

Tabla 22. Correlaciones entre el LPS y las glicoformas 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 glicoformas de Apo CIII. Además, en este caso ocurre lo mismo que con el LPS total, y es que las glicoformas 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 glicoforma 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;119:1198-208.
 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, Wierchowicki 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, Llanals 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, McEernan 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. Morkkala 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, Tybjærg-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 hidrofilica 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:

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

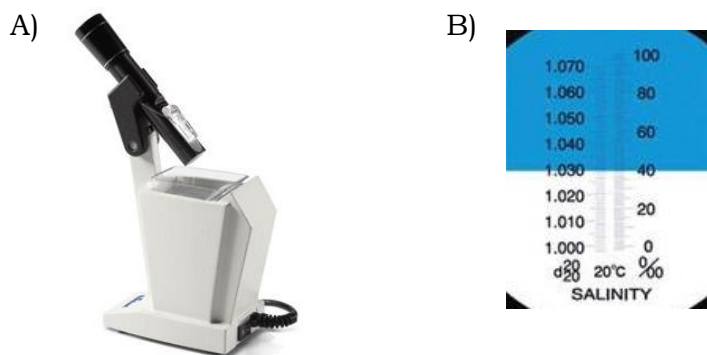


Figura 26. Visualización medida con el refractómetro.

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 ₂ O hasta llegar a 1 l

H₂O: 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.

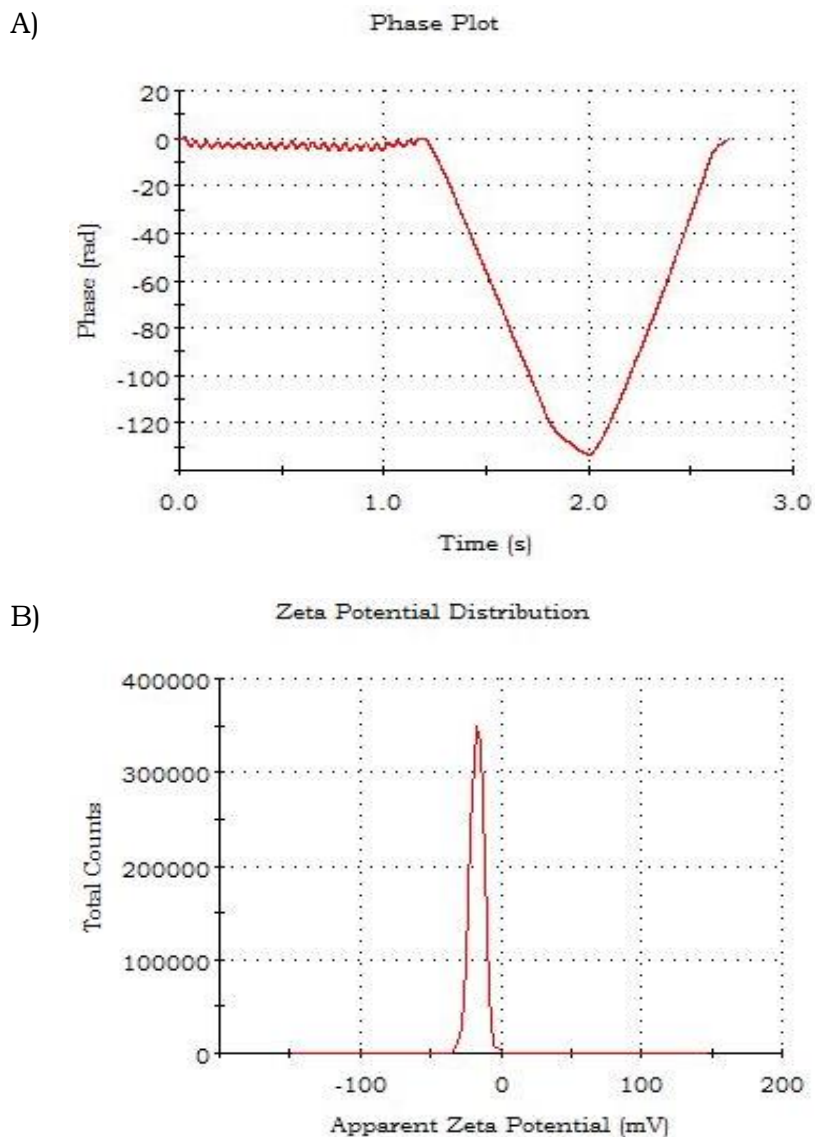


Figura 28. Gráficos de una medida de buena calidad.

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 confortable.....	<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