 4.

Nº de PARTÍCULAS MEDIDO POR RMN		
VLDL-P(nmol/l)	22,3 (18,7 – 28,1)	22,2 (19,1 – 26,1)
Grandes (nmol/l)	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2
Medianas (nmol/l)	3,8 (3,1 – 4,2)	3,5 (3,0 – 4,8)
Pequeñas (nmol/l)	17,6 (15,2 – 23,5)	17,8 (15,4 – 21,0)
LDL-P (nmol/l)	474,3 ± 52,4	475,9 ± 60,7
Grandes (nmol/l)	69,3 ± 9,3	71,1 ± 10,6
Medianas (nmol/l)	178,0 ± 24,0	176,0 ± 30,8
Pequeñas (nmol/l)	219,9 (206,1 – 239,7)	233,4 (215,3 – 240,8)
HDL-P (µmol/l)	24,1 (22,1 – 27,3)	23,8 (22,0 – 27,5)
Grandes (µmol/l)	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Medianas (µmol/l)	7,9 (7,0 – 8,7)	7,5 (6,7 – 8,3)
Pequeñas (µmol/l)	16,3 (15,2 – 18,6)	16,1 (15,1 – 19,1)
DIÁMETRO MEDIDO POR RMN		
VLDL (nm)	42,3 (42,3 – 43,5)	42,7 (42,4 – 43,1)
LDL (nm)	21,2 ± 0,1	21,2 ± 0,2
HDL (nm)	8,2 (8,2 – 8,2)	8,2 (8,2 – 8,2)
CARGA ELÉCTRICA NETA		
VLDL (mV)	-23,1 ± 5,7	-22,0 ± 5,9
IDL (mV)	-17,7 ± 4,6	-17,4 ± 6,1
LDL (mV)	-14,4 (-19,5 - -12,0)	-16,7 (-19,0 - -13,4)
HDL (mV)	-20,9 ± 3,9	-19,5 ± 5,6

Datos expresados como mediana (rango intercuartílico) o media ± desviación estándar.

TG: Triglicéridos; Apo: Apolipoproteína; VLDL: *Very low-density lipoprotein*; VLDL-P: Partículas totales de VLDL; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; IDL-P: Partículas totales de IDL; LDL: *Low-density lipoprotein*; LDL-P: Partículas totales de LDL; HDL: *High-density lipoprotein*; HDL-P: Partículas totales de HDL.
 ** $p < 0,01$

Relación entre el perfil lipídico y el tipo de estrés

A pesar de no encontrar diferencias significativas entre ambos grupos, se quiso evaluar si hay algún tipo de asociación entre el perfil lipídico y los distintos tipos de estrés evaluados. Para ello se realizaron correlaciones parciales, ajustadas por edad, IMC,

hábito tabáquico, ingesta total de grasas, alcohol y carbohidratos, medicación y actividad física, entre los resultados obtenidos en el test de estrés académico y los parámetros lipídicos. Se han obtenido correlaciones estadísticamente significativas entre el estrés académico debido a los exámenes y los TG contenidos en la VLDL ($r = -0,340$; $p = 0,046$), el número de partículas VLDL medianas ($r = -0,354$; $p = 0,037$) y el diámetro de la HDL ($r = -0,360$; $p = 0,033$). Dichas correlaciones son negativas, lo que significa que cuanto mayor estrés académico debido a los exámenes, menores niveles de TG en las VLDL, menos partículas VLDL medianas y más pequeñas son las HDL. Cabe destacar, la correlación entre este tipo de estrés y la carga eléctrica de la HDL, la cual roza la significancia ($r = 0,371$; $p = 0,062$). Por otro lado, el estrés actual correlaciona positivamente con la carga eléctrica de la VLDL ($r = 0,342$; $p = 0,038$) y HDL ($r = 0,383$; $p = 0,049$).

Dadas estas correlaciones, se quiso cuantificar la contribución de dichos parámetros a la variabilidad presentada del estrés. Para ello se construye un modelo de regresión lineal, tipo hacia adelante, con las características antropométricas y de estilo de vida, los lípidos determinados por rutina clínica, los parámetros lipídicos obtenidos por RMN y la carga eléctrica (Tabla 5). Para el estrés debido a los exámenes, el modelo determina que tanto el diámetro como la carga eléctrica de la HDL son responsables del 31,0 % de su variabilidad; además, el incremento de 1mV en los valores de carga de la HDL aumentaría en 0,7 los puntos obtenidos en el test referente al estrés debido a los exámenes. En el caso del estrés actual, es la carga eléctrica de la VLDL la que explica el 14,4 % de su variabilidad.

Tabla 5. Modelos de regresión lineal para la variabilidad del estrés.

	Modelo	R²	p-valor
Estrés debido a exámenes	Diámetro HDL	0,126	0,039
	Diámetro + Carga HDL	0,310	0,007
Estrés actual	Carga VLDL	0,144	0,025

ANSIEDAD

Características de la población según el grado de ansiedad

Al igual que con el estrés, las participantes del estudio se dividen en dos grupos dependiendo de la puntuación obtenida en el STAI, quedando dividida en un grupo de bajo (< percentil 50) y otro de alto (> percentil 50) grado de ansiedad. Las participantes que completaron correctamente el test fueron 44, ya que en 2 test se encontraron errores en las respuestas, como por ejemplo dejar alguna pregunta sin contestar.

Las características antropométricas, estilo de vida y parámetros psicológicos de los grupos con bajo y alto grado de ansiedad se muestran en la Tabla 6. Referente a las características antropométricas y estilo de vida, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de bajo y alto grado de ansiedad. Sin embargo, hay una tendencia en cuanto a la práctica de ejercicio físico, y es que ésta es mayor en los grupos con bajo grado de ansiedad. También, se detecta una mayor ingesta de carbohidratos y alcohol en el grupo de alto grado de ansiedad.

Por otro lado, hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de bajo y alto grado de ansiedad respecto a la ansiedad como estado y como rasgo. El cuestionario de estrés académico también muestra que el grado de los distintos tipos de estrés (global, general y el asociado a exámenes) es superior en el grupo de estudiantes con una personalidad con mayor tendencia a la ansiedad ($p = 0,010$; $p = 0,036$ y $p < 0,001$; respectivamente). Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas en el caso del estrés actual ni en el social.

Tabla 6. Características de la población según el grado de ansiedad.

Características	ANSIEDAD	
	Bajo (N = 19)	Alto (N = 25)
Edad, años	20,0 (19,0 – 21,0)	21,0 (20,0 – 21,0)
IMC, kg/m²	21,5 (18,8 – 22,2)	20,7 (19,5 – 21,9)
Tabaquismo, % sí	15,8	8,0
Medicación, % sí	36,8	36,0
Ejercicio físico, % sí	84,2	64,0
Grasa total, g/semana	364,2 ± 91,1	364,9 ± 109,4
Alcohol, g/semana	1,9 (0,9 – 3,8)	3,2 (0,0 – 4,9)
Carbohidratos, g/semana	713,4 ± 212,1	819,0 ± 194,8
Estrés global	79,2 ± 22,2	98,6 ± 23,5**
Estrés social	25,5 ± 8,4	28,2 ± 8,8
Estrés de exámenes	34,9 ± 6,6	43,3 ± 6,9**
Estrés general	16,0 (12,0 – 25,0)	23,5 (14,8 – 38,8)*
Estrés actual	35,0 (20,0 – 47,0)	44,0 (21,0 – 58,0)
Ansiedad rasgo	12,0 (9,0 – 13,0)	35,0 (32,0 – 39,0)**
Ansiedad estado	9,7 ± 4,3	24,5 ± 8,1**

Datos expresados como media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico).

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Caracterización del perfil lipídico de la población según el grado de ansiedad

Al comparar los valores de los parámetros lipídicos en los diferentes grupos, se observan diferencias estadísticamente significativas en la carga eléctrica de las HDL, siendo más electronegativa en el grupo con bajo grado de ansiedad ($p < 0,01$) (Tabla 7).

Tabla 7. Perfil lipídico de una población según el grado de ansiedad.

ANSIEDAD		
	Bajo (N = 19)	Alto (N = 25)
LÍPIDOS TRADICIONALES		
Colesterol total (mg/dl)	154,3 (139,2 – 177,5)	157,8 (148,5 – 177,3)
TG (mg/dl)	64,6 (51,3 – 80,5)	61,1 (46,5 – 74,8)
LDLc (mg/dl)	80,0 ± 17,1	86,5 ± 20,1
HDLc (mg/dl)	59,5 (54,8 – 71,8)	64,1 (55,6 – 68,7)
Apo AI (mg/dl)	146,5 ± 19,3	146,0 ± 18,3
Apo B100 (mg/dl)	66,0 (62,0 – 77,0)	69,0 (60,5 – 81,0)
LÍPIDOS MEDIDOS POR RMN		
VLDL-TG (mg/dl)	37,5 (33,6 – 46,0)	35,8 (29,7 – 41,3)
IDL-TG (mg/dl)	5,1 (4,8 – 5,9)	4,7 (4,3 – 5,6)
LDL-TG (mg/dl)	4,7 (4,1 – 6,0)	4,8 (4,1 – 6,1)
HDL-TG (mg/dl)	8,6 (7,6 – 10,1)	7,5 (6,9 – 9,2)
VLDLc (mg/dl)	6,1 (4,4 – 7,1)	4,9 (3,5 – 6,2)
IDLc (mg/dl)	2,6 (2,2 – 3,8)	2,2 (1,6 – 3,6)
LDLc (mg/dl)	69,8 ± 7,4	73,8 ± 8,7
HDLc (mg/dl)	49,4 ± 5,7	48,8 ± 5,6
Nº de PARTÍCULAS MEDIDO POR RMN		
VLDL-P (nmol/l)	23,7 (20,9 – 29,6)	21,5 (19,1 – 25,4)
Grandes (nmol/l)	0,9 ± 0,3	0,8 ± 0,2
Medianas (nmol/l)	3,6 (3,2 – 4,8)	3,6 (2,9 – 4,1)
Pequeñas (nmol/l)	20,0 (16,6 – 24,4)	16,8 (15,1 – 20,9)
LDL-P (nmol/l)	455,3 (433,1 – 506,6)	489,8 (445,2 – 508,9)
Grandes (nmol/l)	69,1 ± 8,4	71,9 ± 10,9
Medianas (nmol/l)	173,6 ± 27,3	183,0 ± 29,6
Pequeñas (nmol/l)	221,3 ± 27,7	233,0 ± 24,4
HDL-P (µmol/l)	24,9 ± 2,5	24,2 ± 2,8
Grandes (µmol/l)	0,1 (0,1 – 0,1)	0,1 (0,1 – 0,2)
Medianas (µmol/l)	7,9 ± 1,0	7,6 ± 0,9
Pequeñas (µmol/l)	16,9 ± 2,6	16,5 ± 1,9

Continúa en la página siguiente.

Continuación de la Tabla 7.

ANSIEDAD		
	Bajo (N = 19)	Alto (N = 25)
DIÁMETRO MEDIDO POR RMN		
VLDL (nm)	42,8 ± 0,5	42,8 ± 0,6
LDL (nm)	21,3 ± 0,1	21,2 ± 0,1
HDL (nm)	8,2 ± 0,1	8,2 ± 0,1
CARGA ELÉCTRICA NETA		
VLDL (mV)	-24,3 ± 6,7	-21,1 ± 4,4
IDL (mV)	-18,7 ± 5,9	-16,2 ± 4,7
LDL (mV)	-15,9 ± 3,5	-14,8 ± 3,8
HDL (mV)	-22,0 ± 4,2**	-17,2 ± 4,7**

Datos expresados como media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico).

** $p < 0,01$

Relación entre el perfil lipídico y el tipo de ansiedad

Tabla 8. Correlaciones entre el perfil lipídico y la ansiedad.

ANSIEDAD	Rasgo	Estado
LÍPIDOS TRADICIONALES		
Colesterol total	0,389*	0,273
TG	-0,061	-0,168
LDLc	0,436*	0,294
HDLc	0,174	0,144
Apo AI	0,008	0,065
Apo B100	0,403*	0,223
LÍPIDOS MEDIDOS POR RMN		
VLDL-TG	-0,136	-0,204
IDL-TG	0,016	0,055
LDL-TG	0,203	0,051
HDL-TG	-0,247	-0,102

Continúa en la página siguiente.

Continuación de la Tabla 8.

ANSIEDAD	Rasgo	Estado
LÍPIDOS MEDIDOS POR RMN		
VLDLc	0,019	-0,114
IDLc	0,076	0,104
LDLc	0,526**	0,334*
HDLc	-0,060	0,056
Nº de PARTÍCULAS MEDIDO POR RMN		
VLDL-P	-0,133	-0,174
Grandes	-0,051	-0,116
Medianas	-0,081	-0,267
Pequeñas	-0,120	-0,120
LDL-P	0,508**	0,316
Grandes	0,360*	0,159
Medianas	0,450**	0,282
Pequeñas	0,485**	0,315
HDL-P	-0,124	-0,007
Grandes	-0,195	0,098
Medianas	-0,094	-0,021
Pequeñas	-0,129	-0,003
DIÁMETRO MEDIDO POR RMN		
VLDL	0,091	-0,149
LDL	-0,090	-0,162
HDL	-0,052	-0,054
CARGA ELÉCTRICA NETA		
VLDL	0,220	0,335*
IDL	0,248	0,280
LDL	0,074	0,182
HDL	0,513*	0,482*

Los valores representan los coeficientes de correlación ajustados por edad, IMC, hábito tabáquico, ingesta total de grasas, alcohol y carbohidratos, medicación y actividad física.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

En la Tabla 8 se muestran las correlaciones parciales, ajustadas por edad, IMC, hábito tabáquico, ingesta total de grasas, alcohol y carbohidratos, medicación y actividad física, entre los resultados del STAI y el perfil lipídico tradicional y avanzado.

Por un lado, la ansiedad como rasgo de personalidad correlaciona positivamente con el colesterol total, el LDLc y la Apo B100 medidos por rutina clínica; y el LDLc medido por RMN, el número de partículas LDL total, grandes, medianas y pequeñas; además de la carga eléctrica de la HDL. Por otro lado, la ansiedad como estado no correlaciona con ningún parámetro lipídico medido por rutina clínica; en cambio, sí correlaciona positivamente con el LDLc medido por RMN y con la carga eléctrica de la VLDL y HDL.

Dadas estas correlaciones entre ambos tipos de ansiedad y distintos parámetros lipídicos, se quiso cuantificar la contribución de éstos a la variabilidad de la ansiedad. Para ello se construye un modelo de regresión lineal, tipo hacia adelante, con las características antropométricas y estilo de vida, los lípidos determinados por rutina clínica, el perfil lipídico obtenido por RMN y la carga eléctrica (Tabla 9). Para la ansiedad como rasgo, el modelo determina que el LDLc medido por RMN y la carga eléctrica de la HDL son responsables del 12,3 % y del 30,0 % de su variabilidad, respectivamente. Además, el incremento de 1 unidad en los valores de LDLc y de carga de la HDL aumentaría en 0,5 y 1,4 los puntos obtenidos referentes a la ansiedad como rasgo. En el caso de la ansiedad actual, la carga eléctrica de la HDL explica el 19,4 % de la variabilidad. También, un incremento de 1 mV en la carga eléctrica de la HDL, se reflejará en un aumento de 0,9 puntos referentes a la ansiedad actual en el STAI.

Tabla 9. Modelos de regresión lineal para la variabilidad de la ansiedad.

	Modelo	R²	p-valor
Ansiedad rasgo	LDLc medido por RMN	0,123	0,026
	Carga HDL	0,300	0,001
Ansiedad actual	Carga HDL	0,194	0,010

RMN: Resonancia magnética nuclear

ESTUDIO 2. cIMT y carga eléctrica en LES

En este estudio se intenta demostrar que la **carga eléctrica** de las lipoproteínas contribuye de forma significativa a la **arteriosclerosis subclínica** en pacientes con **LES**. Para ello, se utilizan dos poblaciones, una de 78 pacientes diagnosticados de LES y otra de 32 individuos controles. Se determina la carga eléctrica de cada una de las lipoproteínas y se establece una asociación entre la carga eléctrica de las lipoproteínas y la **cIMT**. Además, se compara la carga entre ambos grupos.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Características de las dos poblaciones de estudio

Los datos referentes a los valores antropométricos, bioquímicos, lípidos tradicionales de rutina clínica y características clínicas de ambas poblaciones se incluyen en la Tabla 10. Brevemente, la distribución de edad y género es similar en ambas poblaciones. En el caso del IMC, no hay diferencias significativas entre ambos grupos, pero si se clasifica a la población según su IMC en peso normal, sobrepeso y obesidad, se observa que el grupo de LES presenta un mayor porcentaje de individuos con obesidad. Además, la presencia de fumadores en el grupo de LES es superior, de forma estadísticamente significativa, al grupo control. Referente a los parámetros bioquímicos, la glucosa, el colesterol total, el LDLc, el HDLc, la Apo AI y la Apo B100 son similares en ambos grupos; en cambio, los TG son superiores en los pacientes con LES ($p = 0,027$). Por otro lado, el marcador de inflamación medido es la PCR ultrasensible (PCRus): a pesar de presentar valores superiores en pacientes con LES, la diferencia entre ambos grupos no llega a ser estadísticamente significativa. En cuanto a la arteriosclerosis subclínica, el valor medio de cIMT es similar en ambas poblaciones, pero se observa que la presencia de placa en el grupo de LES es superior ($p < 0,001$) respecto al grupo control.

Tabla 10. Características de las poblaciones de LES y de controles.

Características	LES	Controles
Edad, años	46,8 ± 16,6	48,6 ± 11,3
Género, % mujeres	92,3*	100
IMC, kg/m²	24,7 (22,6 – 28,9)	24,7 ± 3,1
Normal (IMC < 25), %	51,3*	62,5
Sobrepeso (25 < IMC < 30), %	32,1*	34,4
Obesidad (IMC ≥ 30), %	16,7*	3,1
Tabaquismo, % sí	30,9*	0
cIMT, mm	0,6 (0,5 – 0,7)	0,6 (0,6 – 0,7)
Placa, % presencia	12,8**	0
PCRus, mg/dl	1,5 (0,6 – 3,9)	1,2 (0,5 – 2,3)
Glucosa, mg/dl	88,7 (92,3 – 94,3)	85,1 (78,5 – 93,3)
Colesterol total, mg/dl	190,3 ± 41,2	189,9 ± 31,9
TG, mg/dl	78,8 (54,7 – 107,8)*	58,2 (46,6 – 94,1)
LDLc, mg/dl	108,9 ± 31,0	108,9 ± 31,8
HDLc, mg/dl	63,4 ± 15,5	69,1 ± 15,7
Apo AI, mg/dl	145,0 (137,0 – 156,3)	144,5 (133,3 – 154,0)
Apo B100, mg/dl	86,3 ± 22,4	89,0 ± 21,0
Ratio Apo B100/AI	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2

Datos expresados como media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico, excepto en los casos en los que la variable se expresa como %. IMC; Índice de masa corporal; cIMT: Grosor de la íntima-media carotídea; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; HDLc: Colesterol HDL; LDLc: Colesterol LDL; TG: Triglicéridos; Apo: Apolipoproteína.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Además de los lípidos tradicionales obtenidos en la rutina clínica, también se dispone del estudio avanzado de lípidos por RMN, el cual determina el diámetro y el nº de partículas de cada una de las distintas lipoproteínas. Estos datos se muestran en la Tabla 11.

En este caso, los pacientes con LES presentan menor número de partículas totales de HDL de forma estadísticamente significativa. A pesar de no ser significativo, los pacientes con LES presentan

mayor número de partículas VLDL, tanto totales como de cada una de las subclases obtenidas. Igualmente, presentan mayor número de partículas IDL. Ambos resultados se corresponden con la mayor concentración de TG de los pacientes con LES. Por otro lado, las LDL-P y LDL grandes se encuentran en menor cantidad; sin embargo, los niveles de las más aterógenas (LDL medianas, pequeñas y muy pequeñas) sí son más elevados, a pesar de no llegar a la significación estadística.

Tabla 11. Características del perfil lipídico avanzado por RMN en LES y controles.

	LES	Controles
VLDL-P, nmol/l	36,9 (18,0 – 70,0)	33,5 (24,0 – 56,3)
Grandes, nmol/l	0,5 (0,1 – 1,2)	0,2 (0,1 – 0,7)
Medianas, nmol/l	12,3 (4,4 – 21,3)	9,6 (5,9 – 20,0)
Pequeñas, nmol/l	24,6 (13,8 – 43,8)	25,14 (15,12)
IDL-P, nmol/l	23,5 (7,0 – 59,3)	18,8 (0,7 – 58,7)
LDL-P, nmol/l	1027,5 (833,8 – 1366,3)	970,4 (870,8 – 1339,8)
Grandes, nmol/l	554,3 ± 248,6	575,2 ± 213,7
Mediana, nmol/l	105,0 (24,3 – 162,0)	98,0 (36,8 – 157,6)
Pequeñas, nmol/l	513,0 (113,0 – 805,0)	454,2 (124,0 – 719,4)
Muy pequeñas, nmol/l	402,5 (87,8 – 643,0)	350,5 (103,0 – 564,8)
HDL-P, µmol/l	31,6 ± 5,6*	34,7 ± 5,8
Grandes, µmol/l	9,4 ± 3,7	10,9 ± 3,7
Medianas, µmol/l	1,9 (0,3 – 3,9)	2,6 (0,8 – 4,2)
Pequeñas, µmol/l	19,7 ± 5,2	20,8 ± 5,4
Diámetro VLDL, nm	47,9 (42,4 – 57,1)	47,1 (43,2 – 53,5)
Diámetro LDL, nm	21,4 (21,1 – 22,5)	21,7 (21,2 – 22,4)
Diámetro HDL, nm	9,4 ± 0,5	9,4 ± 0,5

Datos expresados como media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico).

VLDL: *Very low-density lipoprotein*; VLDL-P: Partículas totales de VLDL; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; IDL-P: Partículas totales de IDL; LDL: *Low-density lipoprotein*; LDL-P: Partículas totales de LDL; HDL: *High-density lipoprotein*; HDL-P: Partículas totales de HDL.

* $p < 0,05$

Carga eléctrica neta de las lipoproteínas

Tras determinar la carga eléctrica neta de todas las lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL y HDL) aisladas por ultracentrifugación secuencial en un total de 78 pacientes diagnosticados de LES y 32 individuos control, se obtienen los resultados incluidos en la Figura 18.

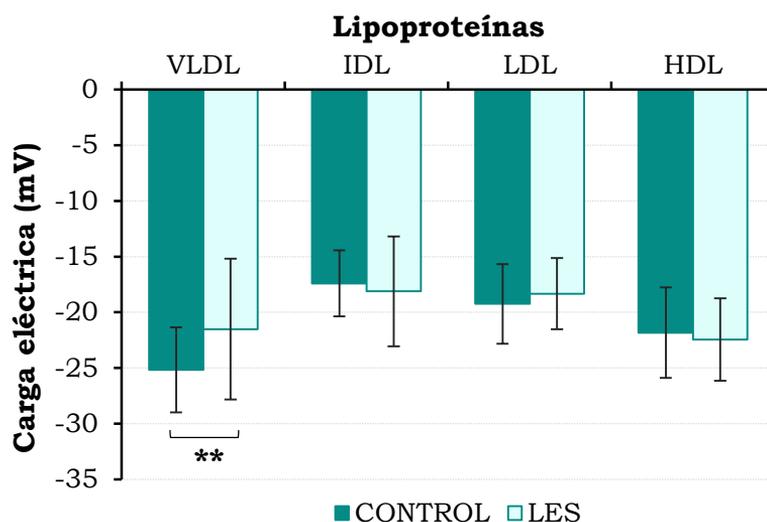


Figura 18. Carga eléctrica de las lipoproteínas de pacientes con LES y controles.

Representación del valor medio y la desviación estándar de la carga eléctrica neta de cada lipoproteína en pacientes diagnosticados de LES y controles.

VLDL: *Very low-density lipoprotein*; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; HDL: *High-density lipoprotein*; mV: Milivoltios.

** $p < 0,01$

Todas las lipoproteínas presentan carga eléctrica neta negativa. En ambas poblaciones, la VLDL y la HDL son las más electronegativas. Para los pacientes con LES, los valores de carga eléctrica de la VLDL, IDL, LDL y HDL expresados como media \pm desviación estándar son $-21,5 \pm 6,3$; $-18,1 \pm 4,9$; $-18,3 \pm 3,2$ y $-22,4 \pm 3,7$ mV, respectivamente. En el caso de los individuos controles son $-25,2 \pm 3,8$; $-17,4 \pm 3,0$; $-19,3 \pm 3,6$ y $-21,8 \pm 4,1$ mV, respectivamente. Al comparar ambos grupos, se observa que la VLDL de los controles es más electronegativa que la de los pacientes con LES ($p = 0,003$).

Durante la realización del estudio, 13 pacientes diagnosticados de lupus presentando manifestaciones de la enfermedad, encontrándose en estado de brote, con lo que se procede a determinar la carga eléctrica de las lipoproteínas. En la Figura 19 se muestra la carga eléctrica de 13 pacientes de LES en estado basal y brote y 32 controles.

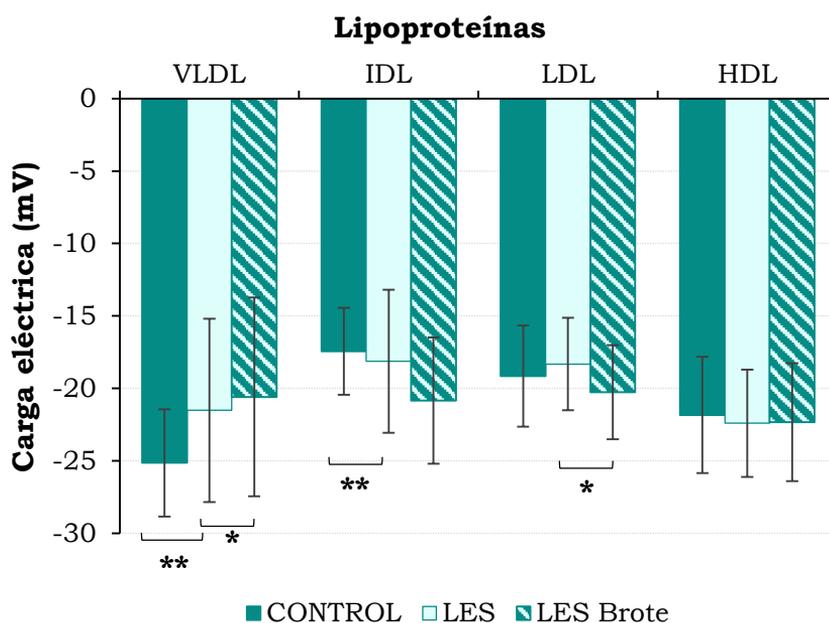


Figura 19. Carga eléctrica de las lipoproteínas de pacientes con LES, LES en estado de brote y controles.

Representación del valor medio y la desviación estándar de la carga eléctrica neta de cada lipoproteína en pacientes diagnosticados de LES, LES en estado de brote y controles.

VLDL: *Very low-density lipoprotein*; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; HDL: *High-density lipoprotein*; mV: Milivoltios.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Además de la carga eléctrica, también se determinó el perfil lipídico tradicional, el cual se muestra en la Tabla 12. Se observa como los pacientes en estado de brote presentan un perfil más aterogénico.

Tabla 12. Perfil lipídico tradicional de los pacientes con LES y LES en Brote.

Características	LES (N=13)	LES Brote (N=13)
Glucosa, mg/dl	81,9 ± 2,0	91,2 ± 3,2
Colesterol total, mg/dl	192,1 (156,0 – 215,0)	198,3 (168,4 – 215,0)
TG, mg/dl	88,4 ± 11,3	120,2 ± 20,6
LDLc, mg/dl	113,1 (88,6 – 129,1)	115,3 (92,1 – 138,2)
HDLc, mg/dl	60,9 ± 3,3	64,8 ± 4,5
Apo AI, mg/dl	134,8 ± 5,7	139,5 ± 7,3
Apo B100, mg/dl	81,0 (70,5 – 99,5)	86,0 (75,5 – 102,5)

Datos expresados como mediana (rango intercuartílico) o media ± desviación estándar.

HDLc: Colesterol HDL; LDLc: Colesterol LDL; TG: Triglicéridos; Apo: Apolipoproteína.

ESTUDIO DE LA cIMT

Relación entre la cIMT y la carga eléctrica neta de las lipoproteínas

En pacientes con LES, la carga eléctrica de la IDL y la LDL correlacionan negativamente con la cIMT ($r = -0,361$; $p = 0,004$; $r = -0,306$; $p = 0,015$, respectivamente), indicando que cuanto más electronegativa es la IDL y la LDL, mayor es el grosor de la íntima-media; en cambio, la VLDL y la HDL no correlacionan de forma estadísticamente significativa. Estas correlaciones fueron ajustadas por edad, género, IMC, hábito tabáquico y PCRus como marcador de inflamación (Tabla 13).

La carga eléctrica neta de las lipoproteínas del grupo control no correlaciona de forma estadísticamente significativa con la cIMT, pero está cerca de la significación la correlación positiva de la carga de la LDL y la cIMT ($r = 0,356$; $p = 0,058$). Las correlaciones también fueron ajustadas por edad, género, IMC, tabaquismo y PCRus como marcador de inflamación (Tabla 13).

Para ver si la correlación entre la carga eléctrica y la cIMT depende del perfil lipídico, también se ajustan las correlaciones por los parámetros lipídicos correspondientes a cada lipoproteína

(Tabla 13). Al hacer este ajuste más restrictivo, las correlaciones entre la carga eléctrica de la IDL y LDL con la cIMT se mantienen, afirmando que dicha relación es independiente de los valores lipídicos, del diámetro y del nº de partículas de las lipoproteínas.

Tabla 13. Correlaciones entre la carga eléctrica neta de las lipoproteínas y la cIMT en pacientes con LES y controles.

	LES		Controles	
	r	p	r	p
Carga neta VLDL¹	-0,172	0,177	-0,255	0,182
Carga neta VLDL²	-0,132	0,316	-0,234	0,241
Carga neta IDL¹	-0,361**	0,004	-0,087	0,653
Carga neta IDL³	-0,290*	0,022	-0,120	0,535
Carga neta LDL¹	-0,306*	0,015	0,356	0,058
Carga neta LDL⁴	-0,313*	0,015	0,294	0,137
Carga neta HDL¹	0,035	0,786	0,143	0,458
Carga neta HDL⁵	0,060	0,651	0,147	0,482

1: Valores ajustados por edad, género, IMC, hábito tabáquico y PCRus.

2: Modelo 1 y TG, diámetro de VLDL y VLDL-P.

3: Modelo 1 y IDL-P.

4: Modelo 1 y LDLc, diámetro de las LDL y LDL-P.

5: Modelo 1 y Apo A1, HDLc, diámetro de las HDL y HDL-P.

VLDL: *Very low-density lipoprotein*; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; HDL: *High-density lipoprotein*; IMC: Índice de masa corporal; PCRus: PCR ultrasensible; VLDL-P: Partículas VLDL; IDL-P: Partículas IDL; LDL-P: Partículas LDL; HDL-P: Partículas HDL; LDLc: colesterol LDL; HDLc: colesterol HDL; Apo: Apolipoproteína.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Posteriormente, se analizan las posibles variables predictoras de la cIMT en el LES mediante un modelo de regresión por pasos. Se analizaron todas las variables disponibles (edad, género, IMC, hábito tabáquico, PCRus, perfil lipídico tradicional de rutina clínica y avanzado determinado por RMN y carga eléctrica neta de las lipoproteínas). Los resultados se muestran en la Tabla 14.

El modelo de regresión indica que la mejor variable predictora es la edad, explicando el 33,6 % de la variabilidad general de la cIMT

en el LES. También, las IDL-P son un predictor independiente de cIMT como ya se obtuvo en estudios previos [191], representando en este caso un aumento significativo de la variabilidad general del 7,9 %. Cabe destacar que la predicción de la carga neta de las IDL pierde la significancia estadística al introducir las IDL-P en el modelo debido a la existencia de una correlación entre ambas ($r = -0,311$; $p = 0,013$, incluso teniendo en cuenta la edad, el IMC, el género, el tabaquismo y los niveles de PCRus), siendo, por tanto, las IDL-P la responsable directa de dicho efecto. Por otro lado, la carga neta de las LDL representa una variabilidad del 4,0 %. En general, la variabilidad de la cIMT explicada en el LES fue del 42,9 %.

Tabla 14. Predictores independientes de la cIMT en LES.

	R²	Cambio en R²	p-valor
Edad	0,336		<0,001
IDL-P	0,396	0,079	0,004
Carga neta LDL	0,429	0,040	0,035

IDL-P: Partículas totales de IDL; LDL: *Low-density lipoprotein*.

Los análisis de regresión lineal demuestran una correlación positiva significativa entre las IDL-P y la cIMT, y otra negativa entre la carga neta de las LDL y la cIMT en pacientes con LES. El coeficiente β del modelo de regresión multivariable muestra que una disminución de 1 mV en la carga neta de LDL se asocia significativamente con un aumento de 0,01 mm en la cIMT. Este efecto se ajustó por factores de confusión potenciales (edad, género, IMC, hábito tabáquico, colesterol total, LDLc, HDLc, TG, apolipoproteínas, diámetro y n° de partículas y niveles de PCRus).

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE PLACA

Paralelamente, se hace un estudio teniendo en cuenta la presencia o no de placa de ateroma. Para ello se divide la población de LES en función de si presentan placa o no; considerando como placa valores de la cIMT máxima > 1,4 mm.

Características de los pacientes con LES con y sin placa

Las características antropométricas, clínicas y bioquímicas, el perfil lipídico y carga eléctrica neta se muestran en la Tabla 15. Brevemente, la edad, el IMC, la cIMT, la glucosa y los TG son mayores en pacientes con LES con placa. Por otra parte, el grupo con placa presenta un perfil de lipoproteínas obtenido por RMN más aterogénico. Concretamente, presentan niveles más de VLDL-P, siendo estadísticamente significativos el número total de VLDL-P y VLDL medianas; las IDL-P y las LDL-P, en particular, las LDL más aterogénicas, LDL pequeñas y muy pequeñas. Esto es consistente con el menor diámetro de LDL en el mismo grupo. También hay diferencia estadísticamente significativa en cuanto a las HDL-P grandes, al diámetro de las LDL y HDL. En cuanto a la carga eléctrica, hay una tendencia a que las lipoproteínas de los pacientes con placa sean más electronegativas

Tabla 15. Características de los pacientes con LES con y sin placa.

Características	Placa (N=10)	No Placa (N=68)
Edad, años	56,9 ± 14,7*	45,4 ± 16,5
Género, % mujeres	90,0*	92,6
IMC, kg/m²	28,1 (23,5 – 30,7)*	24,3 (22,4 – 28,4)
Normal (IMC < 25), %	30,0*	54,4
Sobrepeso (25 < IMC < 30), %	40,0*	30,9
Obesidad (IMC ≥ 30), %	30,0*	14,7
Tabaquismo, % sí	16,7*	32,3
cIMT, mm	0,9 ± 0,3**	0,6 ± 0,1
PCRus, mg/dl	1,9 (1,2 – 4,0)	1,4 (0,6 – 3,9)
Glucosa, mg/dl	98,3 ± 10,0**	87,3 ± 9,6
Colesterol total, mg/dl	190,5 ± 34,6	190,2 ± 42,3
TG, mg/dl	112,9 ± 40,5*	86,7 ± 48,6
LDLc, mg/dl	111,2 ± 24,9	108,6 ± 31,9
HDLc, mg/dl	56,8 ± 14,3	64,3 ± 15,5
Apo AI, mg/dl	137,4 ± 23,8	147,3 ± 17,6
Apo B100, mg/dl	88,8 ± 16,2	85,9 ± 23,3

Continúa en la página siguiente.

Continuación de la Tabla 15.

Análisis por RMN	Placa (N=6)	No Placa (N=62)
VLDL-P, nmol/l	82,6 ± 51,8*	46,1 ± 39,8
Grandes, nmol/l	0,8 (0,5 – 4,1)	0,3 (0,1 – 1,1)
Medianas, nmol/l	33,7 ± 26,4*	16,6 ± 20,9
Pequeñas, nmol/l	46,8 ± 27,6	28,6 ± 22,3
IDL-P, nmol/l	65,0 (51,0 – 137,5)**	20,0 (6,8 – 54,3)
LDL-P, nmol/l	1377,0 ± 266,7*	1086,9 ± 390,7
Grandes, nmol/l	415,7 ± 202,4	567,7 ± 249,9
Medianas, nmol/l	166,5 ± 64,4	102,7 ± 87,9
Pequeñas, nmol/l	858,2 ± 289,3*	481,3 ± 419,4
Muy pequeñas, nmol/l	691,7 ± 225,4*	378,6 ± 334,7
HDL-P, µmol/l	31,2 ± 3,3	31,7 ± 5,8
Grandes, µmol/l	6,8 ± 2,3*	9,7 ± 3,7
Medianas, µmol/l	1,0 (0,1 – 7,2)	2,0 (0,4 – 3,7)
Pequeñas, µmol/l	21,7 ± 2,0	19,5 ± 5,4
Diámetro VLDL, nm	45,7 ± 7,2	51,6 ± 11,3
Diámetro LDL, nm	20,8 ± 0,5*	21,7 ± 0,9
Diámetro HDL, nm	8,9 ± 0,2*	9,4 ± 0,5
Carga	Placa (N=10)	No Placa (N=68)
VLDL, mV	-24,1 ± 6,6	-21,1 ± 6,2
IDL, mV	-19,5 ± 4,2	-17,9 ± 5,0
LDL, mV	-19,8 ± 3,5	-18,1 ± 3,1
HDL, mV	-23,7 ± 3,4	-22,2 ± 3,7

Datos expresados como media ± desviación estándar o mediana (rango intercuartílico), excepto en los que a variable se expresa como %.

IMC; Índice de masa corporal; cIMT: Grosor de la íntima-media carotídea; PCRus: Proteína C reactiva ultrasensible; TG: Triglicéridos; HDLc: Colesterol HDL; LDLc: Colesterol LDL; Apo: Apolipoproteína; VLDL: *Very low-density lipoprotein*; VLDL-P: Partículas totales VLDL; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; IDL-P: Partículas totales IDL; LDL: *Low-density lipoprotein*; LDL-P: Partículas totales LDL; HDL: *High-density lipoprotein*; HDL-P: Partículas totales HDL.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

ESTUDIO 3. Glicofomas de Apo CIII

El objetivo principal de este estudio es determinar las distintas **glicofomas de Apo CIII**, diferenciadas principalmente en función de su contenido de ácido siálico, y el posible efecto de éstas sobre el **perfil lipídico** en una población sana. Para ello, se reclutan a 25 hombres jóvenes, mayores de 18 años y aparentemente sanos y se determina el perfil lipídico tradicional y avanzado por RMN (diámetro y número de partículas), las distintas glicofomas de Apo CIII en plasma y cada una de las lipoproteínas, y se establecen asociaciones entre las distintas glicofomas de Apo CIII y el perfil lipídico.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Características descriptivas de la población

Antes de comenzar, cabe mencionar que una vez analizado el perfil lipídico tradicional, se descarta a un individuo por presentar valores elevados de TG, con lo cual, el estudio sigue adelante con un total de 24 individuos. Las características antropométricas y de estilo de vida de la población se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Características antropométricas y de estilo de vida de la población del estudio de Apo CIII.

Características	N=24
Edad, años	25,2 ±5,0
IMC, kg/m²	23,2 ± 2,3
Normal (IMC < 25), %	70,8
Sobrepeso (25 < IMC < 30), %	29,2
Obesidad (IMC > 30), %	0,0
Tabaquismo, % sí	20,8
Ejercicio físico, % sí	100,0

Datos expresados como media ± desviación estándar, excepto en los que a variable se expresa como %.

En la Tabla 17 se muestran los valores de los parámetros del perfil lipídico tanto tradicional, obtenido por rutina clínica, como avanzado, obtenido por RMN.

Tabla 17. Perfil lipídico tradicional y avanzado obtenido por RMN de la población del estudio de Apo CIII.

Características	N=24
LÍPIDOS TRADICIONALES	
Colesterol total, mg/dl	168,4 ± 22,5
TG, mg/dl	80,7 ± 20,0
LDLc, mg/dl	91,2 ± 22,4
HDLc, mg/dl	58,1 (52,2 – 69,4)
Apo AI, mg/dl	139,7 ± 18,8
Apo B100, mg/dl	78,9 ± 16,6
Apo CIII, mg/dl	7,5 ± 2,7
LÍPIDOS MEDIDOS POR RMN	
VLDL-TG (mg/dl)	40,9 ± 11,5
IDL-TG (mg/dl)	5,7 ± 1,1
LDL-TG (mg/dl)	7,4 ± 2,1
HDL-TG (mg/dl)	6,8 ± 1,7
VLDLc (mg/dl)	3,9 (1,9 – 6,2)
IDLc (mg/dl)	3,7 ± 1,7
LDLc (mg/dl)	92,1 ± 15,6
HDLc (mg/dl)	62,1 (57,7 – 69,3)
Nº de PARTÍCULAS MEDIDO POR RMN	
VLDL-P(nmol/l)	25,1 ± 7,2
Grandes (nmol/l)	0,8 ± 0,3
Medianas (nmol/l)	4,1 ± 1,2
Pequeñas (nmol/l)	20,2 ± 5,8
LDL-P (nmol/l)	614,8 (514,3 – 677,6)
Grandes (nmol/l)	88,2 ± 15,6
Medianas (nmol/l)	220,5 ± 43,2
Pequeñas (nmol/l)	306,6 (285,4 – 349,8)

Continúa en la página siguiente.

Continuación de la Tabla 17.

HDL-P ($\mu\text{mol/l}$)	28,9 (27,0 – 32,3)
Grandes ($\mu\text{mol/l}$)	0,1 (0,1 – 0,2)
Medianas ($\mu\text{mol/l}$)	9,4 \pm 1,6
Pequeñas ($\mu\text{mol/l}$)	20,4 \pm 2,2

DIÁMETRO MEDIDO POR RMN

VLDL (nm)	42,5 \pm 0,3
LDL (nm)	21,1 (21,1 – 21,2)
HDL (nm)	8,2 \pm 0,0

Datos expresados como media \pm desviación estándar o mediana (rango intercuartílico), excepto en los que a variable se expresa como %.

TG: triglicéridos; HDLc: colesterol HDL; LDLc: colesterol LDL; Apo: apolipoproteína; VLDL-P: Partículas totales de VLDL; VLDL: *Very low-density lipoprotein*; IDL-P: Partículas totales de IDL; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; LDL-P: Partículas totales de LDL; HDL: *High-density lipoprotein*; HDL-P: Partículas totales de HDL.

Los resultados obtenidos corroboran que se trata de una población compuesta por individuos jóvenes, sanos y con hábitos de vida saludables.

Glicofomas de Apo CIII

Respecto a las glicofomas de Apo CIII, se han podido detectar siete formas diferentes: Apo CIII-0a (nativa), Apo CIII-0b (glicosilada con una galactosa y una N-acetilgalactosamina), Apo CIII-0f (nativa con una galactosa, dos N-Acetilgalactosaminas y tres fucosas), Apo CIII-1 (un ácido siálico), Apo CIII-1d (Apo CIII-1 sin una alanina), Apo CIII-2 (dos ácidos siálicos), Apo CIII-2d (Apo CIII-2 sin una alanina). La proporción relativa en la que cada una de ellas se encuentra en nuestra población de estudio se muestra en la Figura 20.

Todas las glicofomas se han podido detectar en los 24 individuos, a excepción de la Apo CIII-0f, que sólo se ha detectado en 20 de ellos, ya que es la menos abundante. Además, se observa que la distribución relativa de todas las glicofomas se mantiene constante en el plasma y las cuatro lipoproteínas, siendo la Apo CIII-1 la más abundante, seguida de la CIII-2 y la CIII-0b.

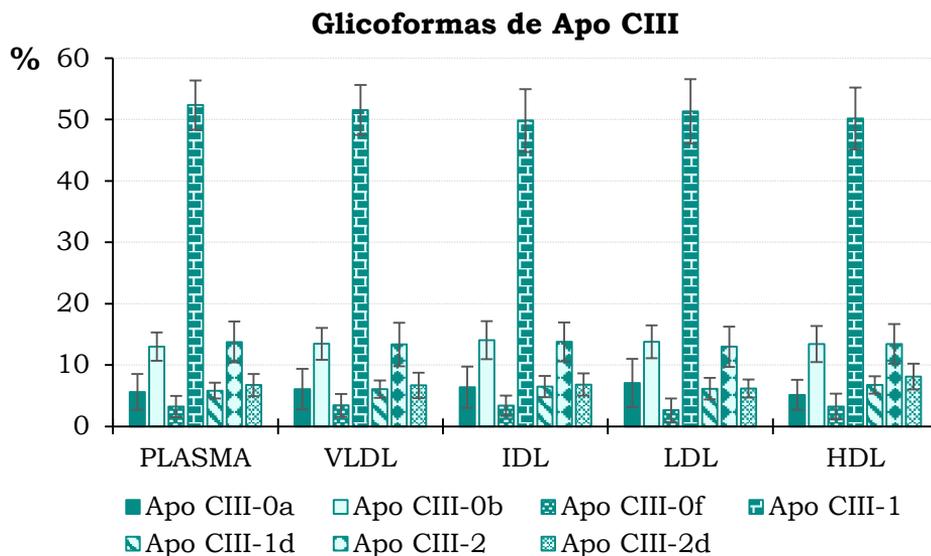
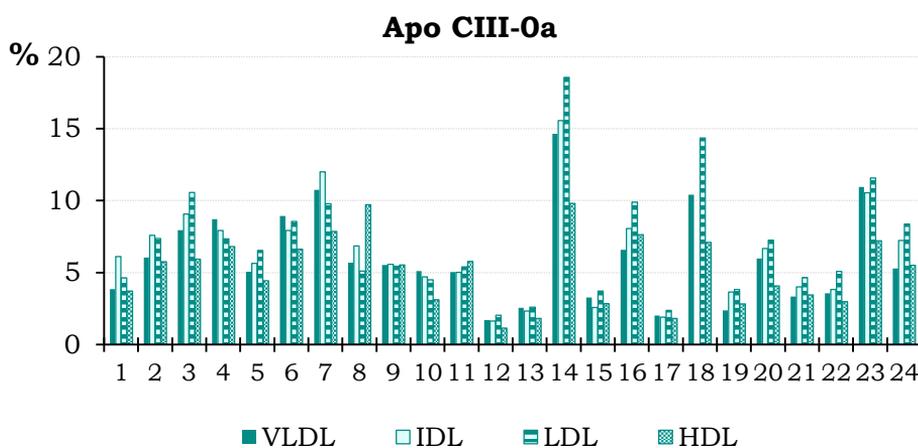
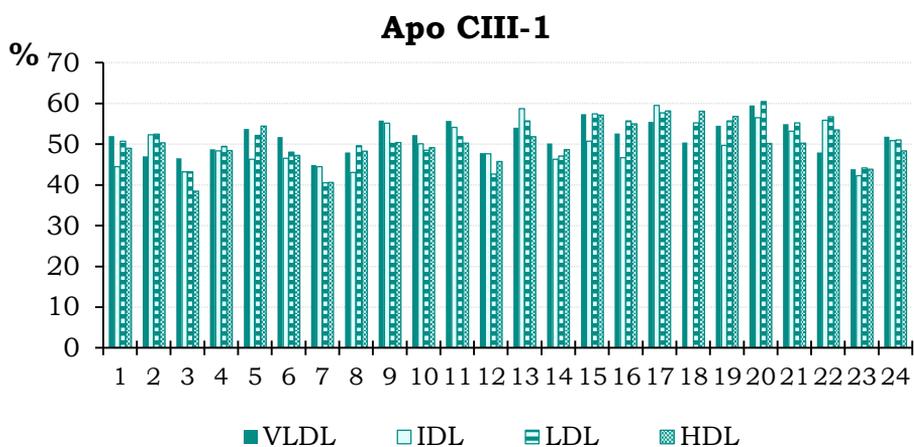
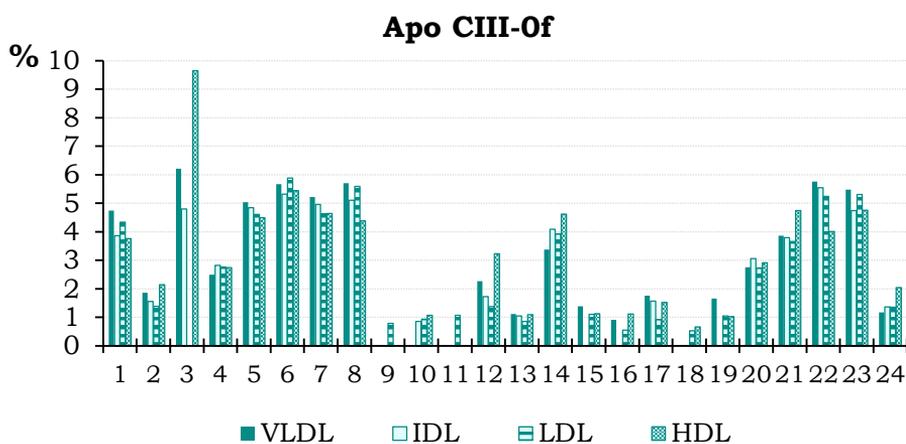
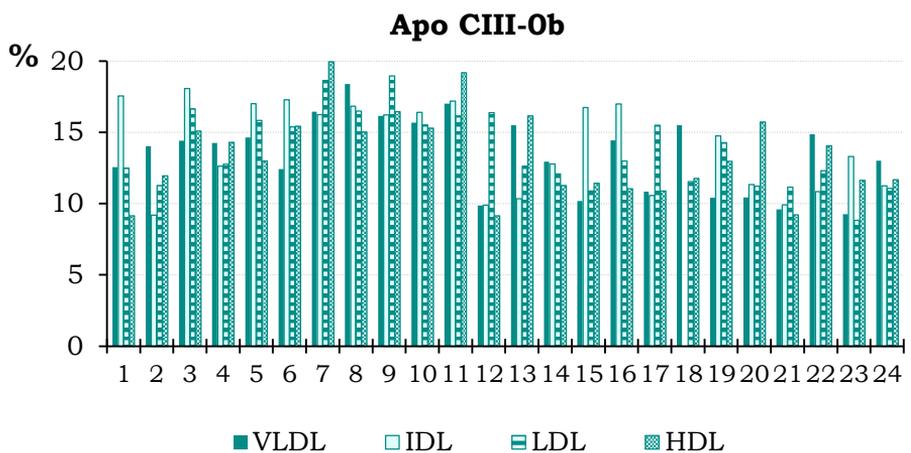


Figura 20. Distribución de las siete glicoformas de Apo CIII en la población de estudio.

Por otro lado, si se analizan los datos individualmente, se observa la existencia de una alta variabilidad interindividual de la distribución relativa de las glicoformas de Apo CIII detectadas (Figura 21); sin embargo, la proporción de cada una de ellas en las lipoproteínas se suele mantener, al igual que pasa a nivel poblacional.





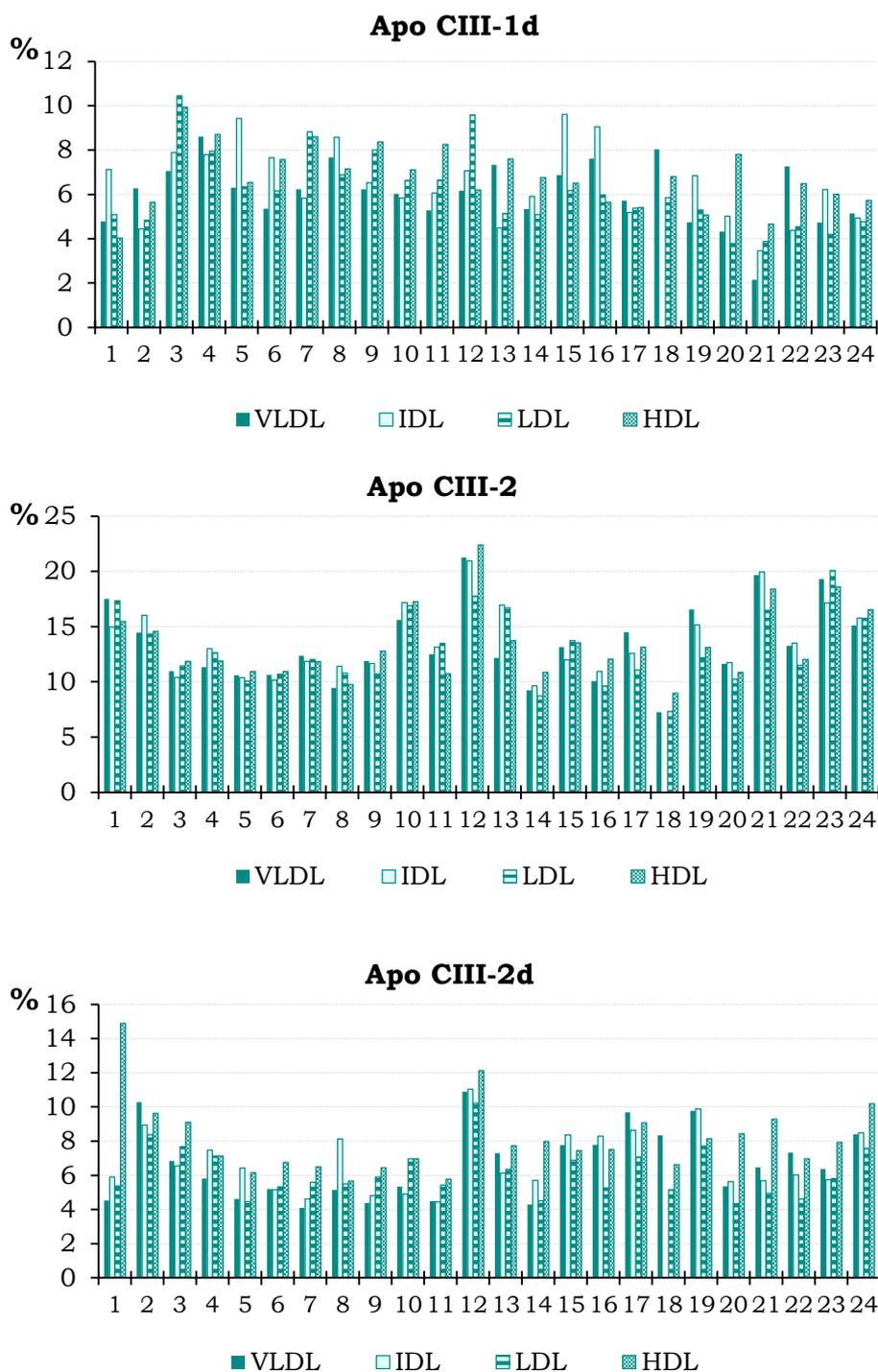


Figura 21. Distribución relativa de las glicofomas de Apo CIII en las lipoproteínas de cada individuo.

Relación de las glicofomas de Apo CIII, los TG y las TRL

Al explorar las posibles asociaciones entre las glicofomas de Apo CIII con los TG y las TRL, se observa que la Apo CIII-0b, tanto plasmática como la detectada en la fracción lipoproteica VLDL, es la única que correlaciona de forma estadísticamente significativa con los TG del plasma obtenidos por rutina clínica (Tabla 18). Dicha correlación es negativa, es decir, a mayor contenido relativo de Apo CIII-0b, niveles más bajos de TG. A pesar de que las demás glicofomas no correlacionan de forma estadísticamente significativa con los TG, es importante destacar que algunas presentan asociaciones positivas (CIII-0a, CIII-0f, CIII-2 y CIII-2d) y otras negativas (CIII-1 y CIII-1d).

En cuanto a las TRL, se observan diferentes correlaciones estadísticamente significativas entre la Apo CIII-0b y los TG y el número de partículas VLDL, las cuales también se recogen en la Tabla 18. En relación con el diámetro medio de las VLDL y los TG, no se observan asociaciones estadísticamente significativas.

Tabla 18. Correlaciones entre la glicofoma Apo CIII-0b, los TG y las TRL.

	CIII-0b plasma	CIII-0b VLDL
Plasma-TG	-0,563**	-0,452*
VLDL-TG	-0,565**	-0,625**
VLDL-P	-0,531**	-0,601**
Grandes	-0,635**	-0,569**
Medianas	-0,604**	-0,601**
Pequeñas	-0,500*	-0,591**

Los valores representan los coeficientes de correlación de Pearson o Spearman, en función de la normalidad de las variables.

TG: Triglicéridos; VLDL: *Very low-density lipoprotein*; VLDL-P: Partículas totales de VLDL.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Además, al realizar un *heatmap* de correlaciones, se pueden apreciar diferentes clústeres que agrupan a los individuos en función del comportamiento de sus glicofomas de Apo CIII respecto a los TG (Figura 22).

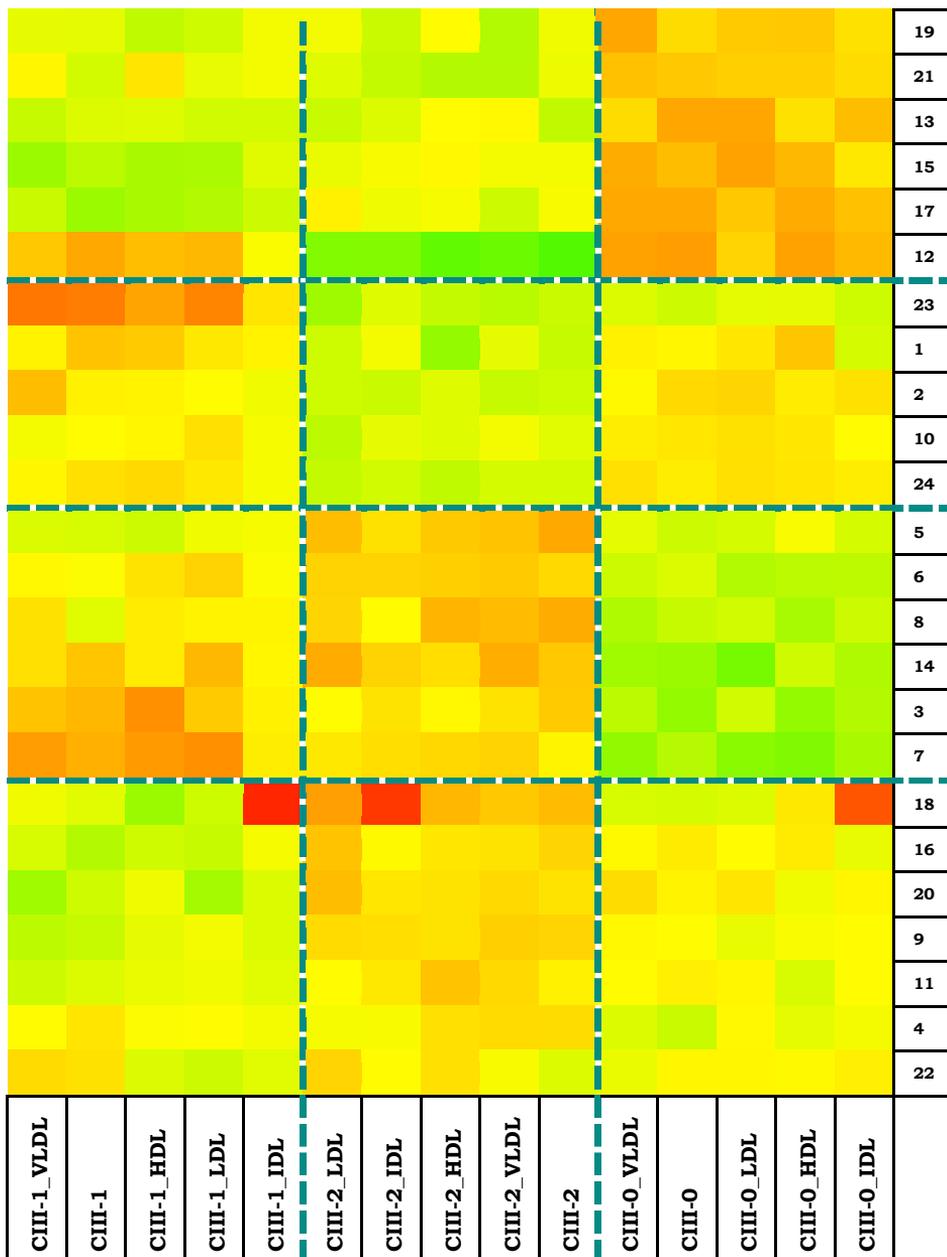
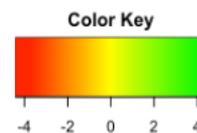


Figura 22. Heatmap de correlaciones entre los TG y las glicofomas de Apo CIII.

VLDL: *Very low-density lipoprotein*; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*;
 LDL: *Low-density lipoprotein*; HDL: *High-density lipoprotein*.



Relación de las glicofomas de Apo CIII con el perfil lipídico completo

Aparte de la conocida relación de la Apo CIII y el metabolismo de los TG, también se han explorado las posibles relaciones de las glicofomas de Apo CIII y el resto de componentes del metabolismo lipídico, como son el colesterol, LDLc, HDLc y resto de partículas lipoproteicas.

En primer lugar, la Apo CIII-0a correlaciona positivamente con el colesterol total ($r = 0,455$; $p = 0,025$), el LDLc ($r = 0,425$; $p = 0,039$) y la Apo B100 ($r = 0,421$; $p = 0,041$). Respecto a la Apo CIII-0b, además de los resultados previamente mostrados en relación a los TG y TRL, esta glicofoma también correlaciona con el HDLc ($r = 0,430$; $p = 0,036$), la Apo AI ($r = 0,468$; $p = 0,021$), el número de partículas totales de HDL ($r = 0,419$; $p = 0,041$), las medianas ($r = 0,510$; $p = 0,011$) y las pequeñas ($r = 0,461$; $p = 0,005$). Sin embargo, estas correlaciones pierden la significancia estadística si los valores de TG plasmáticos se tienen en cuenta al realizar correlaciones parciales, debido a la asociación de los TG con estas variables.

En segundo lugar, la Apo CIII-2 correlaciona negativamente con el HDLc ($r = -0,448$; $p = 0,032$), la Apo AI ($r = -0,457$; $p = 0,028$) y el número de partículas HDL pequeñas ($r = -0,461$; $p = 0,027$) de forma independiente de los niveles plasmáticos de TG.

Por último, el contenido de Apo CIII-0f en las HDL correlaciona con los TG ($r = 0,456$; $p = 0,033$).

ESTUDIO 4. LPS y sus componentes

El objetivo principal de este estudio es determinar el contenido de **LPS** total y de sus **componentes** en plasma y en las distintas lipoproteínas. Para llevarlo a cabo, se reclutan hombres jóvenes y aparentemente sanos a los que se les cuantifica el contenido total de LPS y de sus componentes (**3-OH FAs**), tanto en plasma como en cada lipoproteína. Además, se determina el **perfil lipídico tradicional** y el **avanzado**, consistente en la cuantificación del número de partículas de lipoproteínas, su clasificación en distintas subclases, así como la obtención del diámetro medio de éstas mediante **RMN**. Finalmente, se establecen asociaciones entre el LPS y sus componentes y el perfil lipídico.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Características descriptivas de la población

Antes de comenzar, cabe mencionar que se descarta a un individuo por presentar valores elevados de TG y a otros dos por presentar valores muy elevados de LPS respecto al resto de la población. Por consiguiente, el estudio sigue adelante con un total de 22 hombres. Sus características antropométricas y de estilo de vida se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Características antropométricas y de estilo de vida de la población del estudio de LPS.

Características	N=22
Edad, años	25,5 ± 5,1
IMC, kg/m ²	23,3 ± 2,4
Normal (IMC < 25), %	68,2
Sobrepeso (25 < IMC < 30), %	31,8
Obesidad (IMC > 30), %	0,0
Tabaquismo, % sí	22,7
Ejercicio físico, % sí	100,0

Datos expresados como media ± desviación estándar, excepto en los que a variable se expresa como %.

En la Tabla 20 se muestran los valores del perfil lipídico tradicional, obtenido por rutina clínica, y del perfil lipídico avanzado, obtenido por RMN.

Tabla 20. Perfil lipídico tradicional y avanzado obtenido por RMN de la población del estudio de LPS.

Características	N=22
LÍPIDOS TRADICIONALES	
Colesterol total, mg/dl	170,5 ± 22,2
TG, mg/dl	79,7 ± 19,2
LDLc, mg/dl	92,1 ± 23,2
HDLc, mg/dl	58,5 (52,8 – 70,8)
Apo AI, mg/dl	142,0 ± 17,8
Apo B100, mg/dl	79,0 ± 17,2
Apo CIII, mg/dl	7,6 ± 2,8
LÍPIDOS MEDIDOS POR RMN	
VLDL-TG (mg/dl)	40,3 ± 10,9
IDL-TG (mg/dl)	5,5 ± 1,1
LDL-TG (mg/dl)	7,3 ± 2,2
HDL-TG (mg/dl)	6,6 ± 1,6
VLDLc (mg/dl)	3,9 (1,9 – 6,2)
IDLc (mg/dl)	3,5 ± 1,6
LDLc (mg/dl)	91,9 ± 16,2
HDLc (mg/dl)	63,1 (57,9 – 70,0)
Nº de PARTÍCULAS MEDIDO POR RMN	
VLDL-P(nmol/l)	24,7 ± 6,6
Grandes (nmol/l)	0,8 ± 0,3
Medianas (nmol/l)	4,1 ± 1,2
Pequeñas (nmol/l)	19,9 ± 5,2
LDL-P (nmol/l)	610,7 (536,1 – 679,6)
Grandes (nmol/l)	88,3 ± 16,3
Medianas (nmol/l)	219,4 ± 45,1
Pequeñas (nmol/l)	306,6 (283,6 – 345,3)

[Continúa en la página siguiente](#)

Continuación de la Tabla 20.

HDL-P ($\mu\text{mol/l}$)	30,0 (27,1 – 32,6)
Grandes ($\mu\text{mol/l}$)	0,1 (0,1 – 0,2)
Medianas ($\mu\text{mol/l}$)	9,5 \pm 1,6
Pequeñas ($\mu\text{mol/l}$)	20,6 \pm 2,2
DIÁMETRO MEDIDO POR RMN	
VLDL (nm)	42,5 \pm 0,3
LDL (nm)	21,1 (21,0 – 21,2)
HDL (nm)	8,2 \pm 0,0

Datos expresados como media \pm desviación estándar o mediana (rango intercuartílico), excepto en los que a variable se expresa como %.

TG: triglicéridos; HDLc: colesterol HDL; LDLc: colesterol LDL; Apo: apolipoproteína; VLDL: *Very low-density lipoprotein*; VLDL-P: Partículas totales de VLDL; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; IDL-P: Partículas totales de IDL; LDL: *Low-density lipoprotein*; LDL-P: Partículas totales de LDL; HDL: *High-density lipoprotein*; HDL-P: Partículas totales de HDL.

Descripción del LPS y sus componentes (3-OH FAs) y su distribución en las lipoproteínas

Son seis componentes del LPS los que se han detectado, consistentes en **ácidos grasos 3-hidroxilo conjugados o conjugated 3-hydroxy fatty acids**: 3-OH C8:0 (ácido caprílico), 3-OH C10:0 (ácido cáprico), 3-OH C12:0 (ácido láurico), 3-OH C14:0 (ácido mirístico), 3-OH C16:0 (ácido palmítico) y 3-OH C18:0 (ácido esteárico). La distribución del LPS y de todos los 3-OH FAs detectados es diferente en plasma y en las distintas lipoproteínas, como se muestra en la Figura 23. Brevemente, el 3-OH C10:0 es el más abundante en plasma, pero esto no ocurre en las lipoproteínas, en las cuales a veces el mayoritario es el 3-OH C8:0 (en VLDL y IDL), y otras veces es el 3-OH C16:0 (en LDL y HDL). En cuanto al LPS total, la fracción lipoproteica que contiene mayor cantidad de LPS es la LDL, seguida de la HDL; las fracciones VLDL e IDL presentan un contenido similar de LPS.

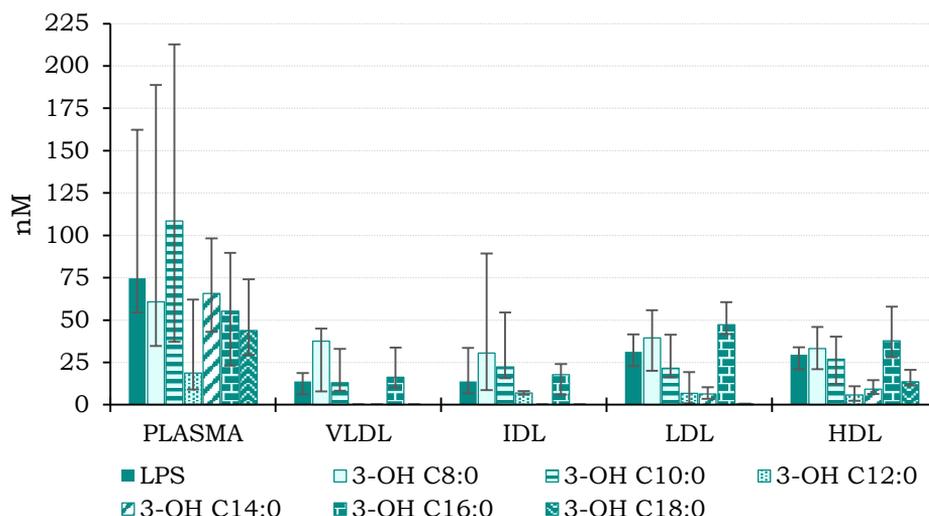


Figura 23. Distribución de LPS y sus componentes en plasma y las lipoproteínas.

Datos representados como mediana y rango intercuartílico.

VLDL: *Very low-density lipoprotein*; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; HDL: *High-density lipoprotein*. LPS: lipopolisacárido; 3-OH C8:0: ácido caprílico; 3-OH C10:0: ácido cáprico; 3-OH C12:0: ácido láurico; 3-OH C14:0: ácido mirístico; 3-OH C16:0: ácido palmítico; 3-OH C18:0: ácido esteárico.

A pesar de encontrar mayor cantidad de LPS en la fracción LDL, si tenemos en cuenta el número de partículas de cada lipoproteína, son las partículas VLDL las que transportan un mayor número de moléculas de LPS por partícula (Figura 24).

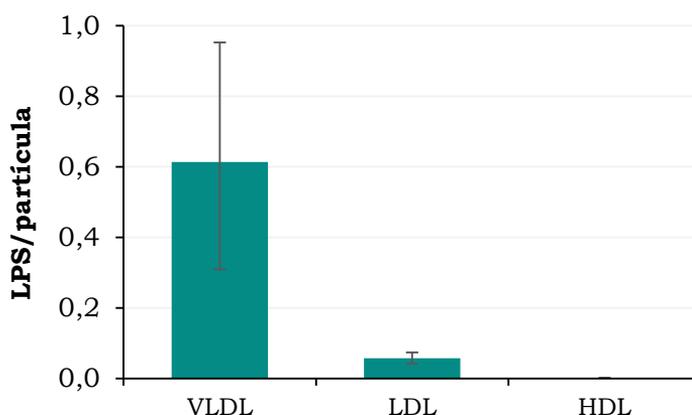
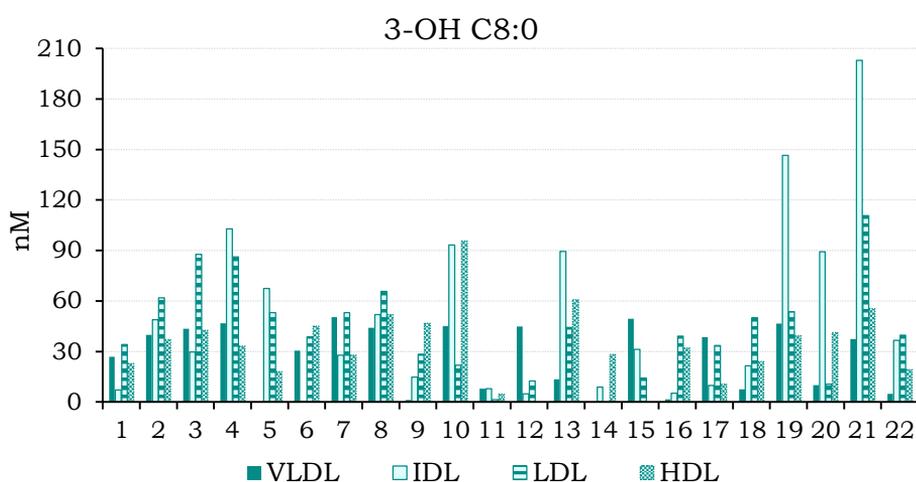
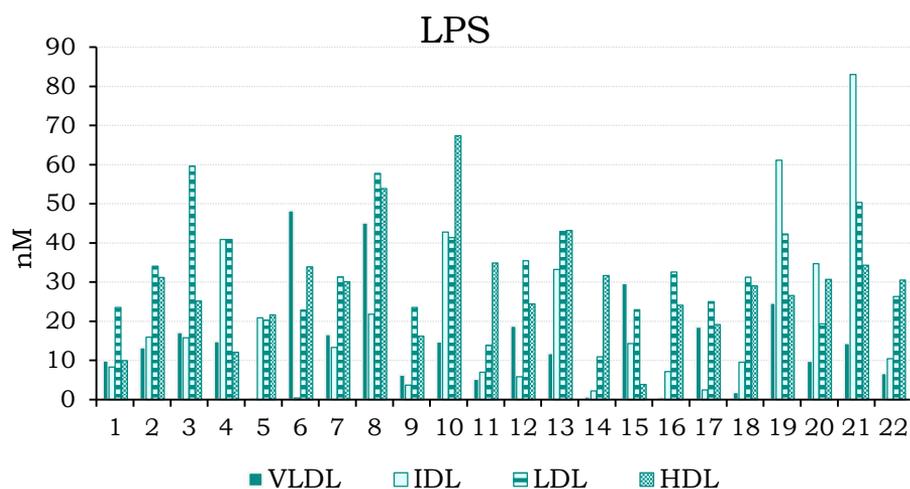
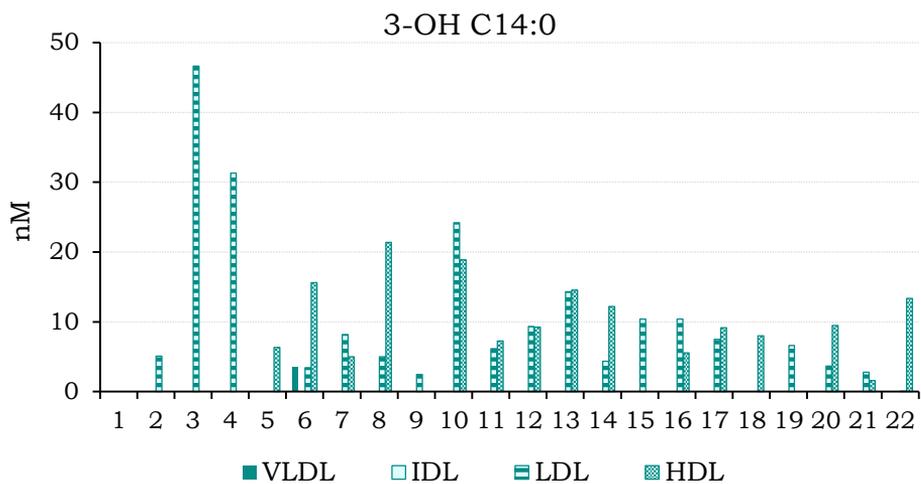
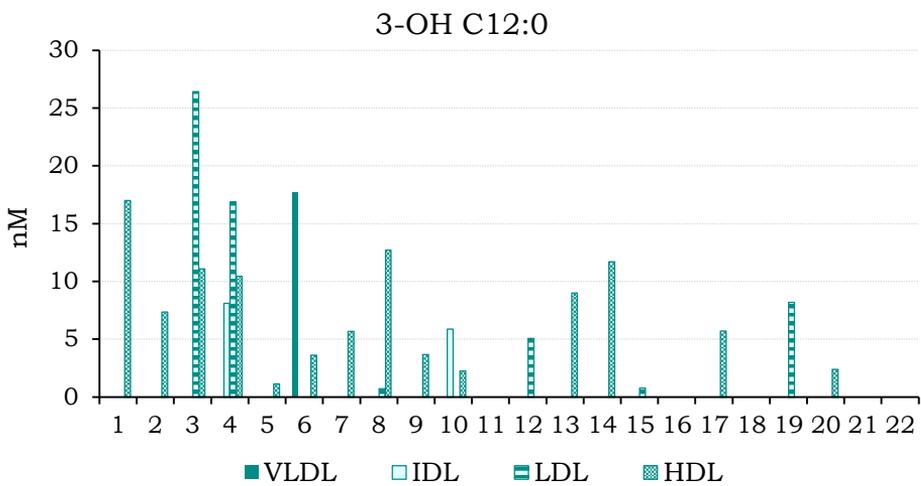
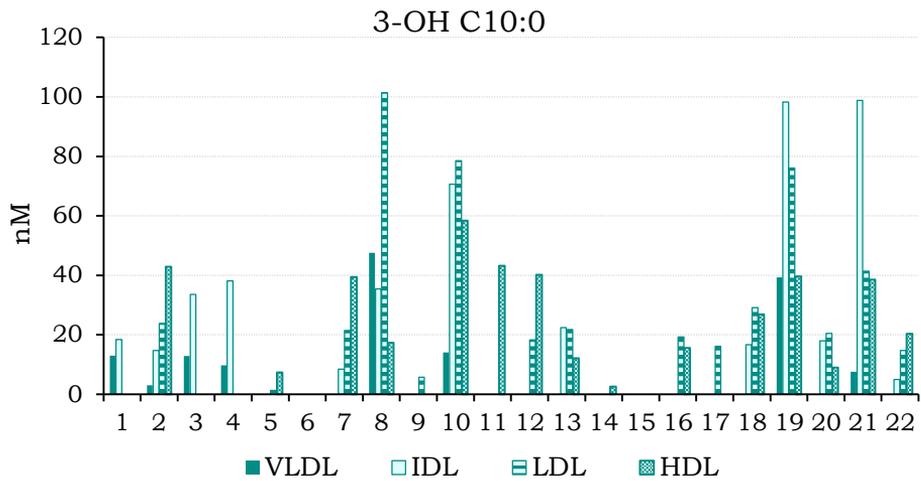


Figura 24. Número de moléculas de LPS por cada partícula lipoproteica.

Si en vez de tener en cuenta la distribución a nivel poblacional, la estudiamos individualmente, se observa una gran variabilidad interindividual del contenido de LPS y de sus componentes. Al mismo tiempo, se observa que no todos los 3-OH FAs detectados están presentes en todos los individuos o en todas las lipoproteínas (Figura 25). Por ejemplo, el 3-OH C18:0 es el menos abundante, detectándose en la fracción HDL de 17 individuos y también en las fracciones VLDL y LDL en dos de ellos. Por otro lado, el 3-OH C8:0 es el mayoritario en cuanto a cantidad, número de individuos que lo presentan y lipoproteínas en las que se encuentra.





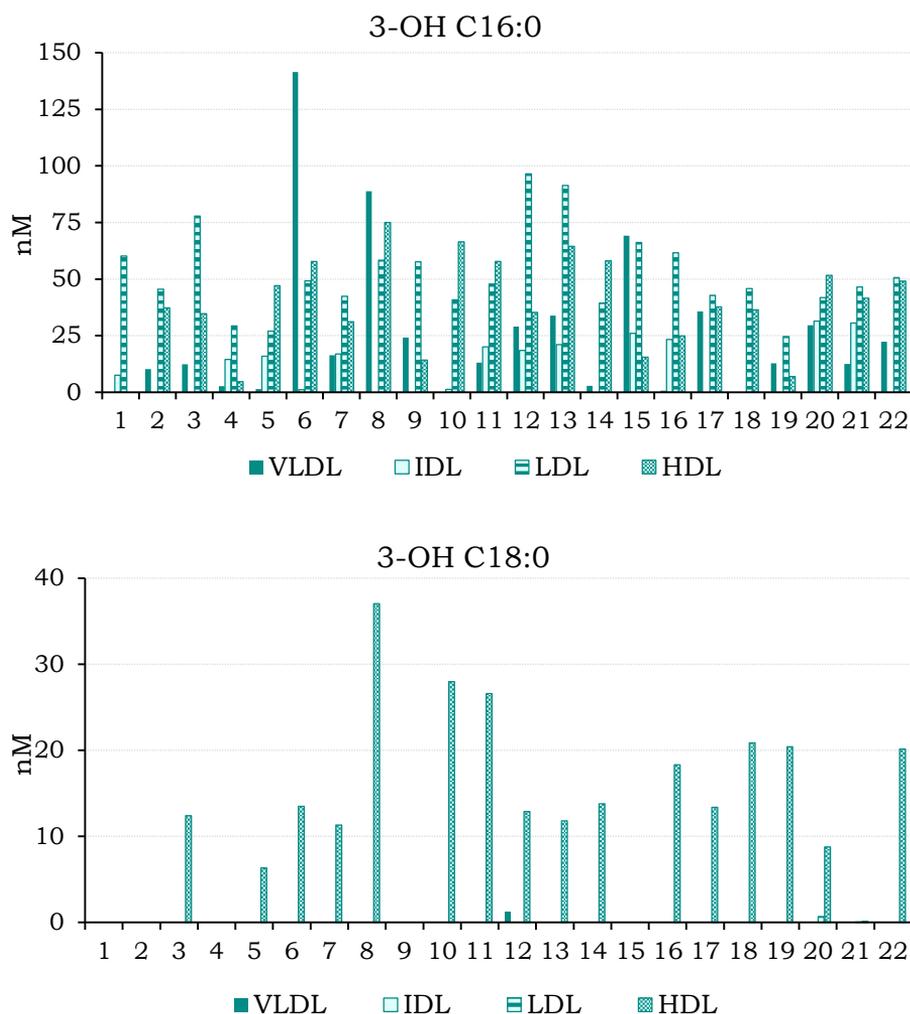


Figura 25. Distribución individual del LPS y sus componentes (3-OH FAs) en las lipoproteínas.

VLDL: *Very low-density lipoprotein*; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; HDL: *High-density lipoprotein*. LPS: lipopolisacárido; 3-OH C8:0: ácido caprílico; 3-OH C10:0: ácido cáprico; 3-OH C12:0: ácido láurico; 3-OH C14:0: ácido mirístico; 3-OH C16:0: ácido palmítico; 3-OH C18:0: ácido esteárico.

Relación del LPS y sus componentes con el perfil lipídico

El contenido total de LPS en plasma o en las lipoproteínas no correlaciona de forma estadísticamente significativa con ningún parámetro lipídico, pero las moléculas de LPS presentes en cada partícula de VLDL sí correlacionan con la Apo CIII ($r = -0,471$;

$p = 0,027$). En cambio, existen diferentes correlaciones entre los 3-OH FAs y el perfil lipídico. Primero, teniendo en cuenta los lípidos tradicionales, el 3-OH C10:0 detectado en plasma correlaciona negativamente con los TG ($r = -0,461$; $p = 0,041$). Segundo, los 3-OH FAs detectados en cada lipoproteína correlacionan positivamente con diferentes parámetros lipídicos. El 3-OH C16:0 en la LDL correlaciona con el colesterol total ($r = 0,445$; $p = 0,038$), los TG ($r = 0,430$; $p = 0,046$), el LDLc ($r = 0,530$; $p = 0,011$) y la Apo B100 ($r = 0,536$; $p = 0,010$). En la fracción HDL, el 3-OH C8:0 correlaciona negativamente con el HDLc ($r = -0,451$; $p = 0,040$) y el 3-OH C10:0 con la Apo CIII ($r = -0,598$; $p = 0,019$).

Por otro lado, si se tiene en cuenta el perfil lipídico avanzado obtenido mediante RMN, también se observan correlaciones estadísticamente significativas entre los 3-OH FAs y dicho perfil (ver Tabla 21).

Estos resultados corroboran la importancia de un análisis detallado tanto del LPS, de sus componentes y del perfil lipídico, debido a la gran variedad de correlaciones obtenidas, así como a la obtención de mayor información. Por ejemplo, en el análisis de lípidos tradicionales de rutina clínica, el 3-OH C8:0, el 3-OH C10:0 y el 3-OH C16:0 correlacionan con algún parámetro lipídico de forma estadísticamente significativa; en cambio, todos los 3-OH FAs correlacionan con algún parámetro del perfil lipídico obtenido por RMN. Además, cabe destacar que no todas las correlaciones existentes entre los 3-OH FAs y los parámetros lipídicos tienen el mismo signo, pudiendo deducir la existencia de distinto comportamiento de estos componentes del LPS.

Tabla 21. Correlación entre los 3-OH FAs y el perfil lipídico avanzado.

		3-OH C8:0	3-OH C10:0	3-OH C12:0	3-OH C14:0	3-OH C16:0	3-OH C18:0
PLASMA	VLDL-TG	-0,468*	-0,486*	-0,335	-0,119	-0,298	-0,226
	LDL-TG	-0,019	-0,323	-0,131	-0,467*	0,125	-0,429*
	VLDL-P	-0,438*	-0,465*	-0,289	-0,104	-0,230	-0,276
	Pequeñas	-0,429	-0,451*	-0,319	-0,090	-0,235	-0,260
LDL	LDL-TG	-0,055	-0,218	-0,290	0,147	0,426*	-
	LDLc	-0,076	0,057	-0,163	0,144	0,536**	-
	LDL-P	0,049	0,075	0,086	0,150	0,591**	-
	Grandes	-0,046	0,054	-0,059	0,181	0,444*	-
	Medianas	-0,032	-0,025	-0,096	0,123	0,489*	-
	Pequeñas	0,042	0,064	0,086	0,125	0,565**	-
	Diámetro	0,154	0,184	0,928**	0,048	-0,207	-
HDL	HDL-TG	-0,086	-0,299	-0,517*	0,076	0,476*	0,202
	HDLc	-0,323	-0,480	-0,213	0,027	0,513*	0,133
	HDL-P	-0,301	-0,407	-0,260	0,029	0,523*	0,243
	Medianas	-0,310	-0,337	-0,246	0,036	0,500*	0,158
	Pequeñas	-0,242	-0,643**	-0,303	0,036	0,485*	0,127

Los valores representan los coeficientes de correlación de Pearson o Spearman, en función de la normalidad de las variables.

TG: triglicéridos; HDLc: colesterol HDL; LDLc: colesterol LDL; VLDL: *Very low-density lipoprotein*; VLDL-P: Partículas totales de VLDL; LDL: *Low-density lipoprotein*; LDL-P: Partículas totales de LDL; HDL: *High-density lipoprotein*; HDL-P: Partículas totales de HDL. 3-OH C8:0: ácido caprílico; 3-OH C10:0: ácido cáprico; 3-OH C12:0: ácido láurico; 3-OH C14:0: ácido mirístico; 3-OH C16:0: ácido palmítico; 3-OH C18:0: ácido esteárico.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

ESTUDIO 5. Relación entre las glicofomas de Apo CIII, LPS y sus componentes

Dado que la **Apo CIII** dificulta la unión de la lipoproteína con otras moléculas o receptores, el objetivo de este estudio es analizar si el grado de **sialización** modula la **unión del LPS** y de sus **componentes**. Este estudio surge como un subestudio de los dos anteriores a partir de las asociaciones del LPS con los TG y la Apo CIII encontradas en el estudio 4.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Correlaciones entre el LPS, así como de sus componentes y las glicofomas de Apo CIII

Se han realizado correlaciones entre el contenido de LPS total, así como del n° de moléculas de LPS que hay en cada partícula lipoproteica y la distribución relativa de las glicofomas de Apo CIII, tanto en plasma como en cada lipoproteína (Tabla 22). Únicamente se han realizado correlaciones entre el LPS de las fracciones lipoproteicas y el contenido de las glicofomas de Apo CIII en plasma y en la misma lipoproteína; por ejemplo, el LPS de la fracción VLDL sólo se ha correlacionado con la distribución relativa de glicofomas de Apo CIII del plasma y de las VLDL, no con la que se da en el resto de lipoproteínas.

Es importante destacar que, al igual que se ha obtenido en el estudio 3, no todas las glicofomas de Apo CIII correlacionan en igual sentido. Las glicofomas que no tienen ácido siálico presentan una relación positiva con el LPS. En el caso de la presencia de una molécula de ácido siálico, el comportamiento de la glicofoma se ve afectado en función de si ha perdido una alanina o no, ya que la Apo CIII-1 correlaciona negativamente con el LPS y la Apo CIII-1d lo hace positivamente.

Tabla 22. Correlaciones entre el LPS y las glicofomas de Apo CIII.

	LPS			
	Plasma	VLDL	LDL	VLDL-P
CIII-0a	0,466*	0,495*	0,265	0,395
CIII-0a_V	0,537**	0,554**	-	0,470*
CIII-0a_I	0,453*	-	-	-
CIII-0a_H	0,441*	-	-	-
CIII-0b_V	0,491*	0,171	-	0,407
CIII-0f	0,381	0,383	0,413	0,534*
CIII-0f_V	0,418	0,309	-	0,515*
CIII-1	-0,273	-0,308	-0,458*	-0,333
CIII-1_V	-0,470*	-0,504*	-	-0,447*
CIII-1d_V	0,448*	0,310	-	0,307

Los valores representan el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman en función de la normalidad de las variables.

LPS: lipopolisacárido; VLDL: *Very low-density lipoprotein*; VLDL-P: Partículas totales de VLDL; LDL: *Low-density lipoprotein*.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Si en vez de tener en cuenta el contenido de LPS total, se correlacionan sus componentes, también se encuentran correlaciones estadísticamente significativas. En el plasma, las correlaciones estadísticamente significativas se muestran en la Tabla 23. Brevemente, el 3-OH C16:0 es el que presenta un mayor número de correlaciones con las glicofomas de Apo CIII. Además, en este caso ocurre lo mismo que con el LPS total, y es que las glicofomas de Apo CIII que presentan una o dos moléculas de ácido siálico tienen una relación inversamente proporcional con los componentes del LPS en plasma. El siguiente con mayor número de correlaciones es el 3-OH C12:0, seguido del 3-OH C8:0; en cambio los componentes 3-OH C10:0, 3-OH C14:0 y 3-OH C18:0 no correlacionan de forma estadísticamente significativa en plasma con ninguna glicofoma de Apo CIII.

Tabla 23. Correlaciones entre los 3-OH FAs del plasma y las glicofomas de Apo CIII.

	3-OH C8:0	3-OH C12:0	3-OH C16:0
CIII-0a	0,412	0,082	0,543*
CIII-0a_V	0,432*	0,126	0,623**
CIII-0a_I	0,402	0,204	0,533*
CIII-0a_L	0,236	-0,005	0,454*
CIII-0a_H	0,342	0,107	0,626**
CIII-0b_V	0,405	0,308	0,567**
CIII-0f_V	0,225	0,606*	0,211
CIII-0f_L	0,075	0,505*	0,132
CIII-1_V	-0,497*	-0,501*	-0,211
CIII-2_V	-0,058	0,051	-0,511*

Los valores representan el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman en función de la normalidad de las variables.

3-OH C8:0: ácido caprílico; 3-OH C12:0: ácido láurico; 3-OH C16:0: ácido palmítico.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Por otro lado, se ha estudiado si los componentes del LPS determinados en las fracciones lipoproteicas correlacionan de forma estadísticamente significativa con glicofomas de Apo CIII (Tabla 24). Resumiendo, el 3-OH FAs que mayor número de correlaciones presenta es el 3-OH C8:0 y más concretamente el detectado en la VLDL, lo que tiene sentido al ser ésta la lipoproteína que mayor contenido de TG presenta. Al igual que en los casos anteriores, cabe destacar la existencia de correlaciones con signos opuestos dependiendo de si la glicofoma presenta una, dos o ninguna molécula de ácido siálico, de si ha perdido o no una alanina y de en qué lipoproteína se encuentre.

Tabla 24. Correlaciones entre los 3-OH FAs de las lipoproteínas y las glicofomas de Apo CIII.

CIII	VLDL		IDL	LDL		HDL	
	3-OH C8:0	3-OH C10:0	3-OH C10:0	3-OH C8:0	3-OH C16:0	3-OH C10:0	3-OH C18:0
0a	0,453*	-0,167	-0,203	0,291	0,133	-0,038	-0,014
0a_V	0,475*	-0,167	-	-	-	-	-
0f_L	-	-	-	0,524*	-0,086	-	-
0f_H	-	-	-	-	-	-0,262	-0,544*
1_V	-0,525*	0,595	-	-	-	-	-
1_L	-	-	-	-0,102	-0,476*	-	-
1d	0,032	-0,167	0,582*	0,215	0,051	0,034	-0,038
2	-0,097	-0,262	-0,126	-0,282	0,199	0,527*	0,017
2d	-0,249	-0,714*	-0,253	-0,099	0,000	0,118	0,022
2d_V	-0,096	-0,810*	-	-	-	-	-

Los valores representan el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman en función de la normalidad de las variables.

VLDL: *Very low-density lipoprotein*; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; HDL: *High-density lipoprotein*; 3-OH C8:0: ácido caprílico; 3-OH C10:0: ácido cáprico; 3-OH C16:0; ácido palmítico; 3-OH C18:0: ácido esteárico.

* $p < 0,05$

Tras los resultados previos, se quiso comprobar si las correlaciones obtenidas mostraban una relación directa entre las glicofomas de Apo CIII y el contenido de LPS total y sus componentes, o podían ser debidas a la relación anteriormente demostrada de los TG, tanto con el LPS y sus componentes como con la Apo CIII y sus glicofomas. Para ello, se volvieron a realizar correlaciones, esta vez, ajustando por los niveles de TG plasmáticos. Los datos obtenidos referentes al LPS se muestran en la Tabla 25. Llama la atención la diferencia de signo de la correlación de la glicofoma Apo CIII-0b, ya que si se encuentra en la IDL presenta una relación inversa con el contenido de LPS total de dicha lipoproteína y, en cambio, si se encuentra en la VLDL, se relaciona con mayor contenido de LPS total unido a las VLDL. Los resultados de los (3-OH FAs) se recogen en la Tabla 26 y también se observan diferencias de signo de las correlaciones.

Tabla 25. Correlaciones ajustadas por TG del LPS y las glicofomas de Apo CIII.

LPS		IDL	LDL	VLDL-P
CIII	Ob_V	-	-	0,459*
	Ob_I	-0,492*	-	-
	1	-0,088	-0,445*	-0,110

IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; VLDL-P: Partículas totales de VLDL LPS: lipopolisacárido.

* $p < 0,05$

Tabla 26. Correlaciones ajustadas por TG de los 3-OH FAs y las glicofomas de Apo CIII.

	Plasma	VLDL	IDL	LDL	HDL
CIII	3-OH C8:0				
Of_L	0,013	-	-	0,519*	-
1_V	-0,339	-0,596**	-	-	-
CIII	3-OH C10:0				
1_I	-0,010	-	0,621*	-	-
2	0,114	-0,557	-0,07	0,011	0,546*
CIII	3-OH C14:0				
1d_L	-0,049	-	-	0,597**	-
CIII	3-OH C16:0				
0a	0,493*	0,210	-0,239	0,045	0,054
0a_V	0,534*	0,221	-	-	-
0a_H	0,460*	-	-	-	0,194
0b_V	0,484*	0,233	-	-	-
1	0,015	0,086	0,047	-0,508*	-0,051
1_L	-0,237	-	-	-0,448*	-

VLDL: *Very low-density lipoprotein*; IDL: *Intermediate-density lipoprotein*; LDL: *Low-density lipoprotein*; HDL: *High-density lipoprotein*; 3-OH C8:0: ácido caprílico; 3-OH C10:0: ácido cáprico; 3-OH C14:0: ácido mirístico; 3-OH C16:0: ácido palmítico.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Discusión

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

DISCUSIÓN POR ESTUDIOS

ESTUDIO 1. Estrés, ansiedad, diámetro, número de partículas y carga eléctrica

Por un lado, la relación entre la ansiedad y los eventos cardiovasculares está bien establecida [111]. Por otro lado, también lo está la relación entre los lípidos y el riesgo cardiovascular [280]. Sin embargo, la relación del estrés y de la ansiedad con los lípidos no está tan clara como en el caso de otros trastornos mentales como la depresión [132]. Por ello, surge la idea de realizar este estudio para esclarecer la relación del estrés y la ansiedad con los lípidos. Además, la determinación del perfil lipídico mediante RMN aportaría una mayor información que la obtenida a partir de un análisis tradicional.

En primer lugar, la población seleccionada para este estudio está compuesta por mujeres jóvenes y aparentemente sanas, al tratarse de un subgrupo de población general el cual presenta un riesgo cardiovascular muy bajo.

Este estudio muestra una asociación entre el estrés debido al período de exámenes y el perfil lipídico avanzado; concretamente, se observan asociaciones negativas con los TG contenidos en las VLDL, las partículas VLDL medianas y el diámetro medio de las HDL-P. Esto indica que el metabolismo lipídico que se encuentra más alterado en este caso es el ligado a los TG, ya que son las lipoproteínas mayormente involucradas en este metabolismo las que presentan algún tipo de asociación con este tipo de estrés. La disminución de los TG y de las VLDL-P puede ser debida a que las participantes del estudio se podrían encontrar en la fase de adaptación del estrés [116], en la cual el esfuerzo metabólico requerido para mantener la homeostasis podría hacer que disminuyeran los niveles de TG, los cuales podrían haberse visto elevados en la primera fase de alarma. En esta fase previa de alarma [116], la secreción de cortisol favorecería la lipólisis; pero al tratarse de mujeres con un IMC correspondiente a un normopeso, no presentan grandes reservas energéticas en forma

de grasa, por lo que el incremento inicial no sería muy elevado. Además, una moderada ingesta de grasa del grupo con alto estrés ayudaría a que se diera esta situación. Si en lugar de realizar este estudio en este tipo de participantes, se llevara a cabo en individuos con un mayor IMC, una mayor ingesta de grasas y con hábitos de vida menos saludables, probablemente los resultados obtenidos podrían ser diferentes.

Por otro lado, este estudio no es completamente comparable con los ya publicados, ya que los parámetros lipídicos que muestran relación con el estrés en este estudio son los determinados en el análisis avanzado, siendo esta vez la primera en realizarse este tipo de asociaciones. El hecho de que no se encuentren asociaciones entre el perfil lipídico tradicional y el estrés, a pesar de que investigadores muestran asociaciones positivas entre dicho estrés y los niveles de colesterol, LDLc, HDLc y TG [107, 108], puede deberse a que en este estudio las correlaciones se han ajustado por los parámetros de estilo de vida que podrían estar involucrados, a diferencia de los estudios publicados que no realizan ajuste alguno. Además, las poblaciones de estudio son diferentes, ya que, en los trabajos publicados, las poblaciones son de mayor edad, presentan niveles más elevados de los parámetros lipídicos y combinan ambos géneros, mientras que la población estudiada en esta tesis está compuesta íntegramente por mujeres.

En segundo lugar, se observan asociaciones entre el perfil lipídico y el grado de ansiedad detectado en las participantes del estudio. Por un lado, la ansiedad como rasgo de personalidad presenta asociaciones con el perfil lipídico tradicional y con el avanzado, principalmente con el colesterol total, el LDLc y sus partículas. Por otro lado, la ansiedad como estado se asocia de forma positiva con el LDLc medido por RMN.

Estos resultados se corroboran con algún estudio previo que ha confirmado la asociación de la ansiedad con el metabolismo lipídico, provocando un perfil más aterogénico; es decir, que individuos con mayores puntuaciones en el test de ansiedad tienen mayor riesgo cardiovascular [110]. Incluso la ansiedad

sostenida en el tiempo se ha llegado a considerar como un acelerador de arteriosclerosis [134], pudiendo ser debido a los cambios que se han observado en esta tesis.

A pesar de ser un test validado a nivel nacional y ser uno de los más utilizados por los investigadores y diversos profesionales de la salud mental, cabe destacar la escasez de estudios que determinen el grado de ansiedad con el test utilizado en esta tesis (STAI) y que a la vez estudie las asociaciones entre la puntuación obtenida en dicho test y el perfil lipídico. Con lo cual, la comparación con estudios ya publicados es limitada. A pesar de que la mayoría de los estudios muestran una relación entre la ansiedad y el HDLc [110], los resultados obtenidos en la tesis se relacionan con un perfil lipídico más aterogénico basado en el incremento del colesterol total, el LDLc y el número de todos los subtipos de partículas LDL, siendo la asociación de las más pequeñas con la ansiedad la de mayor grado y mayor significancia estadística. Esto se puede explicar mediante la relación de la norepinefrina y el colesterol total y LDLc. Dicha relación, consiste en que el aumento de la norepinefrina que tiene lugar en situaciones de ansiedad, conlleva también un incremento en los niveles de colesterol total y LDLc [107].

En tercer lugar, no se han encontrado estudios previos que relacionen la carga eléctrica de las lipoproteínas ni con el estrés ni con la ansiedad. En el presente estudio, la carga eléctrica de la VLDL y HDL se asocia positivamente tanto con el estrés actual, como con ambos tipos de ansiedad, es decir, a mayor grado de estrés y ansiedad, menos carga negativa presentan las lipoproteínas. Una posible explicación a las asociaciones encontradas en este estudio es que la carga eléctrica depende principalmente de la composición lipídica y proteica de las lipoproteínas, viéndose afectada, entre otros, por los TG y el colesterol [40], lo que va en consonancia con las correlaciones encontradas en esta tesis entre el estrés y los TG y la ansiedad y el colesterol. Además, hay que tener en cuenta que la población de estudio presenta bajo riesgo cardiovascular.

Por último, cabe destacar que, tras la realización del test de estrés académico y el STAI, se detecta que la mayoría de mujeres pertenecientes al grupo de ansiedad alta, también presentan un alto grado de estrés, lo que podría tener un efecto más pronunciado sobre el perfil lipídico.

En definitiva, los resultados obtenidos muestran la importancia de realizar análisis más avanzados en cuanto a los lípidos y propiedades de las lipoproteínas para así ayudar a prevenir comorbilidades como la arteriosclerosis, ya que, excepto en el caso de la ansiedad como rasgo de personalidad, tanto en los tipos de estrés como en la ansiedad tipo estado, las asociaciones encontradas se dan con parámetros lipídicos no determinados en un análisis tradicional de rutina clínica.

ESTUDIO 2. cIMT y carga eléctrica en LES

Debido a que las interacciones entre las lipoproteínas y la pared arterial, así como con sus receptores y las enzimas son electrostáticas, la hipótesis de este segundo estudio es que la carga eléctrica de las lipoproteínas podría ser un nuevo y adicional factor de riesgo independiente de la arteriosclerosis acelerada de los pacientes con LES, ya que no se explica completamente por los factores de riesgo tradicionales [179].

Los resultados indican que una LDL con carga más negativa se asocia significativamente con un mayor grosor de la íntima-media carotídea de forma independiente a los factores de riesgo tradicionales, incluyendo la concentración lipídica. Esto va en línea con que la subpoblación de LDL electronegativa favorece la arteriosclerosis promoviendo la agregación de las lipoproteínas y facilitando la unión a los proteoglicanos de la matriz extracelular [397]. Esta LDL electronegativa es una lipoproteína modificada, la cual presenta un mayor contenido de TG, NEFAs, ceramidas, lisofosfatidilcolina y apolipoproteínas minoritarias diferentes a la Apo B100. Además, la LDL electronegativa representa un 10 % de la LDL total en individuos sanos, y está ligeramente incrementada en situaciones de riesgo cardiovascular como puede ser el

síndrome metabólico [312]; en cambio, no lo está en desórdenes autoinmunes [398].

Se propone que la variabilidad natural de la carga eléctrica de todas las lipoproteínas podría contribuir en el desarrollo y progresión de la arteriosclerosis en pacientes con LES con alto riesgo cardiovascular y con ausencia de anormalidades en otros marcadores lipídicos.

Tanto en los pacientes diagnosticados de LES como en la población control, todas las lipoproteínas presentan carga eléctrica neta negativa, lo que es consistente con los datos publicados [296]. La VLDL es más electronegativa en los controles, lo que va en contra de lo esperado, ya que la porción más electronegativa de la VLDL se asocia con daño endotelial, pero el estudio referenciado se lleva a cabo en pacientes con síndrome metabólico, situación diferente a la estudiada [303]. Por otro lado, una carga eléctrica más negativa de la IDL y de la LDL, pero no la de la VLDL, son las que actualmente se asocian con un incremento de cIMT y el hecho de no haber diferencias estadísticamente significativas entre la cIMT del grupo LES y el grupo control hace pensar que esto podría no ser un resultado contradictorio. El estilo de vida y diversos factores metabólicos, como los NEFAs procedentes de la dieta, o diferencias en la eficacia de la lipólisis podrían explicar esta diferencia [399], así como que la carga eléctrica de la VLDL de las controles sea debida a una posible composición química diferente [40, 400] a la que presentan los pacientes con LES, la cual no contribuya al desarrollo de arteriosclerosis. Dicho razonamiento puede ser igualmente válido para la relación entre la cIMT y la carga eléctrica de la IDL y LDL.

Otro aspecto que tener presente es que la población de LES estudiada no presentaba actividad de la enfermedad, lo que influye a la hora de intentar encontrar diferencias con una población control, ya que las alteraciones que se producen en estados de brote y las debidas a los fármacos para su tratamiento en este caso no se dan. Esto se ve apoyado por los resultados obtenidos de la comparativa de la carga eléctrica de las

lipoproteínas de las pacientes que presentaron un estado de brote durante el estudio. Estas pacientes presentaban lipoproteínas con carga eléctrica más negativa y un perfil lipídico tradicional más aterogénico.

Los resultados obtenidos demuestran que en pacientes diagnosticados de lupus y sin actividad de la enfermedad, la carga eléctrica neta de la IDL y LDL contribuyen significativamente a la cIMT y que este efecto es independiente de otros factores de riesgo bien conocidos como la edad, el género, el IMC, el consumo de tabaco y la PCRus. Además, en el caso de la LDL dicho efecto es también independiente de la concentración de lípidos, del número de partículas y del diámetro de éstas. Sin embargo, la contribución de la carga de la IDL a la cIMT no es independiente a su número de partículas, debido a que si en el modelo de regresión lineal se introducen las IDL-P, la carga de la IDL sale del modelo. Esto puede ser debido a la existencia de una correlación negativa entre ambas propiedades, la carga eléctrica neta de la IDL y las IDL-P.

En el grupo control, la carga eléctrica neta de la LDL correlaciona positivamente con la cIMT, aunque no de forma estadísticamente significativa. A pesar de que la carga eléctrica neta sea la misma en ambos casos, la existencia de correlaciones en sentido inverso, dependiendo de si es en una población de estudio u otra, podría ser debida a las diferencias en la composición de las lipoproteínas, ya que la carga eléctrica se ve afectada por la composición [40]. Para esclarecer dicha controversia serían necesarios más estudios y un tamaño poblacional mayor.

En cuanto a la presencia de placa, hay estudios que recogen que la presencia de placa es un mejor marcador de arteriosclerosis en LES [401, 402], lo que va en línea a las observaciones establecidas en esta tesis. Mientras que la cIMT no es estadísticamente diferente entre el LES y la población control, la presencia de placa aterosclerótica sí es significativamente mayor en la población diagnosticada de LES. De igual forma, la carga eléctrica de las lipoproteínas tiende a ser más negativa en el grupo de LES con

presencia de placa, a pesar de no haber diferencias estadísticamente significativas.

El mecanismo implicado en la relación de la carga eléctrica neta y la cIMT es muy similar al de las subpoblaciones de LDL electronegativas en el que la agregación y la fusión de lipoproteínas desencadenan la retención subendotelial del colesterol, promoviendo la aterosclerosis. Hay estudios que demuestran que cuanto más electronegativa es la carga de lipoproteína, más se agregan estas lipoproteínas, lo que aumenta su aterogenicidad [323]. El tránsito de lipoproteínas a través del endotelio puede seguir la ruta de transporte paracelular pero, sin embargo, está restringida a macromoléculas bastante pequeñas de 3 – 6 nm. Las partículas más grandes como LDL (20 – 30 nm) cruzarán el endotelio por transcitosis mediada por vesículas [403]. La interacción vesícula-lipoproteína es probable que también se vea afectada por las interacciones electrostáticas, es decir por la carga eléctrica.

En términos de riesgo cardiovascular, es importante tener en cuenta que la carga eléctrica neta de las lipoproteínas no sólo afecta a la interacción directa entre las lipoproteínas y la superficie endotelial, sino que también afecta al metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas interactuando con las enzimas y las moléculas de la superficie celular. Existen evidencias de que la carga eléctrica neta bloquea selectivamente el almacenamiento de colesterol [292] y ésteres de colesterol [288, 318], moléculas controladas por la LCAT, la cual afecta a la esterificación del colesterol, la CETP [404], y lipasas como la LPL y la LH [289, 405]; todo esto puede ser indicativo del desarrollo acelerado de arteriosclerosis.

Este estudio postula que la carga neta de lipoproteínas es un contribuyente significativo e independiente a la progresión de la arteriosclerosis. Su papel puede ser más relevante en patologías en las que los factores de riesgo tradicionales son menos influyentes y pueden ayudar a explicar parte del 30 – 40 % restante del riesgo residual. También deja espacio para la terapia y la intervención, ya que la composición de fosfolípidos de las

lipoproteínas es un determinante principal de sus cargas netas. Este hallazgo implica que la carga eléctrica neta puede ser modulada de alguna manera por cambios en la dieta, así como de una manera más directa a través de la administración de moléculas de fosfatidilinositol [289, 297].

En resumen, la carga eléctrica neta de la LDL contribuye a la arteriosclerosis subclínica en pacientes con LES y su efecto es independiente de la edad, el género, el IMC, el consumo de tabaco, la PCRus, los lípidos tradicionales, el número de partículas de lipoproteínas y su diámetro. Los datos sugieren que la carga neta de LDL (independientemente de su concentración de colesterol) puede ser un factor de riesgo aterosclerótico en patologías con alto riesgo residual.

ESTUDIO 3. Glicofomas de Apo CIII

Aunque existe evidencia convincente de que los niveles reducidos de TG durante toda la vida debido a las mutaciones de Apo CIII resultan en una protección eficaz contra la enfermedad cardiovascular [406, 407], el efecto de la Apo CIII puede depender de la lipoproteína a la que se encuentre unida [339, 344]. Recientemente, se ha visto que también puede depender de la abundancia relativa de sus glicofomas [357, 359, 408, 409]. Además del efecto de la Apo CIII sobre los niveles de TG, también está implicada en otros procesos que ayudan a desencadenar la arteriosclerosis. Por un lado, atenúa el efecto protector de las HDL, ya que su presencia puede inducir un mayor riesgo cardiovascular [344] al alterar la función de las HDL y estimular, en vez de bloquear, rutas potencialmente proapoptóticas [345]. Por otro lado, promueve la adhesión de monocitos a la superficie de las células endoteliales [346–348], regulando el estado proinflamatorio. También parece estar implicada en la formación de sdLDL [340].

Como consecuencia de las distintas implicaciones de la Apo CIII en el metabolismo lipídico, se ha intentado medir eficientemente siete glicofomas de Apo CIII en plasma y en cada una de las lipoproteínas aisladas (VLDL, IDL, LDL y HDL) de sujetos varones

sanos. Hasta la fecha, solo las formas no sializadas, mono-sializadas y di-sializadas se han medido en VLDL, LDL y HDL [359], pero no en la IDL.

Para el análisis de la Apo CIII en las lipoproteínas individuales se elige una población de hombres jóvenes y aparentemente sanos, ya que se asume que la capacidad de detectar las siete glicoformas en lipoproteínas de baja concentración, sería un indicador de la solidez del método. En los estudios anteriores, en los cuales se determinaban las distintas glicoformas de Apo CIII, las poblaciones de estudio estaban compuestas por individuos que presentaban alteraciones metabólicas, como por ejemplo diabetes *mellitus* tipo 2 [394].

Se ha demostrado que las siete glicoformas de Apo CIII se pueden medir de manera confiable tanto en plasma como en cada una de las lipoproteínas aisladas (VLDL, IDL, LDL y HDL) en sujetos jóvenes y aparentemente sanos. En base a las medidas obtenidas, se deducen dos observaciones principales: existe una variabilidad interindividual significativa en la distribución relativa de las siete glicoformas, pero, dicha distribución se suele mantener a lo largo de las diferentes lipoproteínas en cada individuo. Además, y de acuerdo con varias observaciones previas, las correlaciones con los TG difieren según la glicoforma Apo CIII y las lipoproteínas.

El hecho de que la distribución de las glicoformas de Apo CIII se mantenga entre las diferentes lipoproteínas, plantea la pregunta de si realmente es necesario medir la distribución de dichas glicoformas en cada lipoproteína cuando el plasma puede ser un indicador igualmente válido. Aunque este es un posible escenario, también existe la posibilidad de que ésta sea una característica del metabolismo normal, que sin embargo se puede ver alterada en presencia de alteraciones metabólicas [410], siendo dicha disrupción en sí misma un biomarcador útil. Obviamente, este aspecto merecerá más estudios; por ejemplo, en pacientes obesos, diabéticos o con síndrome metabólico. Otra posibilidad puede ser el hecho de que la importancia de las glicoformas de Apo CIII resida en la cantidad total de cada glicoforma; es decir, que haya una concentración mínima de alguna glicoforma de Apo CIII a

partir de la cual ésta afecte al metabolismo lipídico, aun manteniéndose la distribución relativa igual en todos los individuos. Esto es una limitación del estudio realizado en esta tesis doctoral, ya que sólo se han podido detectar las proporciones relativas y no cuantificar el contenido exacto de cada glicofoma.

La asociación de las glicofomas de Apo CIII con TG y los parámetros lipídicos puede analizarse para cada una de las siete glicofomas (0a, 0b, 0f, 1, 1d, 2 y 2d) o agruparse de acuerdo con la presencia de ninguna, una o dos moléculas de ácido siálico. Según la literatura, hay dos hechos indiscutibles. En primer lugar, las asociaciones con TG, LDLc, HDLc y otros parámetros lipídicos dependen de la glicofoma, pudiendo observarse asociaciones opuestas dependiendo de la glicofoma de Apo CIII estudiada, como se observan en los resultados obtenidos en esta tesis. En segundo lugar, las asociaciones descritas son bastante controvertidas en algunos casos y además los resultados de las glicofomas se presentan de diferentes maneras según el estudio. Por ejemplo, como concentraciones relativas o absolutas, como datos únicos de glicofoma o como datos derivados de las relaciones, lo que dificulta la interpretación de las correlaciones de estos parámetros con lípidos y lipoproteínas.

Estudios futuros en los cuales las poblaciones presenten un mayor tamaño poblacional podrían afianzar y corroborar los resultados obtenidos, así como esclarecer la posible existencia o no de un contenido mínimo necesario de Apo CIII para que se observen efectos sobre el metabolismo y/o riesgo cardiovascular en individuos con parámetros lipídicos normales.

ESTUDIO 4. LPS y sus componentes

La endotoxemia metabólica, caracterizada por concentraciones elevadas de LPS en circulación, desencadena un estado crónico de inflamación que hace incrementar, entre otros, el riesgo de arteriosclerosis [370] y de enfermedad cardiovascular [369]. Además, la concentración de LPS está elevada en pacientes con factores de riesgo cardiovascular [371, 372] y correlaciona de

forma positiva con los TG [373], el colesterol total, el LDLc y el HDLc [374].

A pesar de las evidencias científicas que demuestran que prácticamente todo el LPS presente en circulación se encuentra unido a lipoproteínas [376], que la unión se da en función de la concentración plasmática de lipoproteínas ricas en colesterol, que es estable y se da posiblemente entre el lípido A y los fosfolípidos de las lipoproteínas de forma directa o mediante el ensamblaje de la LBP y que con ayuda de proteínas transferidoras de lípidos su distribución en las distintas lipoproteínas puede variar [377], existe cierta controversia sobre cuál de ellas es la que transporta mayor LPS. En algunos casos es la LDL, en otros la HDL [382] y en otros se distribuye de manera uniforme entre todas las lipoproteínas [376]. Esta controversia puede ser debida bien a la variabilidad en la determinación del LPS, ya que no hay un método de referencia bien estandarizado y las técnicas utilizadas pueden no ser lo suficientemente sensibles, o bien a los diferentes estados metabólicos de las distintas poblaciones estudiadas.

Para establecer la determinación del LPS y de sus componentes en las lipoproteínas se elige una población de hombres jóvenes y aparentemente sanos, ya que se asume que la capacidad de detectar seis componentes del LPS unidos a lipoproteínas en baja concentración, sería un indicador de la solidez del método. Se ha demostrado que se pueden medir de manera fiable los componentes del LPS tanto en plasma como en las lipoproteínas aisladas de sujetos jóvenes y aparentemente sanos, pero no todos se encuentran en todas las lipoproteínas ni en todos los individuos. En base a las determinaciones obtenidas, se observa una distribución del LPS y de los 3-OH FAs detectados diferente en plasma y en las distintas lipoproteínas, lo que en el caso del LPS concuerda con lo publicado con anterioridad por otros autores [376, 382]. En el caso de los 3-OH FAs es la primera vez que se realiza esta determinación.

La diferente distribución del LPS en las lipoproteínas podría ser un reflejo del metabolismo lipídico, ya que las moléculas de LPS que se encuentran unidas en una lipoproteína, pueden ser

transferidas a otra por la actividad de las enzimas transferidoras de lípidos como la PLTP [377], CETP, LCAT o LPL. Si existiera alguna modificación en la actividad de estas enzimas y/o en el reconocimiento de las lipoproteínas por dichas enzimas o sus receptores, el cual puede ser debido a modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de éstas, se vería alterada la distribución del LPS en las lipoproteínas y/o plasma.

El hecho de que la distribución del LPS y sus componentes no se mantenga entre el plasma y las diferentes lipoproteínas, incluso que algunos 3-OH FAs no se encuentren en todos los individuos ni en todas las lipoproteínas, demuestra que es realmente necesario medir dicha distribución en ambas fracciones, ya que, además, ésta puede verse alterada debido a enfermedades metabólicas [376] o a cambios en la ingesta alimentaria [367, 411, 412].

Cabe destacar que, a pesar de encontrar mayor cantidad de LPS en la fracción LDL, se ha visto que son las partículas VLDL las que transportan un mayor número de moléculas de LPS por partícula, lo que puede ser consecuencia de un menor nº de partículas VLDL y/o del mayor diámetro de éstas en comparación con las LDL. Esto puede ser característico de un metabolismo aparentemente normal, con lo cual serían necesarios más estudios con distintas poblaciones y cuyo tamaño poblacional fuera mayor para corroborar este resultado, ya que es la primera vez que se lleva a cabo esta relación. Además, el número de moléculas de LPS que transporta cada lipoproteína podría establecerse como un nuevo ratio a determinar, ya que es la única variable en relación al LPS total que correlaciona de forma significativa con algún parámetro del perfil lipídico de la población estudiada y hay evidencias científicas de que el estudio de ratios relacionados con el LPS son importantes al asociarse con una mayor incidencia de diabetes [413].

El hecho de que el nº de moléculas de LPS que se encuentran unidas a cada partícula de VLDL correlacione negativamente con la Apo CIII puede parecer contradictorio, ya que una mayor cantidad de Apo CIII se asocia a un mayor contenido de TG, los

cuales son transportados por las TRL, siendo la más importante la VLDL. Si hay una mayor cantidad de TG, se esperaría que las partículas VLDL fueran más grandes y disponer así de mayor superficie para poder anclarse un mayor número de moléculas de LPS, pero la asociación encontrada muestra lo contrario. Una posible explicación podría ser la existencia de cambios conformacionales entre las moléculas involucradas en la unión del LPS a la lipoproteína, los cuales facilitarían dicha unión.

Los resultados obtenidos de la determinación exhaustiva de los 3-OH FAs y la relación de éstos con los distintos parámetros lipídicos muestran la importancia de este tipo de análisis, ya que existe una amplia variabilidad de correlaciones entre ellos, siendo unas positivas y otras negativas, las cuales además varían en función de en qué fracción lipoproteica se encuentra. Esto se traduce en que un 3-OH FAs podría tener un efecto protector y otro efecto aterogénico en función de en qué lipoproteína se encuentre, lo cual repercutiría en el efecto que podría tener el LPS sobre el perfil lipídico en función de si sus componentes son unos 3-OH FAs u otros, pudiendo hacer cambiar la idea de que el LPS podría ser un factor de riesgo ateroesclerótico.

A parte de la relación del LPS y sus componentes con el perfil lipídico, cabe mencionar el posible efecto que puede tener el LPS sobre la aterogenicidad de las lipoproteínas. Al unirse a la lipoproteína, el LPS podría cambiar el comportamiento de la lipoproteína hacia uno más aterogénico. Por ejemplo, al presentar la lipoproteína una molécula extraña en su superficie, ésta podría desencadenar una respuesta inflamatoria e inmune que podría acelerar el desarrollo de la arteriosclerosis. Además, la unión del LPS a la lipoproteína tiene lugar, directa o indirectamente a través de la LBP, sobre la Apo B, la Apo E y los PL [25, 414], lo que podría dificultar el reconocimiento de las lipoproteínas por sus receptores. Esto haría que permanecieran así un mayor tiempo en circulación, lo que lleva a una mayor posibilidad de sufrir modificaciones, como podría ser la oxidación, la disminución de su diámetro, la agregación..., las cuales aumentarían su efecto aterogénico.

Por otra parte, al ser el LPS una molécula cargada eléctricamente, también afecta a la carga eléctrica neta de las lipoproteínas, haciéndola más electronegativa [415]. El que la lipoproteína presente más carga electronegativa es un factor aterogénico ampliamente reconocido [303, 312, 320]. Con lo cual, sería interesante realizar estudios futuros en los cuales se determinen ambas propiedades de las lipoproteínas y cómo la presencia de LPS y cada uno de sus componentes podrían afectar a la carga eléctrica neta.

ESTUDIO 5. Relación entre las glicofomas de Apo CIII, LPS y sus componentes

En este estudio se establecieron asociaciones entre las distintas glicofomas de Apo CIII y el contenido de LPS y de sus componentes debido a las asociaciones del LPS con los TG y la Apo CIII encontradas en el estudio 4.

Los resultados muestran una amplia variedad de efectos de las diferentes glicofomas de Apo CIII sobre la cantidad de LPS y de sus componentes que se encuentran tanto en plasma como en las lipoproteínas. Hay casos en los que existe una correlación positiva entre una glicofoma y el LPS y en otros esta correlación es negativa. El resultado más relevante es que el hecho de la presencia de una molécula de ácido siálico hace que la relación entre la Apo CIII y el LPS sea inversa; en cambio, la ausencia de ácido siálico hace que la relación sea positiva; es decir que la presencia de ácido siálico dificulta la unión del LPS a la lipoproteína. Esto puede ser debido a que el LPS se une a la Apo CIII en la misma treonina a la que se une el ácido siálico o en alguna región cercana, lo que podría ser incompatible.

También podría ser que la unión no fuera directa entre el LPS y la Apo CIII. En este caso, la presencia de ácido siálico en la Apo CIII podría provocar algún tipo de cambio conformacional que afecte a la unión del LPS a la lipoproteína. Este cambio puede darse bien directamente sobre la Apo CIII o indirectamente sobre alguna otra molécula, ya que hay evidencias de que la Apo CIII

puede tener efecto en las interacciones de otras moléculas de la lipoproteína con el organismo [41, 42].

Por otro lado, es llamativo el hecho de que en los casos en los que se pierde una alanina de la Apo CIII, la correlación observada va en sentido opuesto a la dada si dicha alanina no se pierde, anulando así el efecto del ácido siálico. Esta modificación de la Apo CIII podría impedir la exposición del ácido siálico, permitiendo la unión del LPS.

Lo explicado para el LPS es igualmente extrapolable a las correlaciones encontradas entre las glicofomas de Apo CIII y los componentes del LPS.

Sería interesante estudiar si las relaciones encontradas entre el LPS y sus componentes y las distintas glicofomas de Apo CIII son debidas a una interacción directa entre dichas moléculas o es a través de un efecto indirecto. Serán necesarios más estudios con un mayor número de participantes, incluso estudios en poblaciones con distintas características metabólicas para esclarecer los resultados obtenidos.

DISCUSIÓN GLOBAL

El objetivo principal de esta tesis es demostrar que un estudio más detallado que el realizado en la rutina clínica y basado en nuevas propiedades de las lipoproteínas como el diámetro y número de partículas, la carga eléctrica, las glicofomas de Apo CIII y el contenido de LPS y sus componentes, aporta una mayor información y más útil para la detección de perfiles lipídicos aterogénicos y la prevención de la arteriosclerosis.

La razón principal por la cual se ha realizado todo el trabajo es que la enfermedad cardiovascular sigue siendo la principal causa de muerte en el mundo según la OMS a pesar de los avances en su investigación y el empeño en su prevención. Aun teniendo en cuenta los factores de riesgo tradicionales, queda por explicar aproximadamente el 40 % de los casos [5]; de ahí la necesidad de buscar nuevos factores de riesgo como pueden ser las diferentes propiedades de las lipoproteínas, al ser éstas las principales protagonistas de la arteriosclerosis.

Como se ha comentado en la introducción (ver capítulo VI), las lipoproteínas constituyen un grupo amplio y heterogéneo de partículas que difieren en su diámetro, densidad, composición tanto lipídica como proteica, y carga eléctrica. Desde la primera separación y obtención de las lipoproteínas según su densidad, se han desarrollado y mejorado diversas técnicas que se basan en las propiedades fisicoquímicas de éstas, para así tener una mejor caracterización de ellas tanto cualitativa como cuantitativa [416]. Estas mejoras permiten una mayor comprensión del proceso patogénico de la arteriosclerosis, pero todavía no se han trasladado a la rutina clínica, limitándose únicamente al ámbito de la investigación.

De una forma global, los resultados obtenidos refuerzan la importancia de análisis avanzados, los cuales se basan en estudios en mayor profundidad de posibles factores de riesgo.

En primer lugar, se ha visto que el diámetro y número de partículas ayudan a identificar un perfil lipídico más aterogénico en situaciones de estrés y ansiedad, lo que va en consonancia a

las evidencias científicas de que estas propiedades de las lipoproteínas ayudan a predecir el riesgo de ECV [190, 191, 239–241] en situaciones en las que el LDLc es un pobre predictor de dicho riesgo. En el caso del lupus, ya hay estudios publicados en los cuales se muestra el papel que tienen el diámetro y el número de partículas [190, 191]. En cuanto a las glicofomas de Apo CIII y el contenido de LPS y sus componentes, las relaciones encontradas con el diámetro y número de partículas es una muestra más de que la determinación de estas propiedades ayuda a encontrar un perfil lipídico más aterogénico y se debería introducir dentro de los parámetros a determinar en un análisis de rutina clínica.

En segundo lugar, la carga eléctrica de las lipoproteínas también se ve influenciada en casos de estrés y ansiedad. Por otro lado, en el estudio de los pacientes con lupus, se muestra cómo la carga eléctrica tiene un papel importante en este tipo de población, ya que tiene un efecto sobre el grosor de la íntima-media carotídea independiente al perfil lipídico tradicional obtenido por rutina clínica; así como al diámetro y número de partículas, excepto en el caso de la IDL que se pierde el efecto al tener en cuenta las IDL-P, ya que las éstas se asocian directamente con la cIMT como ya publicó González *et al.* [191] con anterioridad.

En tercer lugar, el estudio de las formas sializadas de Apo CIII muestran una vez más la importancia de un análisis avanzado, ya que las distintas glicofomas presentan comportamientos diferentes en relación con el perfil lipídico. El hecho de que la distribución relativa de cada una de ellas sea igual tanto en plasma como en las distintas lipoproteínas muestra que, igual con esta propiedad, su análisis en plasma ya es suficiente para determinar el riesgo, pero más estudios con poblaciones más diversas deberían corroborarlo.

En cuarto lugar, la determinación del LPS y de sus componentes tanto en plasma como en las lipoproteínas aisladas es el mayor ejemplo de que un análisis exhaustivo de la propiedad estudiada aporta más información, debido a la gran variedad de correlaciones establecidas entre dichos parámetros y el perfil

lipídico. Por ejemplo, dependiendo de los 3-OH Fas que compongan el LPS, éste podría tener un efecto más o menos aterogénico debido a los diferentes comportamientos de éstos encontrados con relación al perfil lipídico.

Por último, el estudio 5, en el cual se estudia la interacción de las glicofomas de Apo CIII y el LPS y sus componentes, demuestra que además de la importancia de determinar todas las propiedades posibles de las lipoproteínas de una forma exhaustiva, el estudio de cómo éstas interactúan entre ellas es también importante, ya que el efecto que tiene una propiedad sobre el perfil lipídico y/o con la arteriosclerosis y el riesgo cardiovascular en última instancia, podría verse afectado por otra propiedad.

Sería interesante realizar futuros estudios en los cuales se determinasen todas estas propiedades de las lipoproteínas en una misma población, para así poder analizar las interacciones entre todas ellas. Además, también habría que comprobar que los resultados que se encontraran no fueran exclusivos de la población estudiada, con lo cual se podrían replicar estos análisis de determinación e interacción de diferentes propiedades de las lipoproteínas en otras poblaciones de interés.

Paralelamente a los resultados que relacionan las propiedades de las lipoproteínas con el perfil lipídico, hay que mencionar la importancia de la metodología utilizada en cada caso. En todos ellos son metodologías robustas, reproducibles y con alta sensibilidad. Además, tanto en la carga eléctrica y el LPS la información que aportan es mayor que la que aportan las técnicas normalmente utilizadas.

En el caso de la carga eléctrica la principal diferencia con la metodología utilizada previamente y en los estudios publicados es que en esta tesis se cuantifica dicha carga. Con otros métodos, únicamente se obtienen fracciones en función a la carga eléctrica que presente o incluso solamente se observa si la lipoproteína presenta mayor o menor electronegatividad. Al poder cuantificar la carga eléctrica, se permite comparar diferentes estudios que utilicen la misma metodología y establecer valores de referencia

y/o de normalidad, los cuales serían muy útiles a la hora de determinar el riesgo cardiovascular.

En el caso del LPS, la determinación de sus componentes en forma de 3-OH Fas no era posible con los otros métodos anteriormente utilizados y se ha visto que la información que aporta dicha determinación es de importancia.

En resumen, análisis avanzados y de forma más exhaustiva de las diferentes propiedades de las lipoproteínas aportan más información útil para la detección de un perfil lipídico aterogénico y la posible prevención de la arteriosclerosis.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Conclusiones

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

CONCLUSIONES DE LOS ESTUDIOS

ESTUDIO 1. Estrés, ansiedad, diámetro, número de partículas y carga eléctrica

- ♦ Los individuos que se encuentran dentro del grupo con alto grado de estrés presentan mayor ansiedad y viceversa.
- ♦ El perfil lipídico no se ve significativamente alterado en participantes mujeres jóvenes y sanas en situaciones de estrés.
- ♦ El estrés actual se asocia positivamente con la carga eléctrica de las VLDL y HDL de forma independiente a las características antropométricas, estilo de vida e ingesta alimentaria.
- ♦ Las asociaciones negativas entre el estrés debido a los exámenes y el perfil lipídico (TG, VLDL-P medianas y diámetro de las HDL) son independientes de las características antropométricas, estilo de vida e ingesta alimentaria.
- ♦ La ansiedad como rasgo de personalidad se asocia a un perfil lipídico más aterogénico en cuanto al colesterol total, al LDLc y a las partículas LDL en mujeres jóvenes y sanas.
- ♦ La electronegatividad de la HDL disminuye con la ansiedad actual y como rasgo de personalidad
- ♦ La carga eléctrica neta de la HDL es la variable con mayor poder de predicción de la ansiedad.

ESTUDIO 2. cIMT y carga eléctrica en LES

- ♦ La carga eléctrica de todas las lipoproteínas es negativa.
- ♦ Los pacientes con LES presentan una carga eléctrica de las lipoproteínas similar a los controles, excepto la de la VLDL que es menos electronegativa.
- ♦ En situación de brote la carga eléctrica de la IDL y de la LDL es más electronegativa.
- ♦ La carga eléctrica neta de la LDL de pacientes con LES se asocia negativamente con cIMT de forma independiente a la edad, el género, el IMC, el tabaquismo, la PCRus y el resto de parámetros lipídicos.

- ♦ La edad con un 33,6 %, el número de partículas IDL con un 7,9 % y la carga eléctrica neta de la LDL con un 4 % son las variables predictoras independientes de la cIMT en el LES.
- ♦ Los pacientes con LES que presentan placa ateromatosa, tienen un perfil lipídico más aterogénico.

ESTUDIO 3. Glicoformas de Apo CIII

- ♦ Las siete glicoformas de Apo CIII se pueden detectar en la totalidad de los individuos de una población de hombres jóvenes y sanos, a excepción de la Apo CIII-Of.
- ♦ La Apo CIII-1 es la más abundante, seguida de la CIII-2 y la CIII-0b.
- ♦ La distribución relativa de todas las glicoformas es igual tanto en plasma como en las lipoproteínas.
- ♦ Existe una amplia variabilidad interindividual en cuanto a las glicoformas de Apo CIII.
- ♦ Existen diversas correlaciones entre las glicoformas de Apo CIII y los diferentes parámetros del perfil lipídico:
 - La Apo CIII-0a se asocia positivamente al colesterol, LDLc y Apo B100.
 - La Apo CIII-0b se asocia negativamente a los TG y a todos los subtipos de partículas VLDL y de forma positiva al HDLc, Apo AI y HDL-P (totales, medianas y pequeñas)
 - La Apo CIII-2 se asocia negativamente con el HDLc, la Apo AI y HDL-P pequeñas de forma independiente a los niveles de TG.
- ♦ La ausencia de ácido siálico o la presencia de una o dos moléculas de éste en la Apo CIII afecta directamente sobre el efecto de la Apo CIII en el perfil lipídico.
- ♦ La determinación de las glicoformas de Apo CIII permite agrupar a los individuos en diferentes clústeres en función de cómo afecten estas glicoformas a los niveles de TG.

ESTUDIO 4. LPS y sus componentes

- ♦ El LPS y seis de sus componentes se pueden determinar en el plasma y las lipoproteínas de hombres jóvenes y sanos.

- ◆ No todos los 3-OH FAs están presentes en todos los individuos ni en todas las lipoproteínas.
- ◆ La distribución del LPS y sus componentes es diferente en plasma y en las lipoproteínas.
- ◆ Existe una amplia variabilidad interindividual en cuanto al contenido y distribución del LPS y sus componentes.
- ◆ La fracción lipoproteica que mayor contenido de LPS contiene es la LDL.
- ◆ Las partículas VLDL son las que más moléculas de LPS transportan por partícula.
- ◆ La mayoría de los 3-OH FAs se asocia negativamente con el perfil lipídico, excepto el 3-OH C16:0 que presenta una asociación positiva.

ESTUDIO 5. Relación entre las glicoformas de Apo CIII, LPS y sus componentes

- ◆ Las glicoformas de Apo CIII se asocian bien positiva o negativamente con el LPS y sus componentes en función de la glicoforma de la que se trate.
- ◆ No todos los componentes del LPS presentan asociaciones con todas las glicoformas de Apo CIII.
- ◆ La pérdida de una alanina en la Apo CIII revierte el efecto del ácido siálico sobre la interacción con el LPS.
- ◆ La presencia de ácido siálico en la Apo CIII dificulta directa o indirectamente la unión del LPS y/o de sus componentes a la lipoproteína.

CONCLUSIÓN GLOBAL

- ◆ El diámetro, el número de partículas y la carga eléctrica de las lipoproteínas, así como las glicoformas de Apo CIII y el contenido de LPS y sus componentes son propiedades que ayudan a detectar un perfil lipídico aterogénico y por consiguiente, a la prevención del riesgo cardiovascular.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Referencias

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

1. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Hear J.* 2012;33:1635–701.
2. Fulcher J, O'Connell R, Voysey M, Emberson J, Blackwell L, Mihaylova B, et al. Efficacy and safety of LDL-lowering therapy among men and women: meta-analysis of individual data from 174,000 participants in 27 randomised trials. *Lancet.* 2015;385:1397–405.
3. Dawber T, Meadors G, Moore FJ. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Heal Nations Helath.* 1951;41:279–81.
4. Castelli W. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease: the Framingham Heart Study. *Can J Cardiol.* 1988;4:Suppl A:5A-10A.
5. Ambegaonkar B, Bash L, Chirovsky D, Jameson K, Grant S, Nocea G, et al. Attainment of normal lipid levels among high cardiovascular risk patients: Pooles analysis of observational studies from the United Kingdom, Sweden, Spain and Canada. *Eur J Intern Med.* 2013;24:656–63.
6. Küllenberg D, Taylor LA, Schneider M, Massing U. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis.* 2012;11:3.
7. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:1183–94.
8. Pan X, Hussain MM. Gut triglyceride production. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821:727–35.
9. Hooper A, Burnett J, Watts G. Contemporary aspects of the biology and therapeutic regulation of the microsomal triglyceride transfer protein. *Circ Res.* 2015;116:193–205.
10. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25(3):200–6.
11. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, Villiers W De, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res.* 2009;50:90–7.
12. Wang C, Mc Conathy W, Kloer H, Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest.* 1985;75:384–90.
13. Krauss R, Herbert P, Levy R, Fredrickson D. Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. *Circ Res.* 1973;33:403–11.
14. Takahashi S, Suzuki J, Kohno M, Oida K, Tamai T, Miyabo S. Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low-density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 1995;270:15747–54.
15. Barter P, Rye K. Cholesteryl Ester Transfer Protein inhibitors as agents to reduce coronary heart disease risk. *Cardiol Clin.* 2018;36:299–310.
16. Rashid S, Sniderman A, Melone M, Brown P, Otvos J, Mente A, et al. Elevated cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity, a major determinant of the atherogenic dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease in South Asians. *Eur J Prev Cardiol.* 2015;22:468–77.
17. Alexandre F, Zago V, Panzoldo N, Parra E, Scherrer D, Vendrame F, et

- al. Reference values for high-density lipoprotein particle size and volume by dynamic light scattering in a Brazilian population sample and their relationships with metabolic parameters. *Clin Chim Acta*. 2015;442:63–72.
18. Levels JHM, Marquart JA, Abraham PR, Ende AE Van Den, Molhuizen HOF, Deventer SJH Van, et al. Lipopolysaccharide Is Transferred from High-Density to Low-Density Lipoproteins by Lipopolysaccharide-Binding Protein and Phospholipid Transfer Protein. *Infect Immun*. 2005;73:2321–6.
 19. Brunham L, Kruit J, Iqbal J, Fievet C, Timmins J, Pape T, et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 2006;116:1052–62.
 20. Temel R, Lee R, Kelley K, Davis M, Shah R, Sawyer J, et al. Intestinal cholesterol absorption is substantially reduced in mice deficient in both ABCA1 and ACAT2. *J Lipid Res*. 2005;46:2423–31.
 21. Zha X, Gauthier A, Genest J, McPherson R. Secretory vesicular transport from the Golgi is altered during ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1) mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2003;278:10002–5.
 22. Zambon A, Bertocco S, Vitturi N, Polentarutti V, Vianello D, Crepaldi G. Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerolrich lipoproteins. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:1070–4.
 23. Bergeron N, Phan B, Ding Y, Fong A, Krauss R. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Inhibition: A New Therapeutic Mechanism for Reducing Cardiovascular Disease Risk. *Circulation*. 2015;132:1648–66.
 24. Topchiy E, Cirstea M, Kong HJ, Boyd JH, Wang Y, Russell A, et al. Lipopolysaccharide Is Cleared from the Circulation by Hepatocytes via the Low Density Lipoprotein Receptor. *PLoS One*. 2016;11:1–15.
 25. Walley KR, Francis GA, Opal SM, Stein EA, Russell JA, Boyd JH. The central role of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in septic pathogen lipid transport and clearance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:1275–86.
 26. Borggreve S, De Vries R, Dullaart R. 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 Investig*. 2003;33:1051–69.
 27. Oram J, Lawn R. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res*. 2001;42:1173–9.
 28. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall A. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9774–9.
 29. Mendivil C, Furtado J, Morton A, Wang L, Sacks F. Novel pathways of apolipoprotein A-I metabolism in HDL of different sizes in humans. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2016;36:156–65.
 30. Jaye M, Krawiec J. Endothelial lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15:183–9.
 31. Williams K, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arter Thromb Vasc Biol*. 1995;15:551–61.
 32. Tabas I, Williams K, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007;116:1832–44.

33. Insull W. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *Am J Med.* 2009;122:S3-14.
34. Fogelstrand P, Borén J. Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012;22:1-7.
35. Camejo G. The interaction of lipids and lipoproteins with the intercellular matrix of arterial tissue: its possible role in atherogenesis. *Adv Lipid Res.* 1982;19:1-53.
36. Libby P, Ridker P, Hansson G. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473:317-25.
37. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:421-30.
38. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:36-46.
39. Tannock L. Proteoglycan-LDL interactions: A novel therapeutic target? *Atherosclerosis.* 2014;233:232-3.
40. Sparks D, Chatterjee C, Young E. Lipoprotein charge and vascular lipid metabolism. *Chem Phys Lipids.* 2008;154:1-6.
41. Olin-Lewis K, Krauss RM, La Belle M, Blanche PJ, Barrett PHR, Wight TN, et al. ApoC-III content of apoB-containing lipoproteins is associated with binding to the vascular proteoglycan biglycan. *J Lipid Res.* 2002;43:1969-77.
42. Hiukka A, Ståhlman M, Pettersson C, Levin M, Adiels M, Teneberg S, et al. ApoCIII-enriched LDL in type 2 diabetes displays altered lipid composition, increased susceptibility for sphingomyelinase, and increased binding to biglycan. *Diabetes.* 2009;58:2018-26.
43. Seeley J, Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol.* 2017;101:107-19.
44. Rosadini C, Kagan J. Early innate immune responses to bacterial LPS. *Curr Opin Immunol.* 2017;44:14-9.
45. Rosenfeld M, Campbell L. Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2011;106:858-67.
46. Lien E, Means T, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, et al. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest.* 2000;105:497-504.
47. Velloso LA, Folli F, Saad MJ. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota, and metabolic inflammation. *Endocr Rev.* 2015;36:245-71.
48. Cai L, Wang Z, Meyer JM, Ji A, van der Westhuyzen DR. Macrophage SR-BI regulates LPS-induced pro-inflammatory signaling in mice and isolated macrophages. *J Lipid Res.* 2012;53:1472-81.
49. Guo L, Song Z, Li M, Wu Q, Wang D, Feng H, et al. Scavenger Receptor BI Protects against septic death through its role in modulating inflammatory response. *J Biol Chem.* 2009;284:19826-34.
50. Nambi V, Chambless L, Folsom A, He M, Hu Y, Mosley T. 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;55:1600-7.
51. Lorenz M, Markus H, Bots M, 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.
52. Sehestedt T, Jeppesen J, Hansen T, Wachtell K, Ibsen H, Torp-

- Pedersen C. Risk prediction is improved by adding markers of subclinical organ damage to SCORE. *Eur Hear J.* 2010;31:883–91.
53. Polak J, Szklo M, Kronmal R, Burke G, Shea S, Zavodni A. The value of carotid artery plaque and intima-media thickness for incident cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J Am Hear Assoc.* 2013;2.
54. Iwamoto Y, Maruhashi T, Fujii Y, Idei N, Fujimura N, Mikami S. Intima-media thickness of brachial artery, vascular function, and cardiovascular risk factors. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2295–303.
55. Nambi V, Chambless L, He M, Folsom A, Mosley T, Boerwinkle E. 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 Hear J.* 2012;33:183–90.
56. De Groot E, van Leuven S, Duivenvoorden R, Meuwese M, Akdim F, Bots M. Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis. *Nat Clin Pr Cardiovasc Med.* 2008;5:280–8.
57. O’Leary D, Polak J, Kronmal R, Manolio T, Burke G, Wolfson S. 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.
58. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M. 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 Hear J.* 2013;34:2159–219.
59. Darabian S, Hormuz M, Latif M, Pahlevan S, Budoff M. The role of carotid intimal thickness testing and risk prediction in the development of coronary atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15:306.
60. Peters S, Den Ruijter H, Bots M, Moons K. Improvements in risk stratification for the occurrence of cardiovascular disease by imaging subclinical atherosclerosis: a systematic review. *Heart.* 2012;98:177–84.
61. Den Ruijter H, Peters S, Anderson T, Britton A, Dekker J, Eijkemans M. Common carotid intima-media thickness measurements in cardiovascular risk prediction: a meta-analysis. *JAMA.* 2012;22:796–803.
62. Lorenz M, 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 Hear J.* 2010;31:2041–8.
63. Jackson K, Knapper-Francis J, Morgan L, Webb D, Zampelas A, Williams C. Exaggerated postprandial lipaemia and lower post-heparin lipoprotein lipase activity in middle-aged men. *Clin Sci.* 2003;105:457–66.
64. Christensen B, Glueck C, Kwiterovich P, Degroot I, Chase G, Heiss G. Plasma cholesterol and triglyceride distributions in 13,665 children and adolescents: the Prevalence Study of the Lipid Research Clinics Program. *Pediatr Res.* 1980;14:192–202.

65. Anderson K, Wilson P, Garrison R, Castelli W. Longitudinal and secular trends in lipoprotein cholesterol measurements in a general population sample. The Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis*. 1987;68:59-66.
66. Hershcopf R, Elahi D, Andres R, Baldwin H, Raizes G, Schocken D. Longitudinal changes in serum cholesterol in man: an epidemiologic search for an etiology. *J Chronic Dis*. 1982;35:101-14.
67. Heiss G, Tamir I, Davis C, Tyroler H, Rifkand B, Schonfeld G. Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the lipid research clinics program prevalence study. *Circulation*. 1980;61:302-15.
68. Carroll M, Lacher D, Sorlie P, Cleeman J, Gordon D, Wolz M. Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002. *JAMA*. 2005;294:1773-81.
69. Ettinger W, Wahl P, Kuller L, Bush T, Tracy R, Manolio T. Lipoprotein lipids in older people. Results from the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group. *Circulation*. 1992;86:858-69.
70. Newschaffer C, Bush T, Hale W. Aging and total cholesterol levels: cohort, period, and survivorship effects. *Am J Epidemiol*. 1992;136:23-34.
71. Hak A, Karlson E, Feskanich D, Stampfer M, Costenbader K. Systemic lupus erythematosus and the risk of cardiovascular disease: results from the nurses' health study. *Arthritis Rheum*. 2009;61:1396-402.
72. Manzi S, Meilahn E, Rairie J, Conte C, Medsger TJ, 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.
73. Lloyd-Jones D, Larson M, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet*. 1999;353:89-92.
74. Lerner D, Kannel W. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Hear J*. 1986;111:383-90.
75. Rosenberg L, Hennekens C, Rosner B, Belanger C, Rothman K, Speizer F. Early menopause and the risk of myocardial infarction. *Am J Obs Gynecol*. 1981;139:47-51.
76. Kannel W, Hjortland M, McNamara P, Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med*. 1976;85:447-52.
77. Bittner V. Menopause, age, and cardiovascular risk: a complex relationship. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2374-5.
78. Guardiola M, Solà R, Vallvé JC, Girona 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*. 2015;9:824-31.
79. Skoglund-Andersson C, Tang R, Bond M, de Faire U, Hamsten A, Karpe F. LDL particle size distribution is associated with carotid intima-media thickness in healthy 50-year-old men. *Arter Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2422-30.
80. Mackey R, Kuller L, Sutton-Tyrrell K, Evans R, Holubkov R, Matthews K. Lipoprotein subclasses and coronary artery calcium in postmenopausal women from the healthy women study. *Am J Cardiol*. 2002;90:71i-76i.

81. Jago R, Drews K, Otvos J, Foster G, Marcus M, Buse J. Effect of relative weight group change on nuclear magnetic resonance spectroscopy derived lipoprotein particle size and concentrations among adolescents. *J Pediatr.* 2014;164:1091–8.
82. Zheng W, McLerran D, Rolland B, Zhang X, Inoue M, Matsuo K. Association between body-mass index and risk of death in more than 1 million Asians. *N Engl J Med.* 2011;364:719–29.
83. Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J. Body-mass index and cause-specific mortality in 900000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* 2009;373:1083–96.
84. Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan J, Flint A, Hannan L, MacInnis R. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med.* 2010;363:2211–9.
85. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115–26.
86. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868–74.
87. Willerson J, Ridker P. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation.* 2004;109:II2-II10.
88. Hansson G. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685–95.
89. Ridker P. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation.* 1998;98:839–44.
90. Barter P, Nicholls S, Rye K-A, Anantharamaiah G, Navab M, Fogelman A. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004;95:764–72.
91. Masana L, Girona J, Ibarretxe D, Rodríguez-Calvo R, Rosales R, Vallvé JC, et al. Clinical and pathophysiological evidence supporting the safety of extremely low LDL levels—The zero-LDL hypothesis. *J Clin Lipidol.* 2018;12:292–299.e3.
92. Gould A, Davies G, Alemao E, Yin D, Cook J. Cholesterol reduction yields clinical benefits: meta-analysis including recent trials. *Clin Ther.* 2007;29:778–94.
93. Gotto A, Britton E. 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;43:717–24.
94. Maron D. The epidemiology of low levels of high-density lipoprotein cholesterol in patients with and without coronary artery disease. *J Cardiol.* 2000;86:11L–14L.
95. Sharrett A, Ballantyne C, Coady S, Heiss G, Sorlie P, Catellier D. 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;104:1108–13.
96. Gordon D, Probstfield J, Garrison R, Neaton J, Castelli W, Knoke J, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989;79:8–15.
97. Briel M, Ferreira-Gonzalez I, You J, Karanicolas P, Akl E, Wu P. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *BMJ.* 2009;338:b32.
98. Cambien F, Jacqueson A, Richard J, Warnet J, Ducimetiere P, Claude

- J. 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.
99. Bainton D, Miller N, Bolton C, Yarnell J, Sweetnam P, Baker I. 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 Hear J.* 1992;68:60–6.
100. 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.
101. 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.
102. Criqui M, Heiss G, Cohn R, Cowan L, Suchindran C, Bangdiwala S. Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1993;328:1220–5.
103. 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.
104. Castelli W. The triglyceride issue: a view from Framingham. *Am Hear J.* 1986;112:432–7.
105. Hokanson J, Austin M. 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.
106. Smith S, Cooper G, Myers G, Sampson E. 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.
107. Wirtz PH, Ehlert U, Bärtschi C, Redwine LS, von Känel R. Changes in plasma lipids with psychosocial stress are related to hypertension status and the norepinephrine stress response. *Metabolism. Elsevier Inc.;* 2009;58:30–7.
108. Hamazaki K, Nishi D, Yonemoto N, Noguchi H, Kim Y, Matsuoka Y. The role of high-density lipoprotein cholesterol in risk for posttraumatic stress disorder: Taking a nutritional approach toward universal prevention. *Eur Psychiatry. Elsevier Masson SAS;* 2014;29(7):408–13.
109. Van Reedt Dortland AKB, Giltay EJ, Van Veen T, Van Pelt J, Zitman FG, Penninx BWJH. Associations between serum lipids and major depressive disorder: Results from the Netherlands study of depression and anxiety (NESDA). *J Clin Psychiatry.* 2010;71:729–36.
110. Huang TL, Wu SC, Chiang YS, Chen JF. Correlation between serum lipid, lipoprotein concentrations and anxious state, depressive state or major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 2003;118:147–53.
111. Roest AM, Martens EJ, de Jonge P, Denollet J. Anxiety and Risk of Incident Coronary Heart Disease. A Meta-Analysis. *J Am Coll Cardiol. Elsevier Inc.;* 2010;56:38–46.
112. Asanuma Y, Oeser A, Shintani A, Turner E, Olsen N, Fazio S, et al. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349:2407–15.
113. 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.
114. Chrousos G. Organization and Integration of the Endocrine System. *Sleep Med Clin.* 2007;2:125-45.
 115. Chrousos G, Gold P. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA.* 1992;267:1244-52.
 116. Selye H. The alarm reaction and the diseases of adaption. *Ann Intern Med.* 1948;29:403-15.
 117. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* (80-). 1981;213:1394-7.
 118. Gilbey M, Spyer K. Essential organization of the sympathetic nervous system. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1993;7:259-78.
 119. Kyrou I, Tsigos C. Stress mechanisms and metabolic complications. *Horm Metab Res.* 2007;39:430-8.
 120. Boumpas D, Chrousos G, Wilder R, Cupps T, Balow J. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med.* 1993;119:198-208.
 121. Chrousos G. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med.* 1995;332:1351-62.
 122. Munck A, Guyre P, Holbrook N. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev.* 1984;5:25-44.
 123. Mastorakos G, Weber J, Magiakou M, Gunn H, Chrousos G. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and stimulation of systemic vasopressin secretion by recombinant interleukin-6 in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:934-9.
 124. Brotman D, Golden S, Wittstein I. The cardiovascular toll of stress. *Lancet.* 2007;370:1089-100.
 125. Rozanski A, Blumenthal J, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation.* 1999;99:2192-217.
 126. Patterson SM, Gottdiner JS, Hecht G, Vargot S, Krantz DS. Effects of acute mental stress on serum lipids: mediating effects of plasma volume. *Psychosom Med.* 1993;55:525-32.
 127. Kyrou I, Tsigos C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:787-93.
 128. Anfossi G, Trovati M. Role of catecholamines in platelet function: pathophysiological and clinical significance. *Eur J Clin Investig.* 1996;26:353-70.
 129. Bhende A, Zade S, Wasu Y, Sitre S. Evaluation of physiological stress in college students during examination. *Biosci Biotech Res Comm.* 2010;3:203-5.
 130. Maduka I, Emeka E, Silas A. The relationship between serum cortisol, adrenaline, blood glucose and lipid profile of undergraduate students under examination stress. *Afr Health Sci.* 2015;15:131-6.
 131. Haro JM, Palacin C, Vilagut G, Martinez M, Bernal M, Luque I, et al. Prevalence of mental disorders and associated factors: results from the ESEMeD-Spain study. *Med Clin (Barc).* 2006;126:445-51.
 132. Wulsin L, Singal B. Do depressive symptoms increase the risk for the onset of coronary disease? A systematic quantitative review.

- Psychosom Med. 2003;65:201–10.
133. Jakobsen A, Foldager L, Parker G, Munk-Jorgensen P. Quantifying links between acute myocardial infarction and depression, anxiety and schizophrenia using case register databases. *J Affect Disord.* 2008;109:177–81.
 134. Paterniti S, Zureik M, Ducimetière P, Touboul P, Fève J, Alperovitch A. Sustained anxiety and 4-year progression of carotid atherosclerosis. *Arter Thromb.* 2001;21:136–41.
 135. Mistra T, Shankar R, Sharma I, Srivastava P. Serum lipids in anxiety neurosis. *Indian J Psychiat.* 1984;26:237–41.
 136. Pettersson K, Bejne B, Björk H, Strawn W, Bondjers G. Experimental sympathetic activation causes endothelial injury in the rabbit thoracic aorta via beta 1-adrenoceptor activation. *Circ Res.* 1990;67:1027–34.
 137. Sloan R, Shapiro P, Bagiella E, Myers M, Gorman J. Cardiac autonomic control buffers blood pressure variability responses to challenge: a psychophysiologic model of coronary artery disease. *Psychosom Med.* 1999;61:58–68.
 138. Cassidy K, Kotynia-English R, Acres J, Flicker L, Lautenschlager N, Almeida O. Association between lifestyle factors and mental health measures among community-dwelling older women. *Aust N Z Psychiatry.* 2004;38:940–7.
 139. Mojtabai R, Crum R. Cigarette smoking and onset of mood and anxiety disorders. *Am J Public Heal.* 2013;103:1656–65.
 140. van Reedt Dortland A, Vreeburg S, Giltay E, Licht C, Vogelzangs N, van Veen T, et al. The impact of stress systems and lifestyle on dyslipidemia and obesity in anxiety and depression. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38:209–18.
 141. Danchenko N, Satia J, Anthony M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus.* 2006;15:308–18.
 142. Scalzi L, Bhatt S, Gilkeson R, Shaffer M. The relationship between race, cigarette smoking and carotid intimal medial thickness in systemic lupus. *Lupus.* 2009;18:1289–97.
 143. Mok C, Lau C. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol.* 2003;56:481–90.
 144. McCombs R, Patterson J. Factors influencing the course and prognosis of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 1959;260:1195–204.
 145. Dubois E, Wierzbicki M, Cox M, Weiner J. Duration and death in systemic lupus erythematosus. *JAMA.* 1974;227:1399–402.
 146. Wallace D, Podell T, Weiner J, Cox M, Klinenberg J, Forouzes S, et al. Lupus nephritis. Experience with 230 patients in a private practice from 1950 to 1980. *Am J Med.* 1982;72:209–20.
 147. Carmona L, Gabriel R, Ballina J, Laffon A. Proyecto EPISER 2000: prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española. *Rev Esp Reum.* 2001;28:18–25.
 148. Siegel M, Lee S. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 1973;3:1–54.
 149. Ramsey-Goldman R, Manzi S. Systemic lupus erythematosus. *Women Heal.* 2000;704.
 150. Costenbader K, Feskanich D, Stampfer M, Karlson E. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum.* 2007;56:1251–62.

151. Cooper G, Dooley M, Treadwell E, St Clair E, Parks C, Gilkeson G. Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1714–24.
152. Zandman-Goddard G, Solomon M, Rosman Z, Peeva E, Shoenfeld Y. Environment and lupus-related diseases. *Lupus.* 2012;21:241–50.
153. Sanchez-Guerrero J, Karlson E, Liang M, Hunter D, Speizer F, Colditz G. Past use of oral contraceptives and the risk of developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:804–8.
154. McMurray R, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2100–10.
155. Murashima A, Fukazawa T, Hirashima M, Takasaki Y, Oonishi M, Nijima S, et al. Long term prognosis of children born to lupus patients. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:50–3.
156. Nath S, Han S, Kim-Howard X, Kelly J, Viswanathan P, Gilkeson G, et al. A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha(M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2008;40:152–4.
157. Hom G, Graham R, Modrek B, Taylor K, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med.* 2008;358:900–9.
158. Graham R, Hom G, Ortmann W, Behrens T. Review of recent genome-wide association scans in lupus. *J Intern Med.* 2009;265:680–8.
159. Moser K, Kelly J, Lessard C, Harley J. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2009;10:373–9.
160. Freemer M, King TJ, Criswell L. Association of smoking with dsDNA autoantibody production in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:581–4.
161. Perl A, Fernandez D, Telarico T, Phillips P. Endogenous retroviral pathogenesis in lupus. *Curr Opin Rheumatol.* 2010;22:483–92.
162. Barbhैया M, Costenbader K. Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2014;23:588–95.
163. Araújo-Fernández S, Ahijón-Lana M, Isenberg D. Drug-induced lupus: Including anti-tumour necrosis factor and interferon induced. *Lupus.* 2014;23:545–53.
164. Rubin L, Urowitz M, Gladman D. Mortality in systemic lupus erythematosus: the bimodal pattern revisited. *Q J Med.* 1985;55:87–98.
165. Bartels C, Buhr K, Goldberg J, Bell C, Visekruna M, Nekkanti S, et al. Mortality and cardiovascular burden of systemic lupus erythematosus in a US population-based cohort. *J Rheumatol.* 2014;41:680–7.
166. Lam G, Petri M. Assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2005;23:S120-130.
167. Gladman D, Urowitz M, Goldsmith C, Fortin P, Ginzler E, Gordon C. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:809–13.
168. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M. 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;39:363-9.
169. Hochberg M. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725-40.
 170. Petri M, Orbai A-M, Alarcón G, Gordon C, Merrill J, Fortin P. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2677-86.
 171. Joo Y, Bae S. Assessment of clinical manifestations, disease activity and organ damage in 996 Korean patients with systemic lupus erythematosus: comparison with other Asian populations. *Int J Rheum Dis.* 2015;18:117-28.
 172. Cojocaru M, Cojocaru I, Silosi I, Vrabie C. Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Med.* 2011;6:330-6.
 173. Saxena R, Mahajan T, Mohan C. Lupus nephritis: current update. *Arthritis Res Ther.* 2011;13:240-51.
 174. Petri M, Perez-Gutthann S, Spence D, Hochberg M. Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 1992;93:513-9.
 175. Wallace D, Podell T, Weiner J, Klinenberg J, Forouzesh S, Dubois E. Systemic lupus erythematosus: survival patterns. Experience with 609 patients. *JAMA.* 1981;245:934-8.
 176. Abu-Shakra M, Urowitz M, Gladman D, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. II. Predictor variables for mortality. *J Rheumatol.* 1995;22:1265-70.
 177. Alamanos Y, Voulgari P, Papassava M, Tsamandouraki K, Drosos A, Parassava M. Survival and mortality rates of systemic lupus erythematosus patients in northwest Greece. Study of a 21-year incidence cohort. *Rheumatology.* 2003;42:1122-3.
 178. Krishnan E. Stroke subtypes among young patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 2005;118:1415.
 179. Esdaile J, 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;44:23331-7.
 180. Reveille J, Bartolucci A, Alarcón G. 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.
 181. Font J, Ramos-Casals M, Cervera R, García-Carrasco M, Torras A, Sisó A. Cardiovascular risk factors and the long-term outcome of lupus nephritis. *QJM Mon J Assoc Physicians.* 2001;94:19-26.
 182. Kannel W, Wilson P. Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch Intern Med.* 1995;155:57-61.
 183. Ward M. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42:338-46.
 184. Haque S, Bruce I. Therapy insight: systemic lupus erythematosus as a risk factor for cardiovascular disease. *Nat Clin Pr Cardiovasc Med.* 2005;2:423-30.
 185. Haider Y, Roberts W. 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.

186. Bulkley B, Roberts W. 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(243-264).
187. Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald S, Rairie J, Tracy R, et al. Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42:51-60.
188. Kiani A, Vogel-Claussen J, Magder L, Petri M. Noncalcified coronary plaque in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2010;37:579-84.
189. Thompson T, Sutton-Tyrrell K, Wildman R, Kao A, Fitzgerald S, Shook B. Progression of carotid intima-media thickness and plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008;58:835-42.
190. Parra S, Vives G, Ferré R. Complement system and small HDL particles are associated with subclinical atherosclerosis in SLE patients. *Atherosclerosis.* 2012;225:224-30.
191. González M, Ribalta J, Vives G, Iftimie S, Ferre 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;37:2259-67.
192. Sinicato N a, da Silva Cardoso P a, Appenzeller S. Risk factors in cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Cardiol Rev.* 2013;9:15-9.
193. Petri M. Detection of coronary artery disease and the role of traditional risk factors in the Hopkins Lupus Cohort. *Lupus.* 2000;9:170-5.
194. Borchers A, Keen C, Shoenfeld Y, Gershwin M. Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2004;3:423-53.
195. Toloza S, Uribe A, McGwin G, Alarcón G, Fessler B, Bastian H. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA). XXIII. Baseline predictors of vascular events. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3947-57.
196. Gustafsson J, Simard J, Gunnarsson I, Elvin K, Lundberg I, Hansson L. Risk factors for cardiovascular mortality in patients with systemic lupus erythematosus, a prospective cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R46.
197. Mok C, Poon W, Lai J, Wong C, Chiu S, Wong C, et al. Metabolic syndrome, endothelial injury, and subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 2010;39:42-9.
198. Negrón A, Molina M, Mayor A, Rodríguez V, Vilá L. Factors associated with metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus from Puerto Rico. *Lupus.* 2008;17:348-54.
199. Sabio J, Zamora-Pasadas M, Jiménez-Jáimez, J Albadalejo F, Vargas-Hitos J, Rodríguez del Aguila M, Hidalgo-Tenorio C, et al. Metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus from Southern Spain. *Lupus.* 2009;17:849-59.
200. Borba E, Carvalho J, Bonfa E. Mechanisms of dyslipoproteinemias in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol.* 2006;13:203-8.
201. Juárez-Rojas J, Medina-Urrutia A, Posadas-Sánchez R, Jorge-Galarza E, Mendoza-Pérez E, Caracas-Portilla N, et al. High-density lipoproteins are abnormal in young women with uncomplicated systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2008;17:981-7.

202. Borba E, Bonfa E. Dyslipoproteinemias in systemic lupus erythematosus: influence of disease, activity and anticardiolipin antibodies. *Lupus*. 1997;6:533–9.
203. McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace D, Thong B. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:2541–9.
204. McMahon M, Grossman J, Skaggs B, Fitzgerald J, Sahakian L, Ragavendra N. Dysfunctional proinflammatory high-density lipoproteins confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2428–37.
205. Navab M, Anantharamaiah G, Reddy S, Van Lenten B, Hough G, Wagner A. Human apolipoprotein AI mimetic peptides for the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Invest Drugs*. 2003;4:1100–4.
206. Libby P. Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. *Am J Cardiol*. 2001;88:3–8.
207. Cockerill G, Rye K, Gamble J, Vadas M, Barter P. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arter Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1987–94.
208. Roman M, Shanker B-A, Davis A, Lockshin M, Sammaritano L, Simantov R. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2003;349:2399–406.
209. Skamra C, Ramsey-Goldman R. Management of cardiovascular complications in systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Rheumatol*. 2010;5:75–100.
210. Ridker P, Hennekens C, Buring J, 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.
211. Kahlenberg J, Kaplan M. Mechanisms of premature atherosclerosis in rheumatoid arthritis and lupus. *Annu Rev Med*. 2013;64:249–63.
212. Horwitz D, Jacob C. The cytokine network in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and possible therapeutic implications. *Semin Immunopathol*. 1994;16:181–200.
213. Frieri M. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2012;12:25–32.
214. Svenungsson E, Gunnarsson I, Fei G, Lundberg I, Klareskog L, Frostegard J. Elevated triglycerides and low levels of high-density lipoprotein as markers of disease activity in association with upregulation of the tumor necrosis factor alpha/tumor necrosis factor receptor system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2533–40.
215. Svenungsson E, Fei G, 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.
216. Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald S, Pratt J, Tracy R, Kuller L, et al. Comparison of risk factors for vascular disease in the carotid artery and aorta in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50:151–9.
217. Harris T, Ferrucci L, Tracy R, Corti M, Wacholder S, Ettinger W. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med*. 1999;106:506–12.

218. Huang Y, Schäfer-Elinder L, Wu R, Claesson H, Frostegård J. Lysophosphatidylcholine (LPC) induces proinflammatory cytokines by a platelet-activating factor (PAF) receptor-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol.* 1999;116:326–31.
219. Goudevenos J, Tselepis A, Vini M, Michalis L, Tsoukatos D, Elisaf M. Platelet-associated and secreted PAF-acetylhydrolase activity in patients with stable angina: sequential changes of the enzyme activity after angioplasty. *Eur J Clin Investig.* 2001;31:15–23.
220. Elinder L, Dumitrescu A, Larsson P, Hedin U, Frostegård J, Claesson H. Expression of phospholipase A2 isoforms in human normal and atherosclerotic arterial wall. *Arter Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2257–63.
221. Petri M, Roubenoff R, Dallal G, Nadeau M, Selhub J, Rosenberg I. Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1996;348:1120–4.
222. Shoenfeld Y, Sherer Y, George J, Harats D. Autoantibodies associated with atherosclerosis. *Ann Med.* 2000;32:37–40.
223. Sherer Y, Shoenfeld Y. Atherosclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:97–9.
224. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini M, Makino H, Sakairi N. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res.* 2003;44:716–26.
225. 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;8:220–6.
226. Bergmark C, Wu R, de Faire U, Lefvert A, Swedenborg J. Patients with early-onset peripheral vascular disease have increased levels of autoantibodies against oxidized LDL. *Arter Thromb Vasc Biol.* 1995;15:441–5.
227. Svenungsson E, Jensen-Urstad K, Heimbürger M, Silveira A, Hamsten A, De Faire U. Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Circulation.* 2001;104:1887–93.
228. Salonen J, Ylä-Herttua S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1992;339:883–7.
229. Lopez L, Salazar-Paramo M, Palafox-Sanchez C, Hurley B, Matsuura E, Garcia-De La Torre I. Oxidized low-density lipoprotein and β 2-glycoprotein I in patients with systemic lupus erythematosus and increased carotid intima-media thickness: implications in autoimmune-mediated atherosclerosis. *Lupus.* 2006;15:80–6.
230. Frostegård J. SLE, atherosclerosis and cardiovascular disease. *J Intern Med.* 2005;257:485–95.
231. Turner E, Dishy V, Chung C, Harris P, Pierces R, Asanuma Y. 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.
232. Zonana-Nacach A, Barr S, Magder L, Petri M. Damage in systemic lupus erythematosus and its association with corticosteroids. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1801–8.
233. 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.
234. Bellomio V, Spindler A, Lucero E, Berman A, Santana M, Moreno C. Systemic lupus erythematosus: mortality and survival in Argentina. A multicenter study. *Lupus.* 2000;9:377-81.
235. Leong K, Koh E, Feng P, Boey M. Lipid profiles in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1994;21:1264-7.
236. Rahman P, Gladman D, Urowitz M, Yuen K, Hallett D, Bruce I. The cholesterol lowering effect of antimalarial drugs is enhanced in patients with lupus taking corticosteroid drugs. *J Rheumatol.* 1999;26:325-30.
237. Braunwald E. Shattuck lecture: cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med.* 1997;337:1360-9.
238. Grundy S, Cleeman J, Merz C, Brewer H, Clark L, Hunninghake D. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2004;24:e149-161.
239. Festa A, Williams K, Hanley A, Otvos J, Goff D, Wagenknecht L, et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation.* 2005;111:3465-72.
240. Mora S, Otvos J, Rosenson R, Pradhan A, Buring J, Ridker P. Lipoprotein particle size and concentration by nuclear magnetic resonance and incident type 2 diabetes in women. *Diabetes.* 2010;59:1153-60.
241. Mora S, Otvos J, Rifai N, Rosenson R, Buring J, Ridker P. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation.* 2009;119:931-9.
242. Austin M, Breslow J, Hennekens C, Buring J, Willett W, Krauss R. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA.* 1988;260:1917-21.
243. Gentile M, Panico S, Mattiello A, Ubaldi S, Iannuzzo G, De Michele M, et al. Association between small dense LDL and early atherosclerosis in a sample of menopausal women. *Clin Chim Acta.* 2013;426:1-5.
244. Hulthe J, Bokemark L, Wikstrand J, Fagerberg B. The metabolic syndrome, LDL particle size, and atherosclerosis: the Atherosclerosis and Insulin Resistance (AIR) study. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2140-7.
245. St-Pierre A, Cantin B, Dagenais G, Mauriège P, Bernard P, Després J. 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. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2005;25:553-9.
246. St-Pierre A, Ruel I, Cantin B, Dagenais G, Bernard P, Després J. Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation.* 2001;104:2295-9.
247. Williams P, Zhao X-Q, Marcovina S, Otvos J, Brown B, Krauss R. Comparison of four methods of analysis of lipoprotein particle subfractions for their association with angiographic progression of coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2014;233:713-20.

248. Lucero E, Zago V, López G, Cacciagiù L, López G, Wikinski R, et al. Predominance of large VLDL particles in metabolic syndrome, detected by size exclusion liquid chromatography. *Clin Biochem.* 2012;45:293–7.
249. Johnson J, Slentz C, Duscha B, Samsa G, McCartney J, Houmard J. Gender and racial differences in lipoprotein subclass distributions: the STRRIDE study. *Atherosclerosis.* 2004;176:371–7.
250. Furusyo N, Ai M, Okazaki M, Ikezaki H, Ihara T, Hayashi T. Serum cholesterol and triglyceride reference ranges of twenty lipoprotein subclasses for healthy Japanese men and women. *Atherosclerosis.* 2013;231:238–45.
251. Nikkilä M, Pitkälä T, Koivula T, Solakivi T, Lehtimäki T, Laippala P. Women have a larger and less atherogenic low density lipoprotein particle size than men. *Atherosclerosis.* 1996;119:181–90.
252. Campos H, Moye L, Glasser S, Stampfer M, Sacks F. Low-density lipoprotein size, pravastatin treatment, and coronary events. *JAMA.* 2001;286:1468–74.
253. Kuller L, Grandits G, Cohen J, Neaton J, Prineas R. Lipoprotein particles, insulin, adiponectin, C-reactive protein and risk of coronary heart disease among men with metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2007;195:122–8.
254. Otvos J, Collins D, Freedman D, Shalaurova I, Schaefer E, McNamara J. 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;113:1556–63.
255. Masulli M, Patti L, Riccardi G, Vaccaro O, Annuzzi G, Ebbesson S. Relation among lipoprotein subfractions and carotid atherosclerosis in Alaskan Eskimos (from the GOCADAN Study). *Am J Cardiol.* 2009;104:1516–21.
256. Campos H, Roederer G, Lussier-Cacan S, Davignon J, Krauss R. Predominance of large LDL and reduced HDL2 cholesterol in normolipidemic men with coronary artery disease. *Arter Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1043–8.
257. Takahashi R, Taguchi N, Suzuki M, Cheng X, Numaguchi Y, Tsukamoto H. Cholesterol and triglyceride concentrations in lipoproteins as related to carotid intima-media thickness. *Int Hear J.* 2012;53:29–34.
258. Mora S, Szklo M, Otvos J, Greenland P, Psaty B, Goff D. LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Arteriosclerosis.* 2007;192:211–7.
259. Berneis K, Krauss R. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* 2002;43:1363–79.
260. Kontush A, Chapman M. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006;58:342–74.
261. Kontush A, Chapman M. Antiatherogenic small, dense HDL: guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pr Cardiovasc Med.* 2006;3:144–53.
262. Watanabe H, Söderlund S, Soro-Paavonen A, Hiukka A, Leinonen E, Alagona C. Decreased high-density lipoprotein (HDL) particle size, prebeta-, and large HDL subspecies concentration in Finnish low-HDL

- families: relationship with intima-media thickness. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2006;26:897-902.
263. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Gulan B. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: Prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis.* 2010;210:548-54.
264. Syväne M, Nieminen M, Frick M, Kauma H, Majahalme S, Virtanen V. 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;98:1993-9.
265. Asztalos B, Collins D, Horvath K, Bloomfield H, Robins S, Schaefer E. Relation of gemfibrozil treatment and high-density lipoprotein subpopulation profile with cardiovascular events in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Metabolism.* 2008;57:77-83.
266. Yu S, Yamell J, Sweetnam P, Bolton C. High density lipoprotein subfractions and the risk of coronary heart disease: 9-years follow-up in the Caerphilly Study. *Atherosclerosis.* 2003;166:331-8.
267. Miller N. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Hear J.* 1987;113:589-97.
268. Drexel H, Amann F, Rentsch K, Neuenschwander C, Luethy A, Khan S. Relation of the level of high-density lipoprotein subfractions to the presence and extent of coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1992;70:436-40.
269. Mueller O, Chang E, Deng D, Franz T, Jing D, Kincaid R. PROCAM Study: risk prediction for myocardial infarction using microfluidic high-density lipoprotein (HDL) subfractionation is independent of HDL cholesterol. *Clin Chem Lab Med.* 2008;46:490-8.
270. Asztalos B, Cupples A, Demissie S, Horvath K, Cox C, Batista M. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2181-7.
271. Johansson J, Carlson L, Landou C, Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arter Thromb.* 1991;11(174-182).
272. Jeyarajah E, Cromwell W, Otvos J. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab Med.* 2006;26:847-70.
273. Desai M, Rodriguez A, Wasserman B, Gerstenblith G, Agarwal S, Kennedy M. Association of cholesterol subfractions and carotid lipid core measured by MRI. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2005;25:110-1.
274. Castro G, Fielding C. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry.* 1988;27:25-9.
275. Drexel H, Amann F, Beran J, Rentsch K, Candinas R, Muntwyter J. Plasma triglycerides and three lipoprotein cholesterol fractions are independent predictors of the extent of coronary atherosclerosis. *Circulation.* 1994;90:2230-5.
276. Drexel H, Steuer J, Muntwyter J, Meienberg S, Schmid H, Schneider E. Predictors of the presence and extent of peripheral arterial occlusive

- disease. *Circulation*. 1996;94:199–205.
277. Sniderman A, Williams K, Contois J, Monroe H, McQueen M, de Graaf J, et al. A meta-analysis of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B as markers of cardiovascular risk. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2011;4:337–45.
278. Soedamah-Muthu S, Chang Y, Otvos J, Evans R, Orchard T. 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;46:674–82.
279. Kuller L, Arnold A, Tracy R, J O, Burke G, Psaty B. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of lipoproteins and risk of coronary heart disease in the cardiovascular health study. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1175–80.
280. Ip S, Lichtenstein A, Chung M, Lau J, Balk E. Systematic review: association of low-density lipoprotein subfractions with cardiovascular outcomes. *Ann Intern Med*. 2009;150:474–84.
281. Blake G, Otvos J, Rifai N, Ridker P. Low-density lipoprotein particle concentration and size as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy as predictors of cardiovascular disease in women. *Circulation*. 2002;106:1930–7.
282. Asztalos B, Collins D, Cupples L, Demissie S, Horvath K, Bloomfield H. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2185–91.
283. Steiner G, Tkác I, Uffelman K, Lewis G. Important contribution of lipoprotein particle number to plasma triglyceride concentration in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 1998;137:211–4.
284. Nordestgaard B, 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. *Arter Thromb*. 1992;12:6–18.
285. Sniderman A, St-Pierre A, Cantin B, Dagenais G, Després J, Lamarche B. Concordance/discordance between plasma apolipoprotein B levels and the cholesterol indexes of atherosclerotic risk. *Am J Cardiol*. 2003;91:1173–7.
286. Otvos J, Mora S, Shalaurova I, Greenland P, Mackey R, Goff D. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *J Clin Lipidol*. 2011;5:105–13.
287. Sparks D, Frank P, Neville T. Effect of the surface lipid composition of reconstituted LPA-I on apolipoprotein A-I structure and lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1390:160–72.
288. Morton R, Greene D. The surface cholesteryl ester content of donor and acceptor particles regulates CETP: a liposome-based approach to assess the substrate properties of lipoproteins. *J Lipid Res*. 2003;44:1364–72.
289. Boucher J, Nguyen T, Sparks D. Lipoprotein electrostatic properties regulate hepatic lipase association and activity. *Biochem Cell Biol*. 2007;85:696–708.
290. Zhao Y, Sparks D, Marcel Y. Specific phospholipid association with

- apolipoprotein A-I stimulates cholesterol efflux from human fibroblasts. Studies with reconstituted sonicated lipoproteins. *J Biol Chem.* 1996;271:25145–51.
291. Zhao Y, Sparks D, Marcel Y. Effect of the apolipoprotein A-I and surface lipid composition of reconstituted discoidal HDL on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. *Biochemistry.* 1996;35:16510–8.
292. Burgess JW, Boucher J, Neville T a-M, Rouillard P, Stamler C, Zachariah S, et al. Phosphatidylinositol promotes cholesterol transport and excretion. *J Lipid Res.* 2003;44:1355–63.
293. Gofman J, Lindgren F, Elliot H. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem.* 1949;179:973–8.
294. Noble R. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J Lipid Res.* 1968;9:693–700.
295. Fredrickson D, Lees R. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia. *Circulation.* 1965;31:321–7.
296. Davidson D, Phillips M. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res.* 1992;33:123–30.
297. Davidson W, Sparks D, Lund-Katz S, Phillips M. The molecular basis for the difference in charge between pre-beta and alpha-migrating high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1994;269:8959–65.
298. de Castellarnau C, Bancells C, Benítez S, Reina M, Ordóñez-Llanos J, Sánchez-Quesada J. Atherogenic and inflammatory profile of human arterial endothelial cells (HUAEC) in response to LDL subfractions. *Clin Chim Acta.* 2007;376:233–6.
299. de Queiroz Mello A, da Silva I, Oliveira A, Nunes V, Abdalla D, Gidlund M, et al. Electronegative low-density lipoprotein is associated with dense low-density lipoprotein in subjects with different levels of cardiovascular risk. *Lipids.* 2010;45:619–25.
300. Ke L, Stancel N, Bair H, Chen C. The underlying chemistry of electronegative LDL's atherogenicity. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16:428.
301. Yang C, Chen H, Huang M, Raya J, Yang J, Chen C, et al. Pro-apoptotic low-density lipoprotein subfractions in type II diabetes. *Atherosclerosis.* 2007;193:283–91.
302. Estruch M, Sánchez-Quesada J, Beloki L, Ordóñez-Llanos J, Benítez S. The Induction of Cytokine Release in Monocytes by Electronegative Low-Density Lipoprotein (LDL) Is Related to Its Higher Ceramide Content than Native LDL. *Int J Mol Sci.* 2013;14:2601–16.
303. Chen C-H, Lu J, Chen S-H, Huang RY, Yilmaz HR, Dong J, et al. Effects of electronegative VLDL on endothelium damage in metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2012 Mar;35:648–53.
304. Estruch M, Sánchez-Quesada JL, Ordóñez Llanos J, Benítez S. Electronegative LDL: a circulating modified LDL with a role in inflammation. *Mediators Inflamm.* 2013 Jan;2013:181324.
305. Damasceno N, Sevanian A, Apolinário E, Oliveira J, Fernandes I, Abdalla D. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL-) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. *Clin Biochem.* 2006;39:28–38.
306. Benítez S, Pérez A, Sánchez-Quesada J, Wagner A, Rigla M, Arcelus R, et al. Electronegative low-density lipoprotein subfraction from type 2 diabetic subjects is proatherogenic and unrelated to glycemic control. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007;23:26–34.

307. Zhang B, Böttcher A, Imaizumi S, Noda K, Schmitz G, Saku K. Relation between charge-based apolipoprotein B-containing lipoprotein subfractions and remnant-like particle cholesterol levels. *Atherosclerosis*. 2007;191:153–61.
308. Chen H, Hosken BD, Huang M, Gaubatz JW, Myers CL, Macfarlane RD, et al. Electronegative LDLs from familial hypercholesterolemic patients are physicochemically heterogeneous but uniformly proapoptotic. *J Lipid Res*. 2007 Jan;48:177–84.
309. Bancells C, Benítez S, Villegas S, Jorba O, Ordóñez-Llanos J, Sánchez-Quesada J. Novel phospholipolytic activities associated with electronegative low-density lipoprotein are involved in increased self-aggregation. *Biochemistry*. 2008;47:8186–94.
310. Blanco F, Villegas S, Benítez S, Bancells C, Diercks T, Ordóñez-Llanos J, et al. 2D-NMR reveals different populations of exposed lysine residues in the apoB-100 protein of electronegative and electropositive fractions of LDL particles. *J Lipid Res*. 2010;51:1560–5.
311. Bancells C, Cansals F, Benítez S, Colomé N, Julve J, Ordóñez-Llanos J, et al. Proteomic analysis of electronegative low-density lipoprotein. *J Lipid Res*. 2010;51:3508–15.
312. Hsu J-F, Chou T-C, Lu J, Chen S-H, Chen F-Y, Chen C-C, et al. Low-density lipoprotein electronegativity is a novel cardiometabolic risk factor. *PLoS One*. 2014 Jan;9:e107340.
313. Chen C, Hsu H, Lee A, Tang D, Chow L, Yang C, et al. The most negatively charged low-density lipoprotein L5 induces stress pathways in vascular endothelial cells. *J Vasc Res*. 2012;49:329–41.
314. Bancells C, Benítez S, Jauhiainen M, Ordóñez-Llanos J, Kovanen P, Villegas S, et al. High binding affinity of electronegative LDL to human aortic proteoglycans depends on its aggregation level. *J Lipid Res*. 2009;50:446–55.
315. Sparks D, Frank P, Braschi S, Neville T, Marcel Y. Effect of apolipoprotein A-I lipidation on the formation and function of pre-beta and alpha-migrating LpA-I particles. *Biochemistry*. 1999;38:1727–35.
316. Hsieh J-Y, Chang C-T, Huang MT, Chang C-M, Chen C-Y, Shen M-Y, et al. Biochemical and functional characterization of charge-defined subfractions of high-density lipoprotein from normal adults. *Anal Chem*. 2013;85:11440–8.
317. Desrumaux C, Athias A, Masson D, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L. Influence of the electrostatic charge of lipoprotein particles on the activity of the human plasma phospholipid transfer protein. *J Lipid Res*. 1998 Jan;39:131–42.
318. Masson D, Athias A, Lagrost L. Evidence for electronegativity of plasma high density lipoprotein-3 as one major determinant of human cholesteryl ester transfer protein activity. *J Lipid Res*. 1996;37:1579–90.
319. Nishida H, Arai H, Nishida T. Cholesterol ester transfer mediated by lipid transfer protein as influenced by changes in the charge characteristics of plasma lipoprotein. *J Biol Chem*. 1993;268:16352–60.
320. Ivanova E, Orekhov A. LDL electronegativity index: a potential novel index for predicting cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2015;11:525.
321. Chu C, Wang Y, Lu L, Walton B, Yilmaz H, Huang R, et al. Electronegative low-density lipoprotein increases C-reactive protein

- expression in vascular endothelial cells through the LOX-1 receptor. *PLoS One*. 2013;8:e070533.
322. Bancells C, Ordóñez-Llanos J, Oorni K, Kovanen P, Milne R, Sánchez-Quesada J. Immunochemical analysis of the electronegative LDL subfraction shows that abnormal N-terminal apolipoprotein B conformation is involved in increased binding to proteoglycans. *J Biol Chem*. 2011;6:1125–33.
323. Bancells C, Villegas S, Blanco FJ, Benitez S, Gallego I, Beloki L, et al. Aggregated Electronegative Low Density Lipoprotein in Human Plasma Shows a High Tendency toward Phospholipolysis and Particle Fusion. *J Biol Chem*. 2010;285:32425–35.
324. Lu J, Jiang W, Yang J, Chang P, Walterscheid JP, Chen H, et al. Electronegative LDL impairs vascular endothelial cell integrity in diabetes by disrupting fibroblast growth factor 2 (FGF2) autoregulation. *Diabetes*. 2008;57:158–66.
325. Chan H-C, Ke L-Y, Chu C-S, Lee A-S, Shen M-Y, Cruz M a, et al. Highly electronegative LDL from patients with ST-elevation myocardial infarction triggers platelet activation and aggregation. *Blood*. 2013;122(22):3632–41.
326. Sánchez-Quesada J, Camacho M, Antón R, Benítez S, Vila L, Ordóñez-Llanos J. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2003;166:261–70.
327. Chen C-H, Jiang T, Yang J-H, Jiang W, Lu J, Marathe GK, et al. Low-density lipoprotein in hypercholesterolemic human plasma induces vascular endothelial cell apoptosis by inhibiting fibroblast growth factor 2 transcription. *Circulation*. 2003;107:2102–8.
328. Benítez S, Camacho M, Bancells C, Vila L, Sánchez-Quesada J, Ordóñez-Llanos J. Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761:1014–21.
329. Lu J, Yang J, Burns A, Chen H, Tang D, Walterscheid J, et al. Mediation of electronegative low-density lipoprotein signaling by LOX-1: a possible mechanism of endothelial apoptosis. *Circ Res*. 2009;104:619–27.
330. Avogaro P, Bon G, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis*. 1988;8:79–87.
331. Yang C, Raya J, Chen H, Chen C, Abe Y, Pownall H, et al. Isolation, characterization, and functional assessment of oxidatively modified subfractions of circulating low-density lipoproteins. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1083–90.
332. Asatryan L, Hamilton R, Isas J, Hwang J, Kaye R, Sevanian A. LDL phospholipid hydrolysis produces modified electronegative particles with an unfolded apoB-100 protein. *J Lipid Res*. 2005;46:115–22.
333. Walters M, Wrenn S. Effect of sphingomyelinase-mediated generation of ceramide on aggregation of low-density lipoprotein. *Langmuir*. 2008;24:9642–7.
334. Zilverman D. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*. 1979;60:473–85.
335. Bansal S, Buring J, Rifai N, Mora S, Sacks F, Rodker P. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA*. 2007;298:309–16.
336. Assmann G, Schulte H, Funke H, Von Eckardstein A. The emergence

- of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *Eur Hear J.* 1998;19:8–14.
337. Nordestgaard B, 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;298:299–308.
338. Crosby J, Peloso G, Auer P, Crosslin D, Stitzel N, Lange L, et al. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med.* 2014;371:22–31.
339. Mendivil C, Zheng C, Furtado J, Lel J, Sacks F. Metabolism of very-low-density lipoprotein and low-density lipoprotein containing apolipoprotein C-III and not other small apolipoproteins. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2010;30:239–45.
340. Zheng C, Khoo C, Furtado J, Sacks F. Apolipoprotein C-III and the metabolic basis for hypertriglyceridemia and the dense low-density lipoprotein phenotype. *Circulation.* 2010;121:1722–34.
341. Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low-density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem.* 1991;266:18259–67.
342. Kinnunen P, Ehnolm C. Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett.* 1976;65:354–7.
343. Sundaram M, Zhong S, Bou Khalil M, Links P, Zhao Y, Iqbal J, et al. Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. *J Lipid Res.* 2010;51:150–61.
344. Jensen M, Rimm E, Furtado J, Sacks F. Apolipoprotein C-III as a Potential Modulator of the Association Between HDL-Cholesterol and Incident Coronary Heart Disease. *J Am Hear Assoc.* 2012;1:e000232.
345. Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, Besler C, Mocharla P, Mueller M, et al. Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. *Circulation.* 2013;127:891–904.
346. Kawakami A, Yoshida M. Apolipoprotein CIII links dyslipidemia with atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16:6–11.
347. Kawakami A, Aikawa M, Libby P, Alcaide P, Lusinskas F, Sacks F. Apolipoprotein CIII in apolipoprotein B lipoproteins enhances the adhesion of human monocytic cells to endothelial cells. *Circulation.* 2006;113:691–700.
348. Kawakami A, Aikawa M, Alcaide P, Lusinskas F, Libby P, Sacks F. Apolipoprotein CIII induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells and increases adhesion of monocytic cells. *Circulation.* 2006;114:681–7.
349. Jørgensen A, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard B, Tybjaerg-Hansen A. Loss of function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med.* 2014;371:32–41.
350. Pollin T, Damcott C, Shen H, Ott S, Shelton J, Horenstein R, et al. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science (80-).* 2008;322:1702–5.
351. Sacks F, Alaupovic P, Moye L, Cole T, Sussex B, Stampfer M, et al. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary

- events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation*. 2000;102:1886–92.
352. Mendivil C, Rimm E, Furtado J, Chiuve S, Sacks F. Low-density lipoproteins containing apolipoprotein C-III and the risk of coronary heart disease. *Circulation*. 2011;124:2065–72.
353. Brewer H, Shulman R, Herbert P, Ronan R, Wehrly K. The complete amino acid sequence of alanine apolipoprotein (apoC-III), an apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1974;249:4975–84.
354. Vaith P, Assmann G, Uhlenbruck G. Characterization of the oligosaccharide side chain of apolipoprotein C-III from human plasma very low density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1978;541:234–40.
355. Kashyap ML, Srivastava LS, Hynd B a, Gartside PS, Perisutti G. Quantitation of human apolipoprotein C-III and its subspecies by radioimmunoassay and analytical isoelectric focusing: abnormal plasma triglyceride-rich lipoprotein apolipoprotein C-III subspecies concentrations in hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*. 1981;22:800–10.
356. Mauger J-F. Apolipoprotein C-III isoforms: kinetics and relative implication in lipid metabolism. *J Lipid Res*. 2006;47:1212–8.
357. Bosello O, Cominacini L, Zocca I, Garbin U, Ferrari F, Davoli A. Effects of severe caloric restriction on the degree of sialylation of apoprotein C-III in obese women. *Ann Nutr Metab*. 1985;29:33–9.
358. Falko J, Schonfeld G, Witztum J, Kolar J, Salmon P. Effects of short-term high carbohydrate, fat-free diet on plasma levels of Apo C-II and Apo C-III and on the Apo C subspecies in human plasma lipoproteins. *Metabolism*. 1980;29:654–61.
359. Savinova O, Fillaus K, Jing L, Harris W, Shearer G. Reduced apolipoprotein glycosylation in patients with the metabolic syndrome. *PLoS One*. 2014;9:e104833.
360. Lindbohm N, Gylling H, Miettinen T, Miettinen T. Sialic acid content of LDL and lipoprotein metabolism in combined hyperlipidemia and primary moderate hypercholesterolemia. *Clin Chim acta*. 1999;285:69–84.
361. Mann CJ, Troussard AA, Yen FT, Hannouche N, Najib J, Fruchart JC, et al. Inhibitory effects of specific apolipoprotein C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:31348–54.
362. Whitfield C, Trent MS. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem*. 2014;83:99–128.
363. Osborn M, Rosen S, Rothfield L, Zeleznick L, Horecker B. Lipopolysaccharide of the gram-negative cell wall. *Science* (80-). 1964;145:783–9.
364. Kraśnik L, Szponar B, Walczak M, Larsson L, Gamian A. Routine clinical laboratory tests correspond to increased serum levels of 3-hydroxy fatty acids, markers of endotoxins, in cardiosurgery patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006;54:55–60.
365. Morrison D, Ryan J. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med*. 1987;38:417–32.
366. Kallio K, Hätönen K, Lehto M, Salomaa V, Männistö S, Pussinen PJ. Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta Diabetol*. 2015;52:395–404.
367. Cani P, Amar J, Iglesias M, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al.

- Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56:1761–72.
368. Cani P, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck A, Delzenne N, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57:1470–81.
369. Koren O, Spor A, Felin J, Fåk F, Stombaugh J, Tremaroli V, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl:4592–8.
370. Patel P, Shah R, Ferguson J, Reilly M. Human experimental endotoxemia in modeling the pathophysiology, genomics, and therapeutics of innate immunity in complex cardiometabolic diseases. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:525–34.
371. Pussinen PJ, Havulinna AS, Lehto M, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia is associated with an increased risk of incident diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34:392–7.
372. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Silva NF Da, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocr metab*. 2007;292:740–7.
373. Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuño MI, Murri M, Boto-Ordoñez M, Perez-Martinez P, Andres-Lacueva C, et al. Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J Lipid Res*. 2012;53:973–8.
374. Mokkala K, Pellonperä O, Röytiö H, Pussinen P, Rönnemaa T, Laitinen K. Increased intestinal permeability, measured by serum zonulin, is associated with metabolic risk markers in overweight pregnant women. *Metabolism*. 2017;69:43–50.
375. Van Lenten BJ, Fogelman AM, Haberland ME, Edwards PA. The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide. *Pnas*. 1986;83:2704–8.
376. Vergès B, Duvillard L, Lagrost L, Vachoux C, Garret C, Bouyer K, et al. Changes in lipoprotein kinetics associated with type 2 diabetes affect the distribution of lipopolysaccharides among lipoproteins. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:1245–53.
377. Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu A, Wright SD. Neutralization and Transfer of Lipopolysaccharide by Phospholipid Transfer Protein *. *J Biol Chem*. 1996;271:12172–8.
378. Vreugdenhil A, Rousseau C, Hartung T, Greve J, van 't Veer C, Buurman W. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. *J Immunol*. 2003;170:1399–405.
379. Kitchens R, Thompson P, Viriyakosol S, O'Keefe G, Munford R. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest*. 2001;108:485–93.
380. Ulevitch R, Johnston A, Weinstein D. New function for high density lipoproteins. Their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest*. 1979;64:1516–24.
381. Navab M, Hough G, Van Lenten B, Berliner J, Fogelman A. Low density lipoproteins transfer bacterial lipopolysaccharides across endothelial monolayers in a biologically active form. *J Clin Invest*. 1988;81:601–5.
382. Levels JHM, Abraham PR. Distribution and Kinetics of Lipoprotein-Bound Endotoxin. *Society*. 2001;69:2821–8.

383. Trenchevska O, Schaab MR, Nelson RW, Nedelkov D. Development of multiplex mass spectrometric immunoassay for detection and quantification of apolipoproteins C-I, C-II, C-III and their proteoforms. *Methods*. 2015;81:86–92.
384. Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499–502.
385. Ottos J, Jeyarajah E, Bennett D, Krauss R. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem*. 1992;38:1632–8.
386. Mallol R, Amigó N, Rodríguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, et al. Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered ¹H NMR spectroscopy. *J Lipid Res*. 2015;56:737–46.
387. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955;34:1345–50.
388. Gofman J, Lindgren F, Elliott H. Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem*. 1949;179:973–9.
389. Expression of the Uncertainty of Measurement in Calibration. European Cooperation for Accreditation. 1999.
390. Polak J, O'Leary D, Kronmal R, Wolfson S, Bond M, Tracy R. Sonographic evaluation of carotid artery atherosclerosis in the elderly: relationship of disease severity to stroke and transient ischemic attack. *Radiology*. 1993;188:363–70.
391. De Pablo, J., Baillès, E., Pérez, J, i Valdés M. Construcción de una escala de estrés académico para estudiantes universitarios. *Educ Médica*. 2002;25:40–6.
392. Muñoz J, Fernández-Hermida J. La opinión de los psicólogos españoles sobre el uso de los test. *Papeles del psicólogo*. 2010;31:108–21.
393. Spielberger C, Gorsuch R, Lushene R. STAI Cuestionario de Ansiedad Estado-Rasgo. 8ª. TEA ediciones, S.A.; 2011.
394. Koska J, Yassine H, Trenchevska O, Sinari S, Schwenke DC, Yen FT, et al. Disialylated apolipoprotein C-III proteoform is associated with improved lipids in prediabetes and type 2 diabetes. *J Lipid Res*. 2016;57:894–905.
395. Reynolds SJ, Milton DK, Heederik D, Thorne PS, Donham KJ, Croteau EA, et al. Interlaboratory evaluation of endotoxin analyses in agricultural dusts - comparison of LAL assay and mass spectrometry. *J Environ Monit*. 2005;7:1371–7.
396. Szponar B, Norin E, Midtvedt T, Larsson L. Limitations in the use of 3-hydroxy fatty acid analysis to determine endotoxin in mammalian samples. *J Microbiol Methods*. 2002;50:283–9.
397. Sánchez-Quesada J, Villegas S, Ordóñez-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. A link between apolipoprotein B misfolding, lipoprotein aggregation and proteoglycan binding. *Curr Opin Lipidol*. 2012;23(5):479–86.
398. Ceccon F, Azevedo V, Engelhorn C, Abdalla D, Faulin T, Guarita-Souza L, et al. Evaluation of sub-clinical atherosclerosis and plasma levels of minimally modified LDL in patients with ankylosing spondylitis and its correlation with disease activity. *Rev Bras Reum*. 2013;53:470–5.
399. Mello A, da Silva I, Abdalla D, Damasceno N. Electronegative low-

- density lipoprotein: origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis*. 2011;215:257–65.
400. Heuck CC, Daerr W, Haberbosch W, Horn D, Lüddecke E. The surface charge of apolipoproteins, phospholipid liposomes, and human very low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 1983;258:8317–22.
401. 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*. Elsevier Inc.; 2013;112:1025–32.
402. 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;16:R54.
403. Frank P, Pavlides S, Lisanti M. Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res*. 2009;335:41–7.
404. Yu B, Poi M, Ramagopal U, Ramakumar S, Berg O, Tsai M, et al. Structural basis of the anionic interface preference and kcat* activation of pancreatic phospholipase A2. *Biochemistry*. 2000;39:2312–23.
405. Saxena U, Goldberg I. Interaction of lipoprotein lipase with glycosaminoglycans and apolipoprotein C-II: effects of free-fatty-acids. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab*. 1990;1043:161–8.
406. Jørgensen A, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard B, Tybjaerg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med*. 2014;371:32–41.
407. The TG and HDL Working Group of the Exome Sequencing Project. National Heart Lung Institute and Blood. Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med*. 2014;371:22–31.
408. Mendoza S, Trenchevska O, King SM, Nelson RW, Nedelkov D, Krauss RM, et al. Changes in low-density lipoprotein size phenotypes associate with changes in apolipoprotein C-III glycoforms after dietary interventions. *J Clin Lipidol*. Elsevier Inc; 2017;11:224–233.e2.
409. Yassine HN, Trenchevska O, Ramrakhiani A, Parekh A, Koska J, Walker RW, et al. The association of human apolipoprotein C-III sialylation proteoforms with plasma triglycerides. *PLoS One*. 2015;10:1–14.
410. Holdsworth G, Stocks J, Dodson P, Galton DJ. An abnormal triglyceride-rich lipoprotein containing excess sialylated apolipoprotein C-III. *J Clin Invest*. 1982;69:932–9.
411. Moreira APB, Teixeira TFS, Alves RDM, Peluzio MCG, Costa NMB, Bressan J, et al. Effect of a high-fat meal containing conventional or high-oleic peanuts on post-prandial lipopolysaccharide concentrations in overweight/obese men. *J Hum Nutr Diet*. 2016;29:95–104.
412. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, et al. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:1219–23.
413. Gomes JMG, Costa J de A, Alfenas R de CG. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism*. Elsevier Inc.; 2017;68:133–44.

414. Vreugdenhil ACE, Snoek AMP, Van 't Veer C, Greve JWM, Buurman WA. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction. *J Clin Invest*. 2001;107:225–34.
415. Schwartz YS, Polyakov LM, Dushkin MI, Pivovarova EN. Modification and clearance of low density lipoproteins during the formation of endotoxin-lipoprotein complexes. *Bull Exp Biol Med*. 2008;145:430–2.
416. Kane J, Malloy M. Emerging roles of quantitative properties of lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25:406–7.
417. Asztalos B, Tani M, Schaefer E. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22:176–85.
418. Olofsson S, Borén J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med*. 2005;258:395–410.
419. Scheffer P, Teerlink T, Dekker J, Bos G, Nijpels G, Diamant M, et al. Increased plasma apolipoprotein C-III concentration independently predicts cardiovascular mortality: the Hoorn study. *Clin Chem*. 2008;54:1325–30.
420. Clavey V, Lestavel-Delattre S, Copin C, Bard J, Fruchart J. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *Arter Thromb Vasc Biol*. 1995;15:963–71.
421. Jong M, Hofker M, Havekes L. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arter Thromb Vasc Biol*. 1999;19:472–84.
422. Mahley R, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest*. 2007;117:94–8.
423. Xu M, Zhao J, Zhang Y, Ma X, Dai Q, Zhi H, et al. Apolipoprotein E Gene Variants and Risk of Coronary Heart Disease: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;3912175.
424. Eichner J, Dunn S, Perveen G, Thompson D, Stewart K, Stroehla B. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2002;155:487–95.
425. Ji Z, Fazio S, Mahley R. Variable heparan sulfate proteoglycan binding of apolipoprotein E variants modulate the expression of type III hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem*. 1994;269:13421–8.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

Anexos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

ANEXO I. ACR 1997

Criterios de clasificación del Lupus Eritematoso Sistémico:

Se necesitan ≥ 4 criterios de los 11 que se muestran a continuación [169]:

Criterio	Definición
1. Eritema Malar	Eritema fijo o plano sobre distinción malar. Tiende a evitar pliegue nasolabial.
2. Eritema discoideo	Parches eritematosos con descamación y obstrucción folicular. Pueden aparecer cicatrices atróficas en lesiones antiguas.
3. Fotosensibilidad	Eritema cutáneo como respuesta a la exposición solar.
4. Úlceras orales	Ulceración oral o nasofaríngea no dolorosa.
5. Artritis no erosiva	Artritis unilateral que afecta a 2 o más articulaciones periféricas. Caracterizada por un aumento de sensibilidad, derrame o inflamación.
6. Pleuritis o Pericarditis	Pleuritis: historia convincente de dolor pleurítico o roce identificado por el médico o evidencia de derrame pleural. Pericarditis: documentada por electrocardiograma o derrame pericárdico.
7. Alteraciones renales	Proteinuria persistente ($> 0,5$ g/día) Sedimento celular, hemoglobina, granular, tubular o mixto.
8. Alteraciones neurológicas	Convulsiones en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas. Psicosis en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas.
9. Alteraciones Hematológicas	Anemia hemolítica con reticulocitosis. Leucopenia ($< 4000/\text{mm}^3$) en ≥ 2 ocasiones. Lifopenia ($< 1500/\text{mm}^3$) en ≥ 2 ocasiones. Trombocitopenia ($< 100000/\text{mm}^3$) en ausencia de tratamientos farmacológicos.

	Anticuerpos contra ADN nativo con títulos anormales.
	Anticuerpos contra el antígeno nuclear SM
10. Alteraciones inmunológicas	Anticuerpos antifosfolípidos en: <ul style="list-style-type: none">▪ IgG o IgM anormal anticardiolipina.▪ Test positivo para anticoagulante lúpico.▪ Falso positivo para <i>Treponema pallidum</i>.
11. Anticuerpos antinucleares	Títulos anormales por inmunofluorescencia de anticuerpos antinucleares en ausencia de tratamientos farmacológicos.

ANEXO II. LIPOPROTEÍNAS

En la Tabla 27 se recogen las principales características básicas de las lipoproteínas:

Tabla 27. Características y composición de las diferentes lipoproteínas.

	QM	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densidad (g/ml)	< 0,950	< 1,006	1,006 – 1,019	1,019 – 1,063	1,063 – 1,210
Diámetro (nm)	75 – 1200	30 – 80	25 – 35	18 – 25	5 – 12
Masa (kDa)	400000	10000 – 80000	5000 – 10000	2300	175 – 360
% Proteína	1,5 – 2,5	5 – 10	15 – 20	20 – 25	40 – 55
% PL	7 – 9	15 – 20	22	15 – 20	20 – 35
% Colesterol	1 – 3	5 – 10	8	7 – 10	3 – 4
% Colesterol esterificado	3 – 5	10 – 15	30	35 – 40	12
% TG	84 – 89	50 – 65	22	7 – 10	3 – 4
Apos	AI, AII, B48, CI, CII, CIII, E	B100, CI, CII, CIII, E	B100, CI, CII, CIII, E	B100, CIII y E	AI, AII, CI, CII, CIII, D, E

QM: quilomicrones; VLDL: *very low-density lipoprotein*; IDL: *intermediate-density lipoprotein*; LDL: *low-density lipoprotein*; HDL: *high-density lipoprotein*; PL: fosfolípidos; TG: triglicéridos; kDa: kiloDaltons; Apos: apolipoproteínas.

Extraída y adaptada de D. Voet u J. G. Bioquímica, 3ª ed. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, 2006

Quilomicrones

Son lipoproteínas únicamente presentes en períodos post-absortivos. Son las más grandes (75 – 1200 nm) y tienen una densidad extremadamente baja (< 0,950 g/ml). Su masa atómica es de 400000 kDa. El 84 – 89 % de su contenido corresponde a TG, el 2 % a proteína, el 4 % a colesterol y el 7 – 9 % a PL. Las principales apolipoproteínas que se le asocian son Apo AI, AII, B48, CI, CII, CIII y E. La vida media en circulación es, aproximadamente, de 1 hora, a pesar de que se pueden llegar a encontrar en sangre hasta al cabo de 4 horas.

VLDL

Lipoproteínas de muy baja densidad (< 1,006 g/ml) que se sintetizan en el hígado a partir de ácidos grasos y colesterol. Presentan un diámetro entre 30 y 80 nm y una masa atómica entre 10000 y 80000 kDa. Su contenido es: 50 – 65 % de TG, 18 % de colesterol, 5 – 10 % de proteínas, y 15 – 20 % de PL. Sus principales apolipoproteínas son la Apo B100, CI, CII, CIII y E. Sufren una maduración en los vasos sanguíneos dando IDL. Su vida media es de 1 – 3 horas.

IDL

Las lipoproteínas de densidad intermedia (1,006 – 1,019 g/ml) son el intermediario del metabolismo de las VLDL para dar LDL. Su masa atómica es de 5000 – 10000 kDa y su diámetro es de 25 – 35 nm y contienen un 22 % de TG, un 20 % de proteínas, un 40 % de colesterol y un 22 % de PL. Sus principales apolipoproteínas son la Apo B100, CI, CII, CIII y la E.

LDL

Las lipoproteínas de baja densidad (1,019 – 1,063 g/ml) tienen un diámetro de 18 – 25 nm y una masa atómica de 2300 kDa. Están formadas por un 10 % de TG, un 20 – 25 % de proteínas, un 50 % de colesterol y un 15 – 20 % PL. Su principal apolipoproteína es la Apo B100. Transportan el 80 % del colesterol circulante y presentan una vida media de 2 – 3 días.

HDL

Las lipoproteínas de alta densidad (1,063 – 1,210 g/ml) tienen una masa atómica de 175 – 360 kDa y un diámetro de 5 – 12 nm. Se componen por un 3 – 4 % de TG, un 55 % de proteína, un 15 % de colesterol y un 20 – 35 % de PL. Sus principales apolipoproteínas son la Apo AI, AII, CI, CII, CIII, D y E, siendo la AI mayoritaria con un 70 %. Son las responsables del transporte reverso de colesterol. Son muy heterogéneas y comprenden una amplia variedad de subfracciones que difieren en diámetro, densidad y composición [417].

Apolipoproteínas

Las apolipoproteínas son los componentes estructurales de naturaleza proteica de las lipoproteínas. Se sintetizan en el hígado y juegan un papel fundamental en el metabolismo:

- ◆ Proporcionando estabilidad a las lipoproteínas al colocarse en la superficie para solubilizar sus lípidos.
- ◆ Actuando como cofactores o activadores de diversas enzimas, permitiendo que actúen sobre los lípidos que transportan las lipoproteínas.
- ◆ Actuando como ligando específico de receptores celulares, permitiendo que las lipoproteínas sean reconocidas por las células.

De las distintas apolipoproteínas que se conocen, nueve son las más estudiadas. Todas difieren en su contenido de aminoácidos (aas), peso molecular y distribución en las lipoproteínas (Tabla 28). Se pueden agrupar en cuatro familias en función de su estructura, función y carácter metabólico. Todas presentan una conformación molecular de alfa-hélice anfipática, con una porción de aas no polares (hidrofóbica) y otra porción de aas polares (hidrofilica). Ambas estructuras son esenciales para la integridad de la lipoproteína, ya que la parte hidrofóbica interacciona con los lípidos de la lipoproteína, y la hidrofílica permite interaccionar con el ambiente acuoso.

Tabla 28. Características de las apolipoproteínas.

Apolipoproteína	kDa	Aas	Lipoproteína
AI	28	243	
AII	17	77+77	QM y HDL
AIV	44	376	
B48	240	2152	QM
B100	513	4536	VLDL, IDL y LDL
CI	7	57	
CII	9	79	QM, VLDL, IDL,
CIII	9	79	LDL y HDL
E	34	299	

QM: quilomicrones; VLDL: *very low-density lipoprotein*; IDL: *intermediate-density lipoprotein*; LDL: *low-density lipoprotein*; HDL: *high-density lipoprotein*; Aas: aminoácidos; kDa: kiloDaltons.

Apolipoproteínas A

AI: es la más abundante en plasma (1,0 – 1,5 mg/dl) y mayormente está presente en la HDL. Participa en el transporte reverso de colesterol siendo ligando para la unión receptor-HDL. Se sintetiza en el hígado e intestino como un precursor proteico, el cual madura posteriormente hacia sus 243 aas.

AII: es el segundo componente mayoritario de las HDL. Es la única apolipoproteína en forma de dímero, formada por 2 cadenas polipeptídicas, de 77 aas cada una unidas por un enlace disulfuro. Su función no está bien definida, ya que su participación en el metabolismo de los lípidos es reducida.

AIV: Además de estar presente en los QM y HDL, circula libre en plasma, pero su concentración es mínima. La cadena polipeptídica de la que se compone está formada por 376 aas.

Apolipoproteínas B

Debido a su gran peso molecular, solamente hay una molécula de Apo B por partícula de lipoproteína, de ahí que la medida de Apo B circulante refleje el número de partículas de lipoproteínas que la contienen. Están presentes en los QM, VLDL, IDL y LDL y se distinguen dos formas:

B48: constituida por una cadena polipeptídica de 2152 aas formada por *splicing* alternativo del gen de la Apo B. Su similitud con la Apo B100 es del 48 %, el cual corresponde a su extremo N-terminal, de ahí su nombre. Se sintetiza en el intestino y es una molécula esencial en la formación de los QM, estando únicamente presente en ellos.

B100: está formada por una simple cadena polipeptídica de 4536 aas, por lo que es una de las proteínas más grandes presentes en el plasma. Se sintetiza en el hígado, de ahí que en humanos sólo esté presente en lipoproteínas de origen hepático como la VLDL, ya que es con la que se secreta [418], la IDL y la LDL.

Apolipoproteínas C

Esta familia agrupa proteínas de bajo peso molecular sintetizadas en mayor parte por el hígado y en menor proporción en el intestino. Sobre todo, están presentes en lipoproteínas ricas en TG como los QM, VLDL e IDL, así como en las HDL, ya que su función principal es mantener el equilibrio dinámico entre ellas.

CI: es la más pequeña de todas con 57 aas y su función parece ser la de activar a la LCAT.

CII: tiene 79 aas y juega un papel importante en el metabolismo de los TG al ser un cofactor esencial para la actividad de la LPL, la cual hidroliza los TG presentes en las lipoproteínas y es clave en el catabolismo de los QM y VLDL.

CIII: también se compone de 79 aas y en plasma se puede encontrar glicosilada. Presenta tres **glicofomas** diferentes dependiendo de las moléculas de **ácido siálico** que tenga unidas, **CIII-0**, **CIII-1** y **CIII-2**, con ninguna, una o dos moléculas, respectivamente. Su principal implicación en la ECV es la de promover HTG actuando como un regulador clave en el metabolismo de los TG [338], además de estar considerado como un predictor independiente del riesgo cardiovascular [352, 419]. Al igual que la Apo CII, también participa en la regulación de la LPL, pero en este caso inhibiéndola [12, 13]. Otra de sus funciones es la regulación de la captación de las lipoproteínas al interrumpir el reconocimiento de la Apo E con los receptores hepáticos [420, 421].

Apolipoproteína E

Está formada por 299 aas, se encuentra en las VLDL, LDL y HDL y es clave en el catabolismo de las TRL, ya que es reconocida por los receptores. Mayoritariamente se sintetiza en el hígado, pero entre un 20 – 40 % se puede sintetizar en tejidos extrahepáticos. En humanos existen tres isoformas, E₂, E₃ y E₄, que difieren en su afinidad por el LDLR y su unión a lípidos y lipoproteínas [422] y, por tanto, en su relación con la ECV [423]. Cada isoforma está codificada por un solo alelo y sus frecuencias pueden variar según la población de estudio [424]:

- ♦ **E₂** es la más rara y sirve como criterio absoluto de la hiperlipoproteinemia tipo III [425]. Su presencia es del 3 – 12 % y es la que menor afinidad tiene para el LDLR.
- ♦ **E₃** es la más común, con una presencia del 70 – 85 %.
- ♦ **E₄** presenta alta afinidad por el LDLR y se asocia con niveles mayores de LDLc y menores de TG. Esto es debido al aumento de LDLc intracelular, ya que al haber una alta captación debido a su gran afinidad por el LDLR, hace que los hepatocitos expresen menos LDLR y, por consiguiente, haya menor interacción LDLc-LDLR. El descenso de los TG se explica por la mayor preferencia de unión de E₄ por las partículas ricas en TG. Su frecuencia es del 12 – 18 %.

ANEXO III. ULTRACENTRIFUGACIÓN

En la Tabla 29 se muestra la composición de cada una de las **soluciones de densidad** utilizadas para la separación de lipoproteínas mediante **ultracentrifugación secuencial**. Todas deben tener un **pH** final de **7,4**.

Tabla 29. Composición de las soluciones de densidad.

Solución	Componentes
1,006	5,8 g NaCl 0,1 g EDTA-Na ₂ 0,3 ml NaOH 1M 0,0125 g Cloranfenicol H ₂ O destilada hasta un volumen final de 500 ml
1,019	400 ml solución 1,006 100 ml solución 1,071
1,063	400 ml solución 1,019 100 ml 1,239
1,071	382 ml solución 1,019 118 ml solución 1,239
1,239	164 g NaBr Solución 1,006 hasta un volumen final de 500 ml

NaCl: Cloruro sódico; EDTA-Na₂: etilendiamina tetraacético disódico; NaOH: Hidróxido sódico; NaBr: Bromuro sódico.

Una vez preparada la solución de densidad y ajustado su pH, hay que comprobar que realmente la densidad que presenta es la adecuada. Para ello, se utiliza el **refractómetro** para soluciones con densidad $\leq 1,071$ g/ml, y el **picnómetro** para soluciones $> 1,071$ g/ml.

En el caso del refractómetro, se pone una o dos gotas de la solución que se quiere comprobar sobre cristal, ponemos la

tapa, inclinamos hacia el haz de luz y miramos por el objetivo. Se ve una zona oscura y otra clara separada por una línea de color azul. El número de la izquierda es el **índice de refracción** de la solución (Figura 26, B), el cual debemos insertar en la siguiente ecuación para obtener la densidad:

$$\text{Densidad (g/ml)} = (\text{índice de refracción} \times 5,391) - 6,185$$

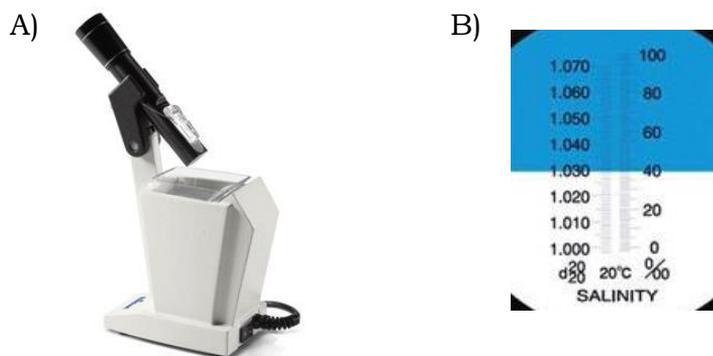


Figura 26. Visualización medida con el refractómetro.

A) Refractómetro. B) Los números de la izquierda representan el índice de refracción y los de la derecha el grado de salinidad. El valor a tener en cuenta es el que indica la línea azul que separa las zonas oscura y clara.

En el caso de la solución 1,239 se utiliza el picnómetro (Figura 27) Hay que pesar el picnómetro vacío, lleno de agua y lleno de la solución de densidad a comprobar con la precaución de que no haya burbujas en su interior. Se anotan todos los pesos y se insertan en la siguiente ecuación:

- ♦ Peso picnómetro vacío: A
- ♦ Peso picnómetro con agua: B
- ♦ Peso picnómetro con solución: C

$$\text{Densidad (g/ml)} = (C - A)/(B - A)$$



Figura 27. Picnómetro

Ultracentrifugación

En primer lugar, se descongelan las muestras a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, se pone el volumen de plasma en **tubos** de 6,5 ml (Beckman Coulter, EEUU). En todos los estudios se ha utilizado un volumen de **2 ml** de **muestra**, excepto en el estudio 1 en el que se han utilizado **500 µl**.

VLDL

La fracción lipoproteica de **VLDL** presenta una densidad entre **0,960 y 1,006 g/ml** por lo que se utiliza la solución de **1,006 g/ml**, ya que el plasma presenta una densidad similar. En los tubos donde ya está el plasma, se pone solución de densidad 1,006 g/ml **en capa u “overlay”**, hasta tener un **volumen final** en el tubo de **5 ml**, permitiendo que ésta se vaya deslizando por la pared del tubo de forma que quede en la parte inferior el plasma y en la superior la solución. Antes de cerrar los tubos, **se equilibran** dos a dos, en una balanza añadiendo más solución de densidad al que lo necesite. Se **ultracentrifugan** las muestras, en la ultracentrífuga Optima XPN-100 (Beckman Coulter, EEUU), a **37000 rpm**, durante **16 h** y a temperatura constante de **4 °C**. Una vez terminada la ultracentrifugación, se sacan los tubos con mucho cuidado para **no mezclar** la muestra, se abren los tapones y se extrae el **sobrenadante**, con una **pipeta Pasteur de vidrio**. En el caso de partir de 2 ml se extraen **2 ml** en un matraz aforado; en cambio, si se parte de 500 µl, se saca **1 ml** (el factor de dilución se tendrá en cuenta para futuros análisis). Posteriormente, se vierten en **ependorfs** y se guardan en la nevera a **4 °C** hasta proseguir con el experimento.

IDL

Para su extracción, se parte de los tubos de los cuales hemos aislado anteriormente las VLDL. Si se parte de 2 ml, se le **añade 1 ml** de solución de densidad **1,071 g/ml** y otro de **1,006 g/ml** para así obtener una densidad **final** en la muestra de **1,019 g/ml**. Si se parte de 500 µl, únicamente añadimos 1 ml

de solución de densidad 1,071 g/ml. En este caso, las soluciones ya no se vierten en capa. Se vuelven a **equilibrar** los tubos en la balanza, dos a dos, y a los que lo necesiten se le añade solución de densidad **1,006 g/ml**. Se cierran los tubos, **se homogeniza** todo y se **ultracentrifugan a 37000 rpm**, durante **20 h**, y a temperatura constante de **4 °C**. Transcurrido este tiempo se procede de igual manera que en el caso anterior.

LDL

Para la obtención de las lipoproteínas de baja densidad se procede de igual manera que en los casos anteriores, pero al presentar una densidad entre **1,019 y 1,063 g/ml** se le añade a los tubos **1 ml** de solución de densidad **1,239 g/ml** y 1 ml de **1,019 g/ml**, que es la utilizada para **equilibrar** los tubos, obteniendo así la densidad correspondiente. Al igual que en el caso anterior, si se parte de 500 µl, únicamente añadimos 1 ml de solución de densidad 1,239 g/ml. Se **ultracentrifuga a 37000 rpm, durante 20 h a 4 °C**.

HDL

El proceso de obtención de las HDL es parcialmente diferente, ya que presentan una densidad mayor, de entre **1,063 y 1,210 g/ml**. Para conseguir la solución de densidad adecuada, se disuelve en un vaso de precipitado **1,1 g de NaBr por tubo** en la cantidad necesaria de solución de densidad **1,063 g/ml** para obtener un volumen total final de 5 ml en cada tubo. Esta solución no se prepara al inicio del experimento igual que las demás, ya que a que precipita debido a su alta salinidad, modificándose así la densidad final de la solución. Otra diferencia es que en este caso se **ultracentrifugan** las muestras a **37000 rpm, a 4 °C**, pero durante **40 h**.

Importante: Limpiar bien la boca del tubo cada vez que se saque una lipoproteína y antes de echar la solución de densidad correspondiente. También, limpiar muy bien los tapones entre ciclos de ultracentrifugación para no contaminar una fracción lipoproteica con otra.

ANEXO IV. DIÁLISIS

La composición del PBS utilizado para dializar las fracciones lipoproteicas ya aisladas se muestra en la Tabla 30. La solución de PBS debe tener un pH final de 7,4.

Tabla 30. Composición del PBS.

Solución	Componentes
PBS	1,8 g $\text{Na}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,56 g $\text{H}_2\text{NaPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 9,4 g NaCl H_2O hasta llegar a 1 l

H_2O : Agua; $\text{Na}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate; H_2NaPO_4 : Di-sodium hydrogen phosphate; NaCl: Cloruro Sódico.

Diálisis

La diálisis se realiza tras la extracción de cada fracción lipoproteica. Es necesario el uso de **membranas de diálisis** semipermeables, las cuales se cortan a la longitud que se precise y, posteriormente, **se hidratan** para que **se activen** poniéndolas en un vaso de precipitado con agua hasta que ésta llegue al punto de ebullición. Mientras tanto, se preparan **300 ml de PBS por cada ml de muestra**. Una vez activadas las membranas, se secan para retirar el exceso de agua, se cierra un extremo con una pinza, se rellena la membrana con la muestra de fracción lipoproteica correspondiente y se cierra el otro extremo con otra pinza, dejando una pequeña bolsa de aire para facilitar la diálisis. Una vez preparadas las muestras para dializar, se introducen en el matraz con PBS y se deja en la cámara fría, a **4 °C**, **agitando** durante **toda la noche**. En el caso de las **HDL**, serán necesarios **400 ml PBS/ml muestra**.

Pasada la noche, se sacan los matraces de la cámara fría y se procede a la **extracción** de la **muestra dializada**. Dicha extracción se realiza sacando cada una de las membranas del

matraz con unas pinzas, secándolas muy bien para que cuando se abra la pinza de uno de los extremos no se introduzca líquido y cogiendo con una pipeta Pasteur la muestra, la cual se almacena en **ependorfs**, a **4 °C**, hasta la realización de la siguiente fase del experimento.

Importante: Tanto al poner la muestra en el interior de la membrana de diálisis como al sacarla, se comprobará el volumen total que hay, para así conocer en cada momento el factor de dilución a aplicar en los cálculos que se realicen posteriormente.

ANEXO V. CARGA ELÉCTRICA

Como se ha explicado en el capítulo V de la metodología la carga eléctrica se determina en las fracciones lipoproteicas obtenidas por ultracentrifugación y una vez ya dializadas.

Antes de comenzar, **se enciende** el **Zetasizer Nano-ZS** (Malvern, Reino Unido) y se debe **esperar 30 minutos** para comenzar a utilizarlo. Se abre el software y se crea un **SOP** (*Standard Operating Procedure*) que se utilizará en todas las medidas, para así asegurarnos de que se realizan de igual manera y sean comparables (Tabla 31).

Tabla 31. SOP para la determinación de la carga eléctrica.

CONFIGURACIÓN		Filtro de banda estrecha	No	
		Alta temperatura	No	
MUESTRA	Material	Proteína	IR	1,450
			Abs	0,001
	Dispersante	Agua	T ^a	25 °C
			Viscosidad	0,8872
			IR	1,330
			Cte dieléctrica	78,5
	Opciones generales	Modelo	Smoluchowski	$F(ka) = 1,5$
		✓ Usar la viscosidad del dispersante como viscosidad de la muestra		
	T^a	25 °C	Tiempo de equilibrio	15 s
	Cubeta	DTS1070		
MEDIDAS	Duración	Automática	10 – 100 runs	
	Nº medidas	3		
	Selección automática de atenuador	11		
	Selección automática de voltaje	Sí		
PROCESADO DE DATOS		Modelo	<i>General purpose</i>	

IR: Índice de refracción; Abs: Absorbancia.

En el momento de realizar la medida, el dispersante que ponemos es agua, pero una vez se hayan realizado todas las medidas y antes de analizar todos los datos, el dispersante se cambia gracias a la función de edición de resultados del software. En cada muestra se pone la composición del dispersante teniendo en cuenta las sales de las soluciones de densidad y los factores de dilución a lo largo de todo el proceso.

Una vez transcurrido el tiempo de espera de puesta a punto del Zetasizer, se **llena** la **cubeta** cogiendo la **muestra**, con la dilución correspondiente, con ayuda de una **jeringuilla** comprobando que **no** quedan **burbujas** en todo el capilar. Se ponen los **taponés**, se introduce de forma correcta en el **Zetasizer**, se pone la identificación de la muestra en el SOP y se mide. Conforme va transcurriendo la medida, se puede ir comprobando que la **calidad** de ésta sea buena mediante diferentes parámetros y gráficas que muestra el software (Figura 28).

En el caso de utilizar una **cubeta nueva** (sin uso previo), ésta se debe **activar**. Para ello, primero se **limpia con etanol** y posteriormente con **abundante agua**, se llena de una solución **patrón (estándar)** y se mide. Los valores de dicha solución deben ser: potencial Z de **$-42 \pm 4,2$ mV** y conductividad entre **0,23 – 0,40 mS/cm**. Si los valores obtenidos de potencial Z son los que el estándar indica, se puede proceder a las medidas de las muestras. Sin embargo, si el potencial Z no es el adecuado, se debe volver a pasar etanol, seguido de abundante agua y repetir la medida con el estándar hasta obtener el adecuado.

Una vez finalizada la medida, **se saca la cubeta y se limpia**. Para ello, se quitan los taponés, se pasa **agua destilada** por el interior de la cubeta, se **seca** con aire a presión y se repite el proceso con todas las muestras.

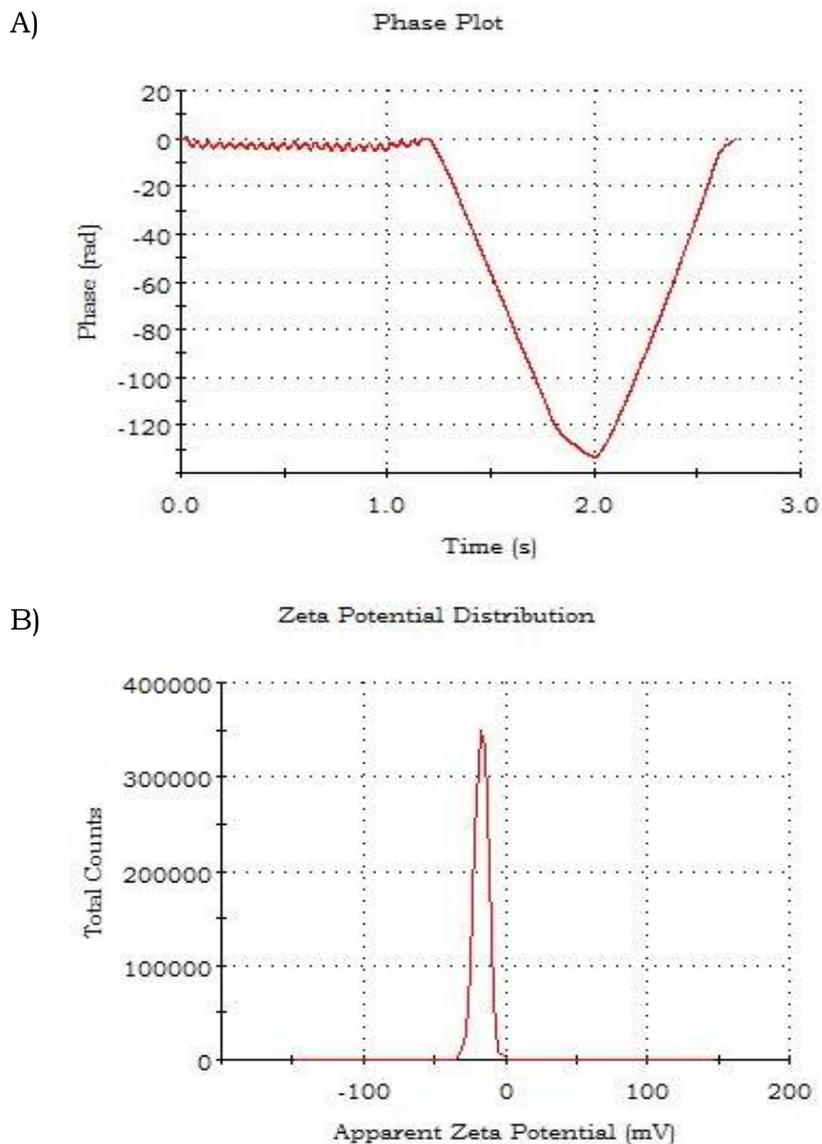


Figura 28. Gráficos de una medida de buena calidad.

A) La parte izquierda de la gráfica debe mostrar esa apariencia de estabilidad y fluctuaciones constantes iguales. En la parte derecha se aprecia una fluctuación ampliada de las anteriores y se observa cómo es totalmente simétrica. En caso de no ser una medida de buena calidad, no se observaría un patrón de repetición tan estable. B) En este caso es un pico perfecto de distribución de una muestra con una distribución monomodal, en la cual solamente hay presente una población diferenciada; en el caso de haber más, aparecerían más picos.

ANEXO VI. CFCA (Cuestionario de Frecuencia de Consumo Alimentario)

ALIMENTOS	¿CUÁNTAS VECES COME?	
	A LA SEMANA	AL MES
Leche		
Yogur		
Chocolate: tableta, bombones, Kit Kat...		
Cereales inflados de desayuno		
Galletas tipo "María"		
Galletas con chocolate, crema...		
Magdalenas, bizcocho...		
Ensaimada, donut, croissant...		
Ensalada: lechuga, tomate, escarola...		
Judías verdes, acelgas o espinacas		
Verduras de guarnición: berenjenas...		
Patatas al horno, fritas o hervidas		
Legumbres: lentejas, garbanzos...		
Arroz blanco, paella		
Pasta: fideos, macarrones, espaguetis		
Sopas y cremas		
Huevos		
Pollo o pavo		
Ternera, cerdo, cordero		
Carne picada, longaniza, hamburguesa		
Pescado blanco: merluza, mero...		
Pescado azul: sardinas, atún, salmón...		
Marisco: mejillones, gambas, calamares		
Croquetas, empanadillas, pizza		
Pan (en bocadillo y en comidas)		

ALIMENTOS	¿CUÁNTAS VECES COME?	
	A LA SEMANA	AL MES
Jamón serrano, cocido, embutidos		
Queso fresco, blanco o bajo en calorías		
Otros quesos; curados, cremosos...		
Frutas cítricas: naranja, mandarina...		
Otras frutas: manzana, pera, plátano...		
Frutas en conserva (en almíbar...)		
Zumos de fruta natural		
Zumos de frutas comercial		
Frutos secos: cacahuetes, avellanas...		
Postres lácteos: natillas, flan, requesón		
Pasteles de crema o chocolate		
Bolsas de aperitivos (chips, fritos...)		
Golosinas: gominolas, caramelos...		
Helados		
Bebidas azucaradas: coca-cola, fanta...		
Bebidas baja en calorías (light)		
Vino, sangría		
Cerveza		
Cerveza sin alcohol		
Bebidas destiladas: whisky, ginebra...		

ANEXO VII. TEST ESTRÉS ACADÉMICO

Los siguientes puntos describen actividades o situaciones que se presentan en la vida académica y que pueden ser estresantes para los estudiantes; es decir, provocan tensión o malestar en el individuo. En cada punto, señala con una cruz el número (del 1 al 9) que mejor indique en qué medida es estresante para ti. A continuación marca con un círculo si te has encontrado o no en esta situación durante las últimas 4 semanas.

	Nada estresante				Muy estresante				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Preparar un examen inmediato Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
2. Efectuar un examen oral Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
3. Efectuar un examen escrito Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. Esperar los resultados de un examen Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. Suspender un examen Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6. Ser preguntado en clase Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7. Preparar un trabajo individualmente Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

	Nada estresante					Muy estresante			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
8. Preparar un trabajo en grupo Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
9. Preguntar una duda a un profesor en clase (en público) Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
10. Preguntar una duda a un profesor fuera de clase (en privado) Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
11. Hablar con un profesor sobre tus problemas académicos (en privado, desacuerdos sobre resultados de exámenes, demanda de orientación) Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
12. Participar en un seminario (discusión de temas en grupos reducidos) Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
13. Efectuar actividades de prácticas Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
14. Exponer un tema en clase Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

	Nada estresante				Muy estresante				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
15. Discutir problemas académicos con compañeros (en asambleas o reuniones) Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
16. Entrar o salir del aula cuando la clase ha empezado Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
17. Excesiva cantidad de materia para estudio Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
18. Falta de tiempo para estudiar Últimas 4 semanas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
					SI	<input type="radio"/>	NO	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

ANEXO VIII. STAI (*State-Trait Anxiety Inventory*)

A continuación, encontrará unas frases corrientemente para describirse uno a sí mismo. Lea cada frase y señale la puntuación (0 a 3) que indique mejor cómo se **SIENTE USTED AHORA MISMO**, en este momento. No hay respuestas buenas ni malas. No emplee demasiado tiempo en cada frase y conteste señalando la respuesta que mejor describa su situación presente.

	Nada	Algo	Bastante	Mucho
	0	1	2	3
1. Me siento calmado.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Me siento seguro.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Estoy tenso.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Estoy contrariado.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Me siento cómodo (estoy a gusto).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Me siento alterado.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Estoy preocupado por posibles desgracias futuras...	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Me siento descansado.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Me siento angustiado.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Me siento cómodo.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Tengo confianza en mí mismo.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. Me siento nervioso.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. Estoy desasosegado.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14. Me siento muy “atado” (oprimido).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. Estoy relajado.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
16. Me siento satisfecho.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
17. Estoy preocupado.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
18. Me siento aturdido y sobreexcitado.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
19. Me siento alegre.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
20. En este momento me siento bien.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

A continuación, encontrará unas frases corrientemente para describirse uno a sí mismo. Lea cada frase y señale la puntuación (0 a 3) que indique mejor cómo se **SIENTE USTED EN GENERAL**, en la mayoría de ocasiones. No hay respuestas buenas ni malas. No emplee demasiado tiempo en cada frase y conteste señalando la respuesta que mejor describa cómo se siente usted generalmente.

	Casi nunca	A veces	A menudo	Casi siempre
	0	1	2	3
21. Me siento bien.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
22. Me canso rápidamente.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
23. Siento ganas de llorar.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
24. Me gustaría ser tan feliz como otros.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
25. Pierdo oportunidades por no decidirme pronto.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
26. Me siento descansado.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
27. Soy una persona tranquila, serena y sosegada.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
28. Veo que las dificultades se amontonan y no puedo con ellas.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
29. Me preocupo demasiado por cosas sin importancia.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
30. Soy feliz.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
31. Suelo tomar las cosas demasiado seriamente.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
32. Me falta confianza en mí mismo.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
33. Me siento seguro.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
34. Evito enfrentarme a las crisis o dificultades.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
35. Me siento triste (melancólico).....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
36. Estoy satisfecho.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
37. Me rondan y molestan pensamientos sin importancia.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
38. Me afectan tanto los desengaños que no puedo olvidarlos.....	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- | | | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 39. Soy una persona estable.... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 40. Cuando pienso sobre asuntos y preocupaciones actuales, me pongo tenso y agitado..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.

Marina Rodríguez García

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
ESTUDIO DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS PARA UNA MEJOR PREDICCIÓN
DEL RIESGO RESIDUAL.
Marina Rodríguez García



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI