



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA (UAB)
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**CONTRIBUCIÓN DEL COLESTEROL EN LAS PARTÍCULAS
sdLDL Y EL PERFIL LIPÍDICO AVANZADO AL RIESGO
CARDIOVASCULAR RESIDUAL Y SU RESPUESTA A LA
DIETA MEDITERRÁNEA**

TESIS DOCTORAL

Bárbara Fernández Cidón

Julio 2021

Dirigida por los doctores Beatriz Candás Estébanez* y Xavier Pintó Sala**

*Jefa del servicio del Laboratorio Clínico
Hospital de Barcelona Inst. Sanitarias SCIAS

**Jefe de sección de la Unidad funcional de Lipidología y Riesgo
Cardiovascular del servicio de Medicina Interna
Hospital Universitario de Bellvitge

DIRECTORA

BEATRIZ CANDÁS ESTÉBANEZ

DIRECTOR

XAVIER PINTÓ SALA

TUTORA

FRANCESCA CANALIES REVERTER

AGRADECIMIENTOS	7
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	13
RESUMEN EN CASTELLANO	13
RESUM EN CATALÀ	17
ABSTRACT IN ENGLISH	21
I. INTRODUCCIÓN	23
1. RIESGO CARDIOVASCULAR	23
1.1 Factores de riesgo cardiovascular clásicos	24
1.1.1 Factores de riesgo cardiovascular no modificables	24
1.1.2 Factores de riesgo cardiovascular modificables	25
1.1.2.1 Factores de riesgo cardiovascular modificables de origen lipídico	25
1.1.2.2 Factores de riesgo cardiovascular modificables de origen no lipídico	28
1.2 Factores de riesgo cardiovascular emergentes	30
1.2.1 Factores de riesgo cardiovascular emergentes de origen lipídico	31
1.2.2 Factores de riesgo cardiovascular emergentes de origen no lipídico.....	33
1.3 Cálculo del riesgo cardiovascular	34
2. DISLIPEMIAS	37
2.1 Clasificación en función del fenotipo	37
2.2 Clasificación en función de su etiología	37
2.2.1 Dislipemias primarias	38
2.2.2 Dislipemias secundarias	39
2.2 Impacto de las dislipemias en la aterosclerosis	40
2.3 Aterosclerosis y enfermedad cardiovascular	42
3. RIESGO CARDIOVASCULAR RESIDUAL	44
3.1 Dislipemia Aterogénica y Síndrome Metabólico	45
3.1.1 Etiología de la Dislipemia Aterogénica	47
3.1.2 Dislipemia Aterogénica y Riesgo Cardiovascular Residual	49

3.2 Perfil lipídico en la Dislipemia Aterogénica	50
3.2.1 Perfil lipídico clásico	50
- Métodos de laboratorio I	51
3.2.2 Perfil lipídico avanzado	52
- Métodos de laboratorio II	54
4. ATROSCLOEROSIS Y EVENTOS ISQUÉMICOS PREMATUROS	57
4.1 Actualización	57
4.2 Alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas	58
4.3 Riesgo cardiovascular residual e isquemia prematura	59
5. ALIMENTACIÓN Y ESTILO DE VIDA EN LA REDUCCIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR	
5.1 Actualización	59
5.2 Dieta mediterránea y reducción del riesgo cardiovascular	59
5.2.1 PREDIMED	65
5.2.2 PREDIMED PLUS	66
II. HIPÓTESIS	69
III. OBJETIVOS	71
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
1. Primer estudio	73
1.1 Cita del estudio publicado	73
1.2 Presentación	73
1.3 Resultados y discusión	74
1.4 Conclusiones	78
1.5 Publicación completa	78
2. Segundo estudio	85
2.1 Cita del estudio publicado	85
2.2 Presentación	85
2.3 Resultados y discusión	85
2.4 Conclusiones	89

2.5 Publicación completa	89
3. Tercer estudio	99
3.1 Cita del estudio publicado	99
3.2 Presentación	99
3.3 Resultados y discusión	100
3.4 Conclusiones	103
3.5 Publicación completa	103
4. Cuarto estudio	115
4.1 Introducción	115
4.2 Objetivos	116
4.3 Material y métodos	116
4.3.1 Población	116
4.3.2 Determinación C-sdLDL	116
4.3.3 Perfil lipídico avanzado mediante Resonancia Magnética Nuclear	117
4.3.4 Análisis estadístico	117
4.3 Resultados y discusión	118
4.5 Conclusiones	123
V. CONCLUSIONES	125
VI. BIBLIOGRAFIA.....	127

A mi hija que está en camino:

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo de varias personas a las que quiero mostrar mi agradecimiento.

En primer lugar, agradecer a los directores de esta tesis doctoral. A la Dra. Beatriz Candas Estébanez por darme la oportunidad de realizar este trabajo y guiarme en mis inicios en el mundo de la investigación y al Dr. Xavier Pintó Sala por compartir conmigo sus años de experiencia y supervisar atentamente mi trabajo. Agradecer a ambos su dedicación y buenas ideas que han permitido culminar esta tesis doctoral con gran éxito.

Agradecer a mis profesoras cuando empecé la residencia y ahora compañeras de trabajo sus esfuerzos para formarme y convertirme en facultativa especialista. A mis residentes mayores Ariadna, Chema, Cristina y Claudia, por compartir conmigo tantos momentos de duda y ser siempre el aliento que necesitaba para continuar adelante.

A mis padres sin los que no hubiera alcanzado ninguno de mis logros. Gracias por proporcionarme una educación y apoyarme en todas mis decisiones. Por confiar en mí y darme la libertad para equivocarme y aprender de mis errores, sin ellos no sería la persona en la que me he convertido.

A mis amigos y familia en Barcelona Joan y Tania por acompañarme y compartir conmigo mis mejores y peores momentos. Por darme ánimos e impulso para poder finalizar esta tesis doctoral sin perder la sonrisa.

Por último, a mi pareja Martiño por ser mi sostén durante este duro trayecto, por entenderme en todo cuando ni yo misma me entendía. Gracias por tu apoyo y por creer en mí cuando a mí me faltaban las fuerzas.

ECV: Enfermedades Cardiovasculares.

RCV: Riesgo Cardiovascular.

FRCV: Factores de Riesgo Cardiovascular.

RCVR: Riesgo Cardiovascular Residual.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

MedDiet: Dieta Mediterránea.

erMedDiet+PA: Dieta Mediterránea hipocalórica, actividad física y terapia conductual.

SCORE: Systematic Coronary Risk Estimation.

Apo B: Apolipoproteína B.

Apo A: Apolipoproteína A.

Apo E: Apolipoproteína E.

Apo CIII: Apolipoproteína CIII.

Lp (a): Lipoproteína (a).

HTA: Hipertensión arterial.

PA: Presión Arterial.

PS: Presión Arterial Sistólica.

PD: Presión Arterial Diastólica.

hsPCR: Proteína C Reactiva de elevada sensibilidad.

SM: Síndrome Metabólico.

RI: Resistencia a la Insulina.

IMC: Índice de Masa Corporal.

Tg: Triglicéridos.

C-No HDL: Colesterol-no HDL.

C-IDL: Colesterol en las lipoproteínas de densidad intermedia.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

C-VLDL: Colesterol en las VLDL.

Tg-VLDL: Triglicéridos en las VLDL.

VLDL-P: Número de partículas VLDL.

IVLDL-P: Número de partículas VLDL grandes.

mVLDL-P: Número de partículas VLDL medias.

sVLDL-P: Número de partículas VLDL pequeñas.

VLDL-Z: Diámetro de las VLDL.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

C-LDL: Colesterol en las LDL

Tg-LDL: Triglicéridos Low Density Lipoprotein.

sdLDL: Lipoproteínas muy pequeñas y densas.

C-sdLDL: Colesterol en las sdLDL.

LDL-P: Número de partículas LDL.

ILDL-P: Número de partículas LDL grandes.

mLDL-P: Número de partículas LDL medianas.

sLDL-P: Número de partículas sm LDL pequeñas.

LDL-Z: Diámetro de las LDL.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

C-HDL: Colesterol en las HDL.

Tg-HDL: Triglicéridos en las HDL.

HDL-P: Número de partículas HDL.

IHDL-P: Número de partículas HDL grandes.

mHDL-P: Número de partículas HDL medianas.

sHDL-P: Número de partículas HDL pequeñas.

HDL-Z: Diámetro de las HDL.

DM: Diabetes Mellitus.

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2.

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1.

IAM: Infarto Agudo de Miocardio.

ACV: Accidente Vascular Cerebral.

DA: Dislipemia Aterogénica.

DASH: Dietary Approaches to Stop Hypertension.

HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-3metil-glutaril-CoenzimaA reductasa.

OxLDL: LDL oxidadas.

LPL: Lipoprotein Lipasa

AGLs: Ácidos Grasos Libres.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

IL-6: Interleucina 6.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1.

VitE: Vitamina E.

ALT: Alanina Aminotransferasa.

CEPT: Proteína Transportadora de Esteres de Colesterol.

NCEP: National Cholesterol Education Program.

PESA: Progression of Early Subclinical Atherosclerosis.

MESA: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis.

PREDIMED: Prevención con Dieta Mediterránea.

AGS: Ácidos Grasos Saturados.

AGM: Ácidos Grasos Monosaturados.

r_{xy} : coeficientes de correlación de Pearson.

HL: Índice de Hosmer-LESmesnow.

OR: Odds Ratio.

AUC: Área Bajo la Curva.

RESUMEN EN CASTELLANO

Las estrategias para la prevención de la enfermedad cardiovascular (ECV) basadas en la detección de factores de riesgo cardiovascular (FRCV) y en el tratamiento centrado en la disminución de la concentración de C-LDL han conseguido disminuir la morbimortalidad asociada a la ECV. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, siguen teniendo lugar eventos isquémicos. Una posibilidad para explicar esto, es que exista un riesgo cardiovascular residual (RCVR). Este riesgo, está asociado a la dislipemia aterogénica (DA) y a alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas que afectan a su concentración y composición. Actualmente, su identificación se basa en la detección de fenotipos caracterizados por obesidad, resistencia a la insulina y concentraciones aumentadas de Tg y sdLDL y disminuidas de C-HDL. Sin embargo, a pesar de estas herramientas para identificarlo, aún existen pacientes con un riesgo cardiovascular (RCV) infraestimado. Teniendo en cuenta las publicaciones recientes, es posible que el estudio del perfil lipídico avanzado pueda justificar este RCVR.

Por otro lado, la prevención de eventos isquémicos mediante la MedDiet y su efecto en el perfil lipídico tradicional y en el peso está comprobada. Teniendo en cuenta esto, sería interesante averiguar el impacto de la MedDiet en el perfil lipídico avanzado, y de esta forma averiguar si es posible disminuir el RCVR mediante esta dieta.

Por ello, en esta tesis se plantean las siguientes hipótesis:

- a) La determinación del perfil lipídico avanzado podría ser de utilidad para explicar el RCVR en pacientes con un perfil lipídico clásico normal;
- b) La MedDiet podría tener un impacto importante en el perfil lipídico avanzado y contribuir a mejorarlo.

La subfracción más aterogénica de las LDL son las sdLDL ya que se infiltran más fácilmente en el endotelio vascular debido a su pequeño tamaño y elevada densidad. En diversas publicaciones ha quedado patente su relación con el grosor de la íntima media además de ser un mejor predictor de eventos isquémicos que el C-LDL. A pesar de la evidencia científica, no se ha incorporado su determinación a los laboratorios clínicos debido a la falta de estandarización de un procedimiento de medida practicable y a la ausencia de valores de referencia adecuados. Dentro del perfil lipídico avanzado, además de la concentración de C-sdLDL también se han podido caracterizar las diferentes subclases de lipoproteínas y sus subfracciones mediante las

nuevas técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Esto ha permitido obtener información acerca de su composición, concentración y número.

El objetivo de la primera parte de esta tesis fue estandarizar un método de precipitación para el aislamiento de las partículas sdLDL y medir su concentración de colesterol. Una vez realizado este primer paso, se calcularon los valores de referencia para C-sdLDL en una población sana. Esta primera parte de la tesis finalizó con la publicación del primer artículo.

En una segunda etapa, se quiso estudiar la relación entre el colesterol de las partículas sdLDL y las características de las lipoproteínas valoradas mediante RMN. De esta forma, se demostró la relación que había entre el diámetro de las LDL y la concentración de colesterol de las sdLDL. Ambas propiedades estaban relacionadas inversamente, y de forma significativa, de tal modo que al disminuir el diámetro de las partículas aumentaba la concentración del colesterol en las sdLDL.

En tercer lugar, se ha estudiado el papel del perfil lipídico avanzado en la valoración del RCVR. Para ello, se ha analizado el perfil lipídico avanzado en dos cohortes de pacientes. Una con enfermedad cardiovascular prematura apareada en edad y sexo con una población de referencia. Los resultados de la tercera parte de esta tesis doctoral han demostrado la contribución de la subfracción más voluminosa de las LDL (ILDL-P) y de los Tg contenidos en las HDL (Tg-HDL) al riesgo de sufrir un evento isquémico prematuro. Las ILDL-P tienen un efecto protector mientras que el aumento de Tg-HDL incrementa el riesgo de sufrir un evento isquémico prematuro. Este efecto podría deberse a que al aumentar el contenido de Tg de las partículas HDL se reduce su efecto antiaterogénico (protector) al formarse partículas HDL más pequeñas y lábiles.

Finalmente, para concluir esta tesis doctoral se ha estudiado el efecto del estilo de vida sobre el perfil lipídico avanzado con el objetivo de valorar si podría ayudar a disminuir el RCVR que existe más allá del C-LDL. Considerando que los cambios de estilo de vida son la primera línea de tratamiento de los FRCV, es de vital importancia determinar la influencia de unos hábitos de vida saludables y de la dieta en el perfil lipídico avanzado. El estudio PREDIMED ya demostró los efectos beneficiosos de la MedDiet en la morbimortalidad cardiovascular. Actualmente, el estudio PREDIMED-PLUS está evaluando el efecto de la MedDiet con restricción calórica, actividad física y terapia conductual (erMedDiet+PA) frente a la MedDiet y la asistencia sanitaria tradicional. Los resultados obtenidos en el cuarto estudio de esta tesis indican el efecto beneficioso de la MedDiet en el perfil lipídico avanzado, sobre todo en la composición de las partículas LDL disminuyendo la concentración de C-sdLDL. También se ha determinado que el

programa erMedDiet+PA mejora la composición de las lipoproteínas LDL y de las VLDL frente a la MedDiet tradicional.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, se pone de manifiesto el valor añadido del perfil lipídico avanzado en el estudio del RCVR que no se puede abordar mediante un perfil lipídico clásico.

RESUM EN CATALÀ

Les estratègies per a la prevenció de les malalties cardiovasculars basades en la detecció de factors de risc cardiovascular (FRCV) i en el tractament centrat en la disminució de la concentració de C-LDL han aconseguit disminuir la morbimortalitat associada a aquestes malalties. No obstant això, tot i els esforços, segueixen tenint lloc esdeveniments isquèmics. Una possibilitat per explicar això, és que hi hagi un risc cardiovascular residual (RCVR). Aquest risc, està associat a la dislipèmia aterogènica (DA) i a alteracions en el metabolisme de les lipoproteïnes que afecten la seva concentració i composició. Actualment, la seva identificació es basa en la detecció de fenotips caracteritzats per obesitat, resistència a la insulina i concentracions augmentades de Tg i sdLDL i disminuïdes de C-HDL. No obstant això, malgrat aquestes eines per identificar-lo, encara hi ha pacients amb un RCV infraestimat. Tenint en compte les publicacions recents, és possible que l'estudi del perfil lipídic avançat pugui justificar aquest RCVR.

D'altra banda, la prevenció d'esdeveniments isquèmics mitjançant la MedDiet i el seu efecte en el perfil lipídic tradicional i en el pes està comprovada. Tenint en compte això, seria interessant esbrinar l'impacte de la MedDiet en el perfil lipídic avançat, i d'aquesta manera esbrinar també si és possible disminuir el RCVR mitjançant aquesta dieta.

Per això, en aquesta tesi es plantegen les següents hipòtesis:

- a) La determinació del perfil lipídic avançat podria ser d'utilitat per explicar el RCVR en pacients amb un perfil lipídic clàssic normal;
- b) La MedDiet podria tenir un impacte important en el perfil lipídic avançat i contribuir a millorar-lo

La subfracció més aterogènica de les LDL són les sdLDL ja que s'infiltra més fàcilment en l'endoteli vascular causa de la seva petita mida i elevada densitat. En diverses publicacions s'ha demostrat la seva relació amb el gruix de la íntima mitjana, a més a més són un millor predictor d'esdeveniments isquèmics que el C-LDL. Tot i l'evidència científica, no s'ha incorporat la seva determinació als laboratoris clínics causa de la falta d'estandardització d'un procediment de mesura practicable i de l'absència de valors de referència adequats. Dins el perfil lipídic avançat, a més de la concentració de C-sdLDL també s'han pogut caracteritzar les diferents subclasses de lipoproteïnes i les seves subfraccions mitjançant les noves tècniques de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN). Això ha permès obtenir informació sobre la seva composició, concentració i nombre.

A la primera part d'aquesta tesi l'objectiu va ser estandarditzar un mètode de precipitació per a l'aïllament de les partícules sdLDL i mesurar la seva concentració de colesterol. Un cop realitzat aquest primer pas, es van calcular els valors de referència per C-sdLDL en una població sana. Aquesta primera part de la tesi va finalitzar amb la publicació del primer article.

Posteriorment, es va voler estudiar la relació entre el colesterol d'aquestes partícules i les característiques de les lipoproteïnes establertes mitjançant RMN. D'aquesta manera, es va demostrar la relació que hi havia entre el diàmetre de les LDL establert per RMN i la concentració de colesterol a les sdLDL. La relació entre ambdues propietats resultar ser que estaven relacionades inversament, i de forma significativa, de tal manera que a l'disminuir el diàmetre de les partícules augmenta la concentració de colesterol a les sdLDL.

En tercer lloc, en aquesta tesi s'ha estudiat la influència del perfil lipídic avançat sobre el RCVR. Per a això, s'ha analitzat el perfil lipídic avançat en dues cohorts de pacients. Una amb malaltia cardiovascular prematura aparellada amb una població de referència. Els resultats de la tercera part d'aquesta tesi doctoral han demostrat la contribució de la subfracció més voluminosa de les LDL (LDL-P) i dels Tg continguts en les HDL (Tg-HDL) a el risc de patir un esdeveniment isquèmic prematur. Les LDL-P tenen un efecte protector mentre que l'augment de Tg-HDL incrementa el risc de patir un esdeveniment isquèmic prematur. Aquest efecte podria ser degut al fet que a l'augmentar el contingut de Tg de les partícules HDL es redueix el seu efecte antiaterogènic (protector) a causa de que les HDL són més petites i làbils.

Finalment, per tancar aquesta tesi doctoral s'ha estudiat l'efecte de l'estil de vida sobre el perfil lipídic avançat amb l'objectiu d'estudiar si podria ajudar a millorar el RCVR un cop el C-LDL ja està controlat. Considerant que els canvis d'estil de vida són la primera línia de tractament de les ECV, és de vital importància determinar la influència de l'adopció d'hàbits de vida saludables i diferents tipus de dieta en el perfil lipídic avançat. L'estudi PREDIMED ja va demostrar els efectes beneficiosos de la MedDiet en la morbimortalitat associada a la ECV. Mentrestant l'estudi PREDIMED-PLUS està avaluant l'efecte de la MedDiet hipocalòrica, activitat física i teràpia conductual (erMedDiet + PA) enfront de la MedDiet i l'assistència sanitària tradicional. Els resultats obtinguts en el quart estudi d'aquesta tesi indiquen l'efecte beneficiós de la MedDiet en el perfil lipídic avançat, sobretot en la composició de les partícules LDL disminuint la concentració de C-sdLDL. També s'ha determinat que el programa erMedDiet + PA millora la composició de les lipoproteïnes LDL i de les VLDL enfront de la MedDiet tradicional.

Tenint en compte els resultats obtinguts en aquesta tesi, es posa de manifest el valor afegit del perfil lipídic avançat en l'estudi del RCVR que no es pot abordar mitjançant un perfil lipídic clàssic.

ABSTRACT IN ENGLISH

Cardiovascular disease (CVD) prevention is based on cardiovascular risk factors (CVRF) early detection and lowering C-LDL concentration. These strategies have shown to reduce the morbidity and mortality related to CVD. However, ischemic events still occur because of the residual cardiovascular risk (RCVR). Commonly, is associated with atherogenic dyslipemia (AD) and with alterations in lipoproteins metabolism that affect their concentration and composition as well. Currently, RCVR identification is based on the detection of phenotypes characterized by obesity, insulin resistance and increased concentrations of Tg and sdLDL and decreased concentrations of C-HDL. However, taking into account these parameters, there are some patients that still present an underestimated CVR. Recent publications show that it is possible to explain this RCVR thanks to the advanced lipid profile.

On the other hand, the MedDiet and its effect on the traditional lipid profile and weight has proved to reduce ischemic premature events. For this reason, it would be interesting to find out the impact of MedDiet on the advanced lipid profile and the RCVR.

Therefore, in this thesis the following hypotheses are raised:

- a) Advanced lipid profile could be useful to explain the RCVR in patients with a normal classical lipid profile;
- b) MedDiet could have a significant impact on the advanced lipid profile and contribute to its improvement.

The most atherogenic LDL subfractions are sdLDL, due to their small size and high density; these particles can easily pass through the vascular endothelium. Its relationship with the thickness of the intima media has been proved and they are considered a better predictor of ischemic events than C-LDL. Despite scientific evidence, its determination has not been included in clinical laboratories due to the lack of standardization of a practicable measurement procedure and adequate reference values. In addition to C-sdLDL concentration, different subclasses of lipoproteins have been characterized using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) techniques. This method can provide information about the composition, concentration and particle number of lipoprotein subclasses.

In the first part of this study, a precipitation method for sdLDL isolation was standardized and cholesterol concentration contained in these particles was measured. Reference values for C-sdLDL were calculated in a healthy population and published in a scientific journal.

Subsequently, we study the relationship between C-sdLDL and LDL characteristics established by RMN. We find out that LDL diameter established by NMR is inversely correlated to C-sdLDL. These results are significant and proved that as the LDL diameter decreased, C-sdLDL increased.

After that, the effect of advanced lipid profile on RCVR was also studied. Advanced lipid profile was analyzed in two cohorts of patients. One of them with premature CVD and the other, a reference population. Results obtained have demonstrated that large LDL subfraction (LDL-P) and Tg contained in HDL (Tg-HDL) contribute to the risk of suffering a premature ischemic event. LDL-P has a protective effect while Tg-HDL increases the risk of suffering a premature ischemic event. This effect could be explained due to the fact that HDL particles with a higher content of Tg give rise to smaller and more labile HDL particles with less antiatherogenic effect.

Finally, the effect of lifestyle on advanced lipid profile has been studied. The principal aim was to determine the effect on lipoprotein subclasses when C-LDL has achieved goal concentration. Considering that lifestyle changes are the first line on CVD treatment, it is important to determine the influence of healthy lifestyle habits and different types of diet on the advanced lipid profile. The PREDIMED study has already demonstrated the beneficial effects of MedDiet on reducing mortality related to CVD. Meanwhile, the PREDIMED-PLUS study is evaluating the effect of hypocaloric MedDiet, physical activity and behavioral therapy (erMedDiet + PA) versus MedDiet and traditional healthcare. Results obtained in this study indicate the beneficial effect of MedDiet on the advanced lipid profile, especially on the composition of LDL particles, reducing C-sdLDL. The erMedDiet + PA program has also improved LDL and VLDL lipoprotein composition over traditional MedDiet results.

Taking into account results obtained in this research work, we have demonstrated the benefit of the advanced lipid profile on RCVR identification, which cannot be detected using the classic lipid profile.

1. RIESGO CARDIOVASCULAR

El riesgo cardiovascular (RCV) se define como la probabilidad de que una persona desarrolle un evento aterosclerótico durante un período de tiempo definido (1). El riesgo cardiovascular total implica una estimación que considera los efectos de los principales factores de riesgo cardiovascular (FRCV) clásicos: edad, sexo, tabaquismo, presión arterial y concentración de lipoproteínas (2).

Las nuevas estrategias para la prevención y manejo de las enfermedades cardiovasculares (ECV) han facilitado un descenso progresivo de la mortalidad asociada a eventos isquémicos. Un 50% de esta disminución es debido a la detección precoz de FRCV (3).

A pesar de estos datos, la ECV continúa siendo la primera causa de muerte en España. El Instituto Nacional de Estadística (INE) ha presentado los datos del primer semestre de 2020. El número de muertes debidas a enfermedades del sistema circulatorio han representado el 23,0% del total mientras que las de origen infeccioso, que incluyen la COVID-19, fueron la segunda causa de muerte (20,9%). Por tanto, es necesario abordar la ECV desde nuevas perspectivas que dirijan sus esfuerzos a una estimación más precisa del RCV. (Figura 1)

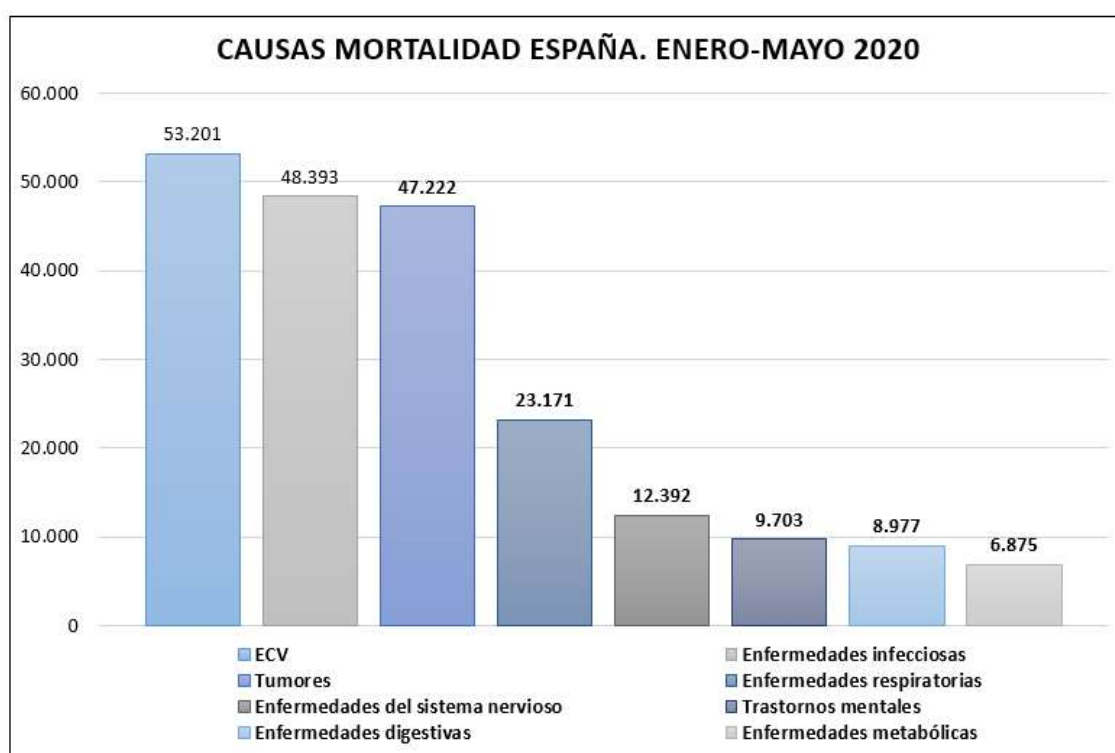


Figura 1. Defunciones según la causa de muerte en España. Datos de enero a mayo de 2020 del Instituto Nacional de Estadística (INE). Figura de elaboración propia.

En las principales guías clínicas europeas y americanas se recogen las recomendaciones de las diferentes estrategias terapéuticas en función de los FRCV, siendo la concentración de colesterol en las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) la diana del tratamiento farmacológico actual (1,4). Para la estimación del RCV total se elaboran escalas de puntuación teniendo en cuenta los FRCV (SCORE) pero no se incluyen todos los FRCV clásicos. Por este motivo, en las guías se recomienda individualizar el objetivo para la concentración de C-LDL en función de otros FRCV. Especialmente importante es el cálculo de RCV en pacientes de alto riesgo que presentan otras comorbilidades como diabetes mellitus tipo 2 (DM2) o dislipemia aterogénica (DA). En estos casos, la valoración de los FRCV clásicos no es suficiente y cada vez más los FRCV emergentes se están incluyendo en la práctica clínica como una herramienta importante para la evaluación del RCV total (5,6,7).

Debido a que la ECV es un problema de salud mundial se han destinado recursos para la investigación de los mecanismos moleculares relacionados con su origen y progresión. El interés común es buscar nuevos indicadores de los diferentes procesos que convergen en el desarrollo y ruptura de la placa de ateroma. Gracias a los avances en la comprensión del desarrollo de esta enfermedad se han propuesto nuevos biomarcadores cuyo potencial como FRCV se está examinando. Entre ellos se encuentran las diferentes subclases de lipoproteínas y sus fracciones (7,8,9).

1.1 Factores de riesgo cardiovascular clásicos

1.1.1 Factores de riesgo cardiovascular no modificables

Los FRCV no modificables son inherentes al individuo, se deben valorar para la estimación del RCV total pero nunca serán el objetivo del tratamiento para la ECV porque son invariables (10).

Entre ellos se encuentran:

- **Edad:** El riesgo de enfermedad coronaria aumenta considerablemente con la edad avanzada en hombres y mujeres. La principal razón es el efecto acumulativo de la exposición continuada a factores de riesgo aterogénicos que provocan una evolución progresiva de la aterosclerosis a medida que pasan los años. La edad es considerada un factor de riesgo independiente de cardiopatía coronaria y se incluye dentro de los SCORES para el cálculo de RCV (10).
- **Sexo:** El sexo masculino tiene un riesgo mayor de ECV que el sexo femenino. Las razones de una diferencia de sexo en el riesgo de cardiopatía coronaria no se comprenden completamente, pero estas diferencias disminuyen a medida que avanza la edad. Se

cree que existe un factor protector de los estrógenos en las mujeres premenopáusicas (10).

- **Antecedentes familiares de ECV:** Un familiar de primer grado con enfermedad coronaria es un factor de riesgo importante de cardiopatía isquémica. El riesgo es mayor cuanto mayor sea el número de familiares afectados y cuando el debut de la enfermedad sea más precoz y se presente en individuos jóvenes (10).

1.1.2 Factores de riesgo cardiovascular modificables

Los FRCV modificables son los que tienen un mayor interés, ya que se puede actuar de forma preventiva y correctiva sobre ellos y pueden ser la diana de las terapias dirigidas a la disminución del RCV (10). Entre ellos distinguimos los *de origen lipídico* relacionados con el metabolismo de las lipoproteínas y los *de origen no lipídico* que incluyen aquellas características biológicas o estilos de vida que aumentan la probabilidad de padecer una ECV.

1.1.2.1 Factores de riesgo cardiovascular modificables de origen lipídico

- **Concentración de colesterol en las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL)**

Las LDL son las principales lipoproteínas aterogénicas. Están formadas principalmente por colesterol y apolipoproteína B (Apo B). Se ha demostrado la relación entre la exposición prolongada a concentraciones elevadas de C-LDL con el origen y progresión de la aterosclerosis. También se ha demostrado su contribución a la inestabilidad de la placa de ateroma, aumentando la probabilidad de eventos isquémicos prematuros. En los estudios de aleatorización mendeliana se ha demostrado que la exposición a largo plazo a una concentración baja de C-LDL está asociada con un menor RCV (10).

A través de diversos ensayos clínicos se han demostrado los beneficios de la intervención clínica dirigida a la disminución del C-LDL mediante el tratamiento con estatinas (11). En ellos se ha demostrado una reducción de la mortalidad asociada a la ECV mediante la terapia hipolipemiente con estatinas (11). De hecho, la reducción de 1.0 mmol/L de C-LDL se ha asociado con una reducción del 20-25% en la mortalidad por ECV (1). En estudios posteriores se ha confirmado que la reducción del C-LDL por debajo de 1.8 mmol/L se relaciona con una disminución de la incidencia de ECV en individuos con FRCV que no han sufrido ningún evento cardiovascular (1). Estos resultados se confirman en pacientes con enfermedad aterosclerótica avanzada, demostrando el efecto de la reducción del C-LDL sobre la disminución de la

vulnerabilidad de la placa de ateroma (12). Todos estos datos justifican que en las guías se haya establecido el C-LDL como la principal diana farmacológica en la prevención de la ECV.

- **Concentración de Triglicéridos (Tg) y lipoproteínas remanentes.**

Una elevada concentración de Tg en plasma es un FRCV bien demostrado. Su presencia se asocia a estados patológicos como el Síndrome Metabólico (SM) y la Resistencia a la Insulina (RI). Además, se relaciona con alteraciones en las concentraciones de otras lipoproteínas, especialmente con la disminución en la concentración de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) y con la presencia de partículas LDL más pequeñas y densas (sdLDL) (13,14). Siempre ha sido controvertido su papel como FRCV independiente debido a su asociación con otros factores de riesgo, y por ello no ha sido siempre reconocido como tal en algunas guías clínicas (1,15). Sin embargo, en diversos estudios epidemiológicos se ha demostrado que concentraciones elevadas de Tg se asocian a una mayor incidencia y mortalidad por enfermedad coronaria de forma independiente (16).

El papel de los Tg en el proceso aterosclerótico tiene lugar a través de las lipoproteínas remanentes (17). Estas lipoproteínas incluyen las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y existen evidencias que las han relacionado con un mayor riesgo de cardiopatía isquémica (18).

En la actualidad, una concentración de Tg en ayunas superior a 1.7 mmol/L se considera un biomarcador de RCV (1). Los fibratos actúan disminuyendo la concentración de Tg. Su acción se centra en disminuir las lipoproteínas remanentes, aumentar la captación de VLDL por los hepatocitos y disminuir la producción de las VLDL. En diversos estudios clínicos se ha demostrado la efectividad de los fibratos en reducir las lipoproteínas remanentes y el riesgo de eventos coronarios. Sin embargo, estos estudios se han limitado a subanálisis de los pacientes que presentan DA, y en los análisis principales de los ensayos clínicos no se ha podido demostrar una reducción en la morbimortalidad asociada a la ECV (19).

A pesar de las controversias relacionadas con el potencial beneficio de la disminución de la concentración de Tg en la ECV, en las principales guías clínicas se recomienda su determinación en el análisis rutinario del laboratorio. También se considera una opción razonable el uso combinado de estatinas y fibratos en pacientes de alto riesgo con concentraciones de Tg superiores a 2.3 mmol/L (1).

- **Concentración de colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL)**

Las lipoproteínas HDL están constituidas por Apolipoproteína A (Apo A) y colesterol. Concentraciones disminuidas de C-HDL se asocian de forma independiente a un mayor riesgo de ECV, por lo que el C-HDL se incluye en el SCORE para la estimación del RCV total (20). El déficit de C-HDL se asocia con una mayor prevalencia de partículas LDL pequeñas y densas y con Tg elevados. Estas alteraciones lipídicas se denominan la *triada lipídica*, componente característico de la DA, asociada a un mayor riesgo metabólico (21). Una concentración de C-HDL inferior a 1.0 mmol/L en hombres y 1.2 mmol/L en mujeres es un marcador de RCV aumentado. En estudios epidemiológicos se relacionan estas concentraciones con un aumento de la morbilidad asociada a la enfermedad coronaria (22). También se ha demostrado la contribución de las partículas HDL a la estabilización de las placas de ateroma gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (23).

Sin embargo, todavía no hay evidencia científica suficiente para establecer el C-HDL como un objetivo terapéutico. En ensayos clínicos en los que se empleó el ácido nicotínico como tratamiento no se ha conseguido demostrar el beneficio terapéutico de aumentar la concentración de C-HDL, y en cambio ocurrían efectos adversos (1).

- **Concentración de colesterol no contenido en las lipoproteínas de alta densidad (C-No HDL)**

El colesterol que está contenido en todas las lipoproteínas menos en las HDL se denomina colesterol-No HDL (C-No HDL). Este cálculo permite estimar el colesterol contenido en las lipoproteínas remanentes (VLDL + IDL). Se ha demostrado que existe una mayor relación entre la mortalidad asociada a la enfermedad coronaria y el C-No HDL que entre ésta y el C-LDL (24). Esta relación se debe a que indirectamente el C-No HDL es una medida de todas las lipoproteínas aterogénicas. De hecho, ya que cada partícula aterogénica tiene una molécula de Apo B, esta apolipoproteína tiene una estrecha relación con el RCV y es a su vez un predictor de la extensión de la aterosclerosis coronaria (25).

En las principales guías se recomienda la estimación de C-No HDL en lugar de C-LDL cuando la concentración de Tg es superior a 4.5 mmol/L (400 mg/dL) (1). A partir de concentraciones superiores a 2 mmol/L (177 mg/dL) la fórmula de Friedewald infraestima la concentración de C-LDL. Los valores calculados no son representativos del riesgo asociado a la presencia de lipoproteínas aterogénicas como el C-VLDL, que precisamente se encuentra elevado en condiciones de hipertrigliceridemia (10). Por tanto, en esta situación el C-No HDL es un mejor

marcador de RCV y debe ser el objetivo secundario para el tratamiento de pacientes con DM2 u obesidad que ya han alcanzado la concentración objetivo de C-LDL (1). En las guías se establecen diferentes valores objetivo de C-No HDL en función del riesgo del paciente: 2.2, 2.6 y 3.4 mmol/L para individuos que presentan RCV muy alto, alto y moderado, respectivamente (1).

- **Dislipemia Aterogénica (DA)**

La DA se caracteriza por tres alteraciones conocidas como la *triada lipídica*: Tg plasmáticos elevados, predominio de partículas LDL pequeñas y densas (sdLDL) y C-HDL disminuido. Aunque existe evidencia de que cada componente de la *triada lipídica* es aterogénico de forma individual, no se ha podido determinar la contribución cuantitativa que le corresponde a cada uno de ellos. Por esta razón, la *triada lipídica* en su conjunto se considera un FRCV (10).

La DA, se asocia a obesidad abdominal, resistencia a la insulina e inactividad física. Este fenotipo es frecuente en los pacientes que presentan eventos isquémicos prematuros (26). La primera línea de tratamiento para los pacientes con DA son las modificaciones del estilo de vida que incluyen la dieta, la pérdida de peso y el aumento de la actividad física. En cuanto al tratamiento farmacológico se recomienda la terapia combinada de estatinas con fibratos (27).

1.1.2.2 Factores de riesgo cardiovascular modificables de origen no lipídico

- **Hipertensión arterial (HTA)**

La presión arterial elevada se define por valores de presión arterial sistólica superiores o iguales a 140 mmHg y valores presión arterial diastólica superiores o iguales a 90 mmHg. La relación entre la HTA y el riesgo de ECV está muy bien establecida (28). La HTA se considera un FRCV independiente que se incluye en las tablas del proyecto SCORE para la estimación del RCV total.

- **Tabaquismo**

El tabaquismo es un FRCV independiente de ECV. Dejar de fumar disminuye de forma rápida el RCV. Ello se relaciona con múltiples efectos fisiológicos, entre ellos el aumento la concentración de C-HDL que ocurre en los individuos que dejan de fumar (29,30).

- **Diabetes Mellitus (DM)**

La primera causa de muerte de los pacientes con Diabetes Mellitus (DM) son las complicaciones cardiovasculares. La DM, tanto la de Tipo 1 (DM1), como de la Tipo 2 (DM2), incrementan el riesgo de todas las ECV, pero sobre todo de la cardiopatía isquémica. El riesgo de enfermedad

aterosclerótica comienza a ser especialmente acusado cuando la concentración de glucosa plasmática es superior a 7 mmol/L (10).

En un estudio de casos y controles se demostró que la mortalidad por ECV es de 17.15/1000 pacientes/año en el grupo con DM2 mientras que en el grupo control con ECV sin DM2 la mortalidad fue de 12.86/1000 pacientes/año (14). De hecho, se considera que la DM es en la mayoría de las personas que la padecen una situación de alto RCV. Reducir las concentraciones de C-LDL en los pacientes con DM y alcanzar los objetivos de control lipídico ha demostrado disminuir el riesgo de cardiopatía isquémica (14).

- **Obesidad**

El sobrepeso y la obesidad no solo predisponen a un mayor riesgo de ECV, sino que también están asociados a una mayor tasa de mortalidad por otras causas. El RCV se relaciona sobre todo con la obesidad abdominal que está definida por una circunferencia de cintura superior a 102 cm en hombres y 88 cm en mujeres (27).

Se ha demostrado la influencia de la pérdida de peso en la incidencia de la ECV. Se ha descrito que pérdidas de peso modestas de tan solo el 5% del peso basal mejoran otros FRCV y disminuyen el RCV total, pero no se ha demostrado una relación directa entre la pérdida de peso y una reducción de la mortalidad asociada a la ECV (27). Esto se está actualmente estudiando en el estudio PREDIMED PLUS (31)

- **Inactividad física**

La inactividad física se asocia con un mayor riesgo de ECV. Por el contrario, la actividad física modifica otros FRCV reduciendo la concentración de C-LDL y Tg y aumentando el C-HDL (1). Además, mejora la sensibilidad a la insulina y reduce la presión arterial; en estudios observacionales se ha demostrado que la actividad física reduce el RCV (27). Se recomienda asesorar a pacientes con dislipemia para realizar ejercicio físico regular de intensidad moderada durante al menos 30 minutos al día, incluso si no tienen sobrepeso (1). Se ha recomendado que se considere el sedentarismo como un factor modificador que incrementa el RCV obtenido con las tablas de cálculo del RCV. (1)

- **Dieta aterogénica**

La composición de la dieta se relaciona con FRCV independientes, por ejemplo, el consumo de ácidos grasos saturados se asocia con un aumento de C-LDL y el consumo de sal con la HTA. Las

dificultades en la evaluación del impacto de la dieta en la enfermedad aterosclerótica han impedido dilucidar su contribución de forma independiente al RCV.

Los patrones dietéticos que han sido evaluados más extensamente son la dieta Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) y la dieta mediterránea (MedDiet) y ambos han demostrado ser estrategias eficaces en la reducción del RCV total. La dieta mediterránea también ha demostrado reducir la incidencia de ECV y de los eventos isquémicos tanto en prevención primaria como secundaria (32).

El consumo de una dieta aterogénica no se incluye entre los factores de riesgo para modificar los objetivos de C-LDL, pero en pacientes con dislipemia se debe aconsejar el consumo de una dieta saludable baja en grasas saturadas y rica en productos integrales, verduras, frutas y pescado. También se recomienda el consumo de alimentos ricos en antioxidantes, ácido fólico y ácidos grasos omega-3, cuya ingesta se ha relacionado con una disminución del RCV (1).

1.2 Factores de riesgo cardiovascular emergentes

A pesar de que la presentación de la enfermedad aterosclerótica se puede explicar en gran medida a partir de los FRCV clásicos todavía se siguen produciendo eventos isquémicos incluso en individuos con un RCV estimado óptimo (33,34). Por tanto, la capacidad para predecir eventos cardiovasculares de los FRCV clásicos es limitada. La variabilidad en la estimación del riesgo de sufrir un evento cardiovascular se debe a la presencia del Riesgo Cardiovascular Residual (RCVR), que no se puede cuantificar mediante los factores de riesgo clásicos (35).

La investigación de nuevos FRCV que permitan explicar aspectos de la enfermedad aterosclerótica no explicada por los FRCV clásicos ha tenido como resultado la propuesta de los factores de riesgo cardiovascular emergentes. Aunque en estudios publicados se ha descrito la relación de estos factores con la ECV aún se desconoce su poder predictivo independientemente de otros FRCV o su efecto en la morbimortalidad. Debido a estas limitaciones, todavía no se ha estudiado su potencial como objetivo directo de la terapia hipolipemiante.

Al igual que ocurre con los FRCV clásicos se distinguen 2 categorías: factores de riesgo emergentes lipídicos y factores de riesgo emergentes no lipídicos.

1.2.1 Factores de riesgo cardiovascular emergentes de origen lipídico

- **Lipoproteína (a) (Lp(a))**

La Lipoproteína (a) (Lp (a)) es una partícula de LDL con un resto Apo (a) unido covalentemente a la Apolipoproteína B (Apo B). Tiene un diámetro inferior a 70 nm y por tanto puede atravesar el endotelio vascular y quedarse retenida en la pared arterial formando parte de la placa de ateroma. Además de engrosar la placa de ateroma también contribuye a la inestabilidad de la misma (36). Presenta propiedades procoagulantes derivadas de sus similitudes estructurales con la molécula de plasminógeno y propiedades proinflamatorias asociadas a los fosfolípidos oxidados con carga negativa que transporta (37).

En estudios aleatorizados se ha descrito el valor predictivo positivo de concentraciones elevadas de la Lp(a) con la enfermedad aterosclerótica (38). A pesar de ello las terapias dirigidas a disminuir la concentración de Lp(a) son poco efectivas y no han conseguido demostrar una reducción del RCV. Se están evaluando nuevos tratamientos basados en un oligonucleótido antisentido (IONIS-APO (a)-L_{RX}) contra el gen que codifica la Lp(a) que han demostrado reducir las concentraciones de Lp (a), pero se necesitan más ensayos clínicos para verificar la seguridad de este tratamiento. Por tanto, el riesgo asociado a concentraciones elevadas de Lp(a) tiene un componente hereditario (39). Pacientes con concentraciones de Lp(a) superiores a 430 nmol/L pueden ser clasificados de alto riesgo de por vida en un grado equivalente al riesgo asociado con la hipercolesterolemia familiar heterocigota (1).

En las principales guías se considera la Lp(a) como un factor que incrementa el RCV y permite identificar pacientes candidatos a una intensificación en la terapia hipolipemiante, por tanto, se recomienda su determinación al menos una vez en la vida de cada persona adulta (1).

- **Partículas LDL pequeñas y densas (sdLDL)**

Las partículas LDL pequeñas y densas (sdLDL) son la subfracción más aterogénica de las partículas LDL debido a su pequeño tamaño y elevada densidad que facilita su infiltración en la pared arterial promoviendo el proceso de aterosclerosis (40) (Figura 2). Son un componente de la triada lipídica presente en la DA y por tanto se suelen generar en situaciones de hipertrigliceridemia.

Su presencia se asocia con un aumento del riesgo de enfermedad aterosclerótica (41) pero no se ha podido evaluar su potencial como FRCV independiente ya que no se dispone de métodos estandarizados y practicables para su medición. Aun así, se ha demostrado la relación directa

entre el grosor de la íntima media determinado mediante ultrasonografía y la concentración de colesterol en las partículas sdLDL (C-sdLDL) (42).

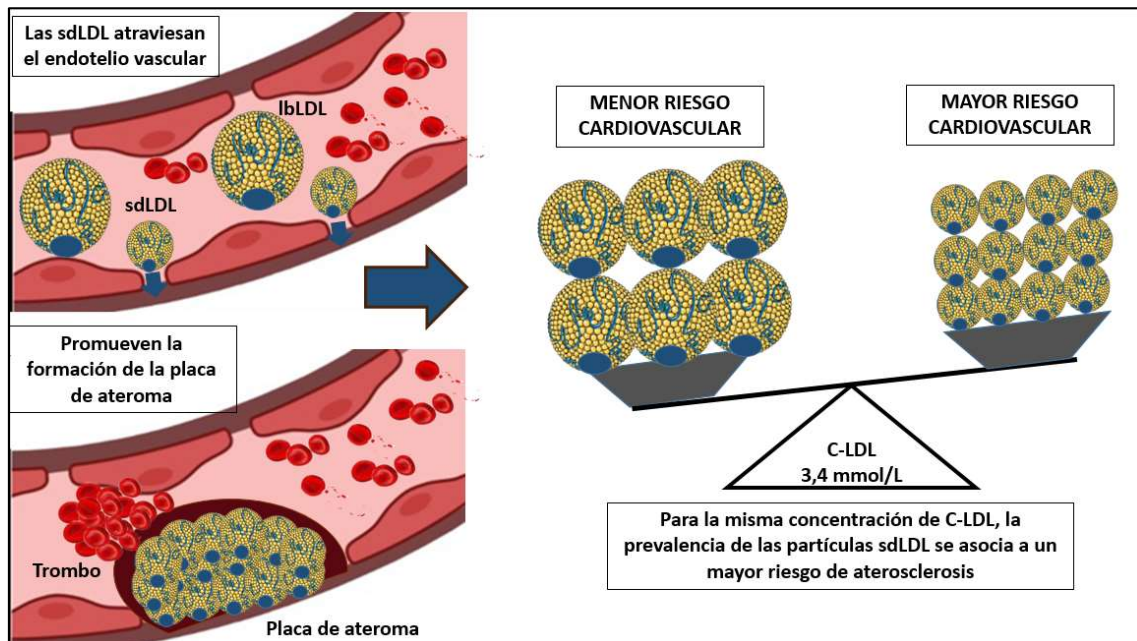


Figura 2. Contribución de las partículas sdLDL a la formación de la placa de ateroma y al riesgo cardiovascular en comparación con las partículas LDL ligeras y voluminosas (lbLDL). Figura de elaboración propia.

- **Apolipoproteína B (Apo B)**

La Apo B está contenida en todas las lipoproteínas con potencial aterogénico y por tanto se ha propuesto como marcador de arterosclerosis como alternativa al C-LDL. En numerosos estudios se ha descrito la elevada correlación entre Apo B y C-LDL en individuos con concentraciones normales de Tg. Sin embargo, en situaciones de hipertrigliceridemia la concentración de Apo B es mucho más elevada que la de C-LDL ya que indica también la presencia de las lipoproteínas remanentes (VLDL + IDL) (43).

Por consiguiente, la Apo B representa mejor el riesgo aterogénico en individuos con concentraciones elevadas de Tg. En estas situaciones, en las que el C-LDL no se puede calcular, la Apo B puede estimar la concentración de C-LDL, ya que cada partícula de LDL contiene una molécula de Apo B.

En las guías se recomienda la determinación de C-No HDL y de Apo B en pacientes con DM y concentraciones elevadas de Tg y los establecen como objetivos secundarios de la terapia una vez se hayan alcanzado las metas en la concentración de C-LDL. Se han establecido como concentraciones objetivo de Apo B 1.56 $\mu\text{mol/L}$ (100 mg/dL), 1.27 $\mu\text{mol/L}$ (80 mg/dL) y 1.07 $\mu\text{mol/L}$ (65 mg/dL) para pacientes de riesgo moderado, alto y muy alto respectivamente (1).

1.2.2 Factores de riesgo cardiovascular emergentes de origen no lipídico

- **Homocisteína**

La homocisteína es un aminoácido sulfurado producto del metabolismo de la metionina y que interviene en los procesos de metilación del ADN a través de un producto intermedio de su metabolismo la S-adenosil-metionina. Una concentración sérica elevada de homocisteína se asocia con el riesgo de enfermedad coronaria, pero los mecanismos exactos de su papel en el proceso aterosclerótico no están bien definidos (44).

Se ha demostrado que concentraciones elevadas de homocisteína en sangre producen peróxidos que dañan el endotelio vascular y desencadenan la activación de los factores de la coagulación XII y V y la inhibición de la trombosmodulina desencadenando eventos trombóticos. Estos resultados explican la presencia de lesiones vasculares prematuras en individuos con las formas heredadas de hiperhomocisteinemia grave que se asocian a mutaciones en los genes de las enzimas MTHFR y cistationina beta-sintasa (45).

Ante concentraciones elevadas de homocisteína se debe verificar que los aportes dietéticos de ácido fólico y vitaminas B6 y B12, que actúan como sustrato y cofactores en la degradación de la homocisteína, son adecuados. En personas de edad avanzada estos déficits nutricionales son comunes, siendo la principal causa de la hiperhomocisteinemia (46).

En las guías se recomienda su determinación en individuos de alto riesgo y en pacientes con historia familiar de isquemia prematura, debido al importante componente hereditario asociado a la hiperhomocisteinemia (1).

- **Proteína C reactiva de elevada sensibilidad (hsPCR)**

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico, por tanto, puede cursar con un incremento de las concentraciones plasmáticas de determinados marcadores de inflamación. La Proteína C Reactiva de elevada sensibilidad (hsPCR) permite detectar grados muy bajos de inflamación sistémica. Su determinación permite cuantificar el estado inflamatorio basal en pacientes con aterosclerosis subclínica lo que permite predecir el riesgo de inestabilidad y ruptura de la placa de ateroma y evitar eventos isquémicos.

Se han podido detectar concentraciones más elevadas de esta proteína en individuos fumadores y con SM que comúnmente presentan una mayor inflamación en las arterias coronarias que la población general (47).

En las guías no se recomienda la medición de la concentración de hsPCR en prevención primaria con el fin de modificar objetivos de C-LDL, pero sí se aconseja intensificar la terapia para la reducción de C-LDL en individuos de riesgo elevado y aumento de la concentración de hsPCR (27).

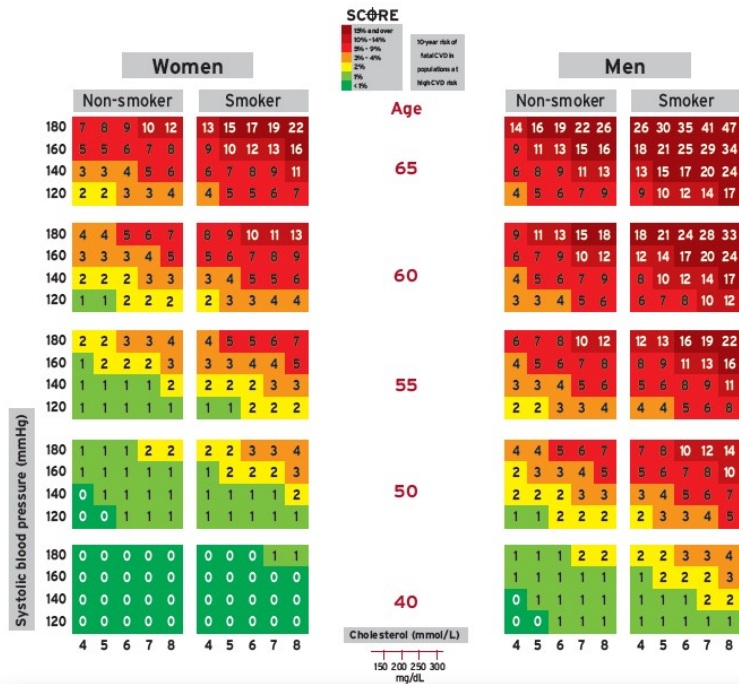
1.3 Cálculo del riesgo cardiovascular

La identificación de diferentes categorías de RCV es imprescindible para poder establecer objetivos terapéuticos de C-LDL que se ajusten a las necesidades específicas de cada individuo. Por tanto, es necesario estimar el RCV total en función de los FRCV antes descritos.

Las primeras tablas para la estimación del RCV fueron las de Framingham, pero sobreestiman el RCV en poblaciones de bajo riesgo como la española, con las tasas de morbimortalidad por cardiopatía isquémica más bajas de Europa (48). En las guías actuales de 2019 ESC/EAS y en el Comité Español Interdisciplinario para la Prevención Cardiovascular (CEIPC), se recomienda el uso de la función SCORE (Systematic Coronary Risk Estimation) que calibra la estimación del RCV en función de la mortalidad asociada a la ECV en cada país. Actualmente existen 2 tablas para países europeos, una para países de alto riesgo y otra para países de bajo riesgo. España se encuentra dentro de esta última categoría. Esta información está disponible en <http://www.heartscore.org>(49). (Figura 3)

SCORE - European High Risk Chart

10 year risk of fatal CVD in high risk regions of Europe by gender, age, systolic blood pressure, total cholesterol and smoking status



SCORE - European Low Risk Chart

10 year risk of fatal CVD in low risk regions of Europe by gender, age, systolic blood pressure, total cholesterol and smoking status

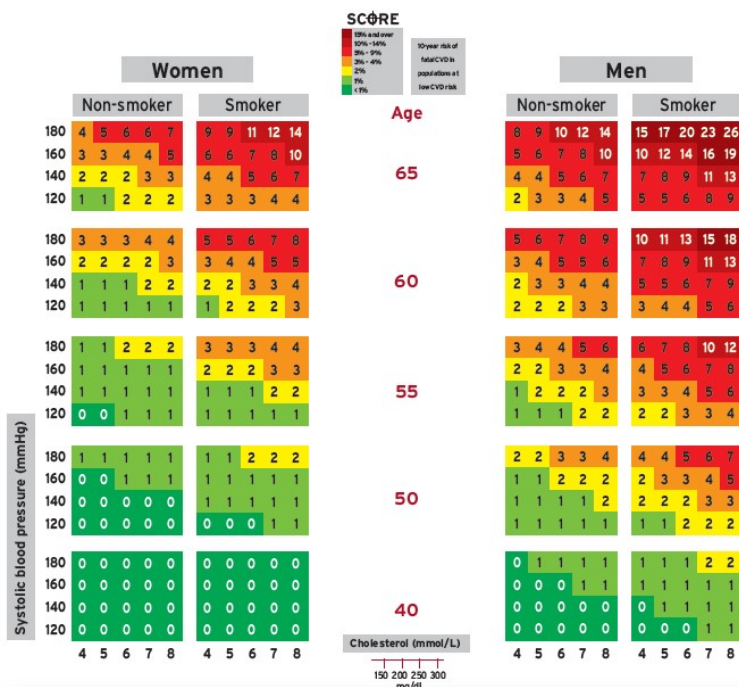


Figura 3. Tablas de riesgo de la función SCORE (Systematic Coronary Risk Estimation) para regiones de Europa de bajo y alto riesgo cardiovascular. European Guidelines on CVD Prevention in Clinical Practice 2016 Eur J Prev Cardiol. 2016 jul;23(11):NP1-NP96. doi: 10.1177/2047487316653709

Para la estimación del RCV la función SCORE incluye en sus tablas los FRCV: sexo, Edad, C-LDL, presión sistólica y hábito tabáquico. A diferencia de las tablas de Framingham, la función SCORE no estima el RCV en pacientes con DM. A estos pacientes directamente les asigna el más alto grado de riesgo junto a individuos con historia previa de eventos isquémicos, enfermedad renal crónica avanzada y diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar. El programa SCORE también ha evaluado la utilidad del C-HDL en la predicción del RCV. Se ha demostrado que puede contribuir de forma significativa en la estimación del RCV si se introduce como un variable en la ecuación. Por tanto, se ha presentado una versión avanzada de estas tablas que incorpora la concentración de C-HDL.

Según la puntuación obtenida para cada paciente, la función SCORE los clasifica en 4 categorías de RCV en función de la probabilidad de que se produzca un evento isquémico mortal antes de 10 años.

- Riesgo muy elevado: Puntuación superior a 10 puntos. Riesgo de muerte por ECV a 10 años superior al 10%.
- Riesgo elevado: Puntuación entre 5 y 9 puntos. Riesgo de muerte por ECV a 10 años del 5% al 9%.
- Riesgo moderado: Puntuación entre 1 y 4 puntos. Riesgo de muerte por ECV a 10 años del 1% al 4%.
- Riesgo bajo: Puntuación inferior a 1 punto Riesgo de muerte por ECV a 10 años inferior al 1%

En España el proyecto REGICOR presentó una nueva función adaptando las tablas de Framingham a los datos epidemiológicos de tasa de incidencia de eventos isquémicos en población española (50). Esta ecuación se validó mediante el seguimiento durante cinco años de una cohorte española, demostrando su utilidad para la predicción de eventos isquémicos a 5 años. Estas tablas se pueden utilizar en un rango de edad más amplio que la función SCORE (35-74 años) y se puede aplicar a población diabética, ya que en la validación del estudio se incluyeron 941 pacientes diabéticos. Se ha comparado la ecuación SCORE y la REGICOR. Los resultados obtenidos demuestran que SCORE estima mejor el riesgo en población general mientras que REGICOR infraestima el riesgo coronario en un 38% (51). Por otro lado, en otros estudios se ha publicado que la función SCORE sobreestima el riesgo de mortalidad cardiovascular en un 40% (52)

Las ecuaciones para la estimación del RCV total son una buena herramienta para el control poblacional del RCV, pero se debe individualizar el tratamiento en función de las características de cada paciente. Los objetivos de C-LDL se deben ajustar en función de la presencia de otros FRCV como los Tg. También se ha de considerar que estas ecuaciones no contemplan el RCV que está presente en individuos de alto riesgo con SM. En estos casos es necesario intensificar la terapia, incidiendo en la importancia de la adopción de hábitos de vida saludables para conseguir una disminución real del RCV total.

2. DISLIPEMIAS

Las dislipemias son trastornos del metabolismo lipídico. Su estudio es importante debido a la relación causal entre concentraciones alteradas de lípidos y la ECV (10).

Las dislipemias se clasifican en función de su fenotipo lipídico o de su etiología. Una correcta clasificación indicará un diagnóstico más exacto que permitirá un tratamiento más personalizado y efectivo.

2.1 Clasificación en función de su fenotipo

Es la más utilizada en la práctica clínica y está basada en la clasificación de Fredrickson-OMS (53). Esta clasificación establece 3 categorías de dislipemias en función de la alteración lipídica predominante:

- Hipercolesterolemia: Aumento de la concentración sérica de colesterol
- Hipertrigliceridemia: Aumento de la concentración sérica de Tg.
- Dislipemias mixtas: Aumento de la concentración sérica de Tg y de colesterol.

Esta clasificación no incluye las hipolipidemias entre ellas las hipoalfalipoproteinemias que se caracterizan por una disminución de la concentración de C-HDL y las hipobetalipoproteinemias que se caracterizan por una disminución de la concentración de colesterol.

2.2 Clasificación en función de su etiología

Según su causa, las dislipemias se dividen en primarias o de origen genético, o secundarias, que son debidas a factores ambientales, a otras patologías o trastornos que desencadenan la dislipemia. Muchas dislipemias, sobre todo las hipertrigliceridemias, tienen un origen mixto, primario y secundario al mismo tiempo. En los últimos años se han producido grandes progresos que han surgido con la era genómica y que han permitido profundizar en las bases genéticas de las dislipemias.

2.2.1 Dislipemias primarias

Representan casi el 10% de las dislipemias y su origen es genético. Las mutaciones o variantes genéticas se pueden localizar en un único gen, es decir cuando son monogénicas, o en varios genes, que dan lugar a las dislipemias poligénicas (54).

- **Dislipemias primarias poligénicas:** Se deben a la presencia de diferentes variantes genéticas originadas por el cambio de un único nucleótido (SNPs) en diferentes genes. Son las dislipemias primarias más prevalentes y su herencia es multifactorial. Se asocian a una predisposición genética que depende de factores externos para la expresión del fenotipo patológico. Los individuos con estilos de vida saludables tendrán una menor probabilidad de presentar manifestaciones clínicas que sujetos con hábitos perjudiciales como el tabaquismo, la dieta aterogénica, la inactividad física y el consumo de alcohol. Las más comunes son la hipercolesterolemia poligénica, la hipertrigliceridemia poligénica y la hiperlipidemia familiar combinada.

- **Dislipemias primarias monogénicas:** Se deben a la presencia de mutaciones en un único gen, la mayoría han sido descritas en el gen del receptor de LDL. Presentan patrones de herencia mendeliana, autosómica dominante o recesiva. Los portadores presentan concentraciones muy elevadas de colesterol o triglicéridos en función de la mutación detectada. Los pacientes afectados de hipercolesterolemia presentan un mayor riesgo de ECV precoz, rasgos físicos como xantomas, xantelesmas o arco corneal y suele haber antecedentes familiares de eventos isquémicos prematuros. Por otro lado, los pacientes con elevación de la concentración de Tg tiene un mayor riesgo de pancreatitis y presente xantomas eruptivos y tuberosos y lipidemia retinalis. En la tabla 1 se muestran los principales genes asociados a las dislipemias monogénicas clasificados en función del fenotipo lipídico (55,56).

Tabla 1. Dislipemias primarias monogénicas

Fenotipo	Alteración lipídica	GENES	RCV
Hipercolesterolemia	C-LDL ↑	LDLR (Hipercolesterolemia familiar) APO B (Apo B-100 defectuoso familiar) PCSK9 (Hipercolesterolemia asociada a PCSK9) LDLRAP1 (Hipercolesterolemia autosómica recesiva) Lpa (Hiperlipoproteinemia (A)) ABCG5 /ABCG8 (Sistosterolemia) CYP7A1 (Deficiencia de colesterol-7-alfa-hidroxilasa)	+++
	C-HDL ↑	CEPT (Hiperalfalipoproteinemia-déficit CEPT)	-
Hipocolesterolemia	C-HDL ↓	APOA (Hipoalfalipoproteinemia familiar)	+++
	Tg ↑ C-LDL ↓ C-HDL ↓	ABCA1 (Deficiencia familiar de HDL)	-
	Tg ↑ C-HDL ↓	LCAT (Deficiencia de lecitina colesterol acil tranferasa)	-
	Tg ↓ C-LDL ↓	APO B (abetalipoproteinemia, hipobetalipoproteinemia)	-
Hipertrigliceridemia	Tg ↑ Quilomicrones ↑	LPA (Déficit familiar de lipoproteín-lipasa) APOC2/APOA5/GPIHBP1/LMF1	+
Hipotrigliceridemia	Tg ↓	APOCIII (Déficit de APOCIII) ANGPTL3 /ANGPTL4	-
Hiperlipemia Mixta	Tg ↑	APOE (Disbetalipoproteinemia familiar)	+++
	C-LDL ↑	LIPA (Deficiencia de lipasa ácida lisosomal A)	++

Tabla 1. Relación entre el fenotipo, genotipo y lipoproteína alterada. RCV: Riesgo cardiovascular. Símbolos: - no aporta RCV, + RCV bajo o moderado, ++ RCV moderado-alto, +++ RCV alto-muy alto. Tabla de elaboración propia.

2.2.2 Dislipemias secundarias

Las dislipemias secundarias son causadas por diversas situaciones clínicas, estilos de vida o tratamientos farmacológicos y representan el 30-40% de las dislipemias. En la tabla 2 se recogen las 10 principales causas de dislipemia secundaria ordenadas según la frecuencia con la que se asocian a las correspondientes alteraciones lipídicas (57).

Tabla 2. Causas de dislipemias secundarias

Causas dislipemia secundaria	C-LDL	Tg	C-HDL
1. Hipotiroidismo	↑	↑	
2. Síndrome Nefrótico	↑	↑	
3. Insuficiencia Renal Crónica		↑	
4. Colangitis Biliar Primaria	↑		
5. Diabetes Mellitus	↑	↑	↓
6. Obesidad	↑	↑	↓
7. Síndrome de Cushing		↑	
8. Consumo de alcohol		↑	
9. Tabaquismo		↑	↓
10. Fármacos	*	*	*

Tabla 2. Principales causas de dislipemia secundaria ordenadas por frecuencia y su efecto en las lipoproteínas. (*) En función del tipo de fármaco su efecto en las diferentes lipoproteínas es variable. Tabla de elaboración propia

Previamente al inicio del tratamiento hipolipemiante es necesario establecer la causa secundaria de las alteraciones lipídicas (56). La efectividad de la terapia dependerá de una correcta identificación de las causas subyacentes a la dislipemia y evitará efectos adversos como la rabdomiolisis. Por ejemplo, el tratamiento con estatinas de la dislipemia secundaria a hipotiroidismo puede conducir a miopatía sino se trata previamente el hipotiroidismo. Adicionalmente, de esta manera se podrán detectar las hiperlipidemias primarias que se ocultan detrás de un diagnóstico erróneo de dislipemias secundarias. Esta cuestión es clave para poder reconocer individuos que directamente se clasificarían de riesgo elevado según la función SCORE como los pacientes con dislipemias primarias, DM o insuficiencia renal crónica. En estos casos es necesario intensificar el tratamiento para alcanzar objetivos de C-LDL más bajos o controlar también las concentraciones de Tg con fenofibratos. Esto indica la importancia del diagnóstico diferencial de la dislipemia secundaria.

2.2 Impacto de las dislipemias en la aterosclerosis

Como ya hemos visto, el aumento de la concentración de lipoproteínas en plasma, principalmente colesterol y Tg, es la causa de la mayoría de dislipemias (10). La exposición prolongada a concentraciones elevadas de partículas LDL provoca que éstas atraviesen la pared arterial y depositen el colesterol que contienen, que se acumula en el espacio subendotelial, donde se oxida y se liberan radicales libres de oxígeno. Las LDL oxidadas (OxLDL) son partículas proinflamatorias que provocan la activación de los monocitos y su transformación en

macrófagos y en células espumosas repletas de colesterol. Estas células liberan citocinas que activan la inflamación y la proliferación celular que dará lugar al engrosamiento de la pared arterial y a la formación de las placas de ateroma con el consiguiente estrés hemodinámico (58). (Figura 4)

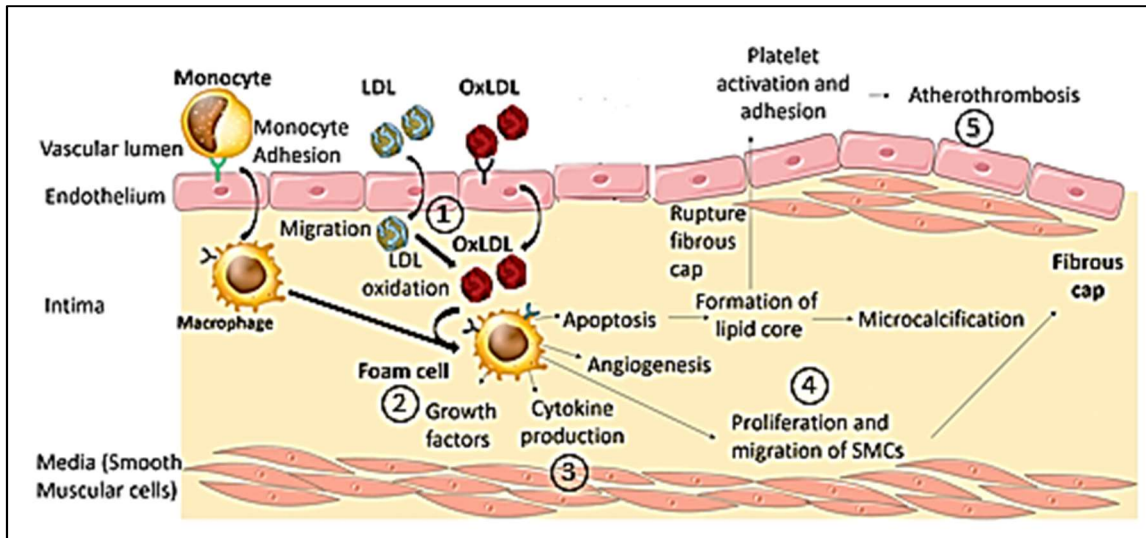


Figura 4. Formación de la placa de ateroma mediada por las LDL.

1. Concentraciones elevadas de LDL atraviesan el endotelio vascular y se oxidan formando OxLDL. 2. Las OxLDL son fagocitadas por macrófagos generando células espumosas. 3. Estas inducen la liberación de factores proinflamatorios 4. Se activan las vías de proliferación y migración de células del músculo liso, acelerando la formación de una capa fibrosa o placa de ateroma. 5. La ruptura de la placa de ateroma provoca la activación plaquetaria iniciándose un proceso aterotrombótico que culminará con la formación de un trombo. Imagen modificada Canadian Journal of Cardiology 2017 33:1513-1516 DOI: (10.1016/j.cjca.2017.09.016)

Debido a papel del C-LDL en la aterogénesis, las estrategias terapéuticas se han centrado en disminuir su concentración. Las estatinas inhiben selectiva y competitivamente la acción de la enzima, 3-hidroxi-3metil-glutaril-CoenzimaA reductasa (HMG-CoA reductasa) provocando una disminución del colesterol intracelular. Esto induce la activación de un factor de transcripción denominado Proteína de Unión a Elementos de Respuesta a Esterol (SREBP) que induce la expresión del gen LDLR principalmente a nivel hepático, aumentando la captación y degradación del colesterol. La reducción de C-LDL mediante las estatinas ha demostrado ser una estrategia efectiva para la reducción de la mortalidad asociada a las ECV (59).

A pesar del papel fundamental del C-LDL en la formación de la placa de ateroma también son importantes las dislipemias que cursan con un aumento de la concentración de Tg, ya que también intervienen en el proceso aterosclerosis. Se ha demostrado el papel que juegan los Tg en la inflamación en estudios en los que se ha demostrado el aumento de la concentración de la proteína C reactiva en individuos con hipertrigliceridemia (47,60).

El aumento de la producción de Tg se asocia con el aumento de las lipoproteínas remanentes. La hidrólisis de estas lipoproteínas mediada por la lipoprotein lipasa (LPL) produce un aumento

de los ácidos grasos libres (AGLs) en la íntima arterial. Estos productos activan varias vías de señalización proinflamatorias, procoagulantes y proapoptóticas, que desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de la aterosclerosis. Los AGLs oxidados aumentan la expresión de interleucinas inflamatorias, mientras que las lipoproteínas remanentes facilitan la expresión endotelial de las moléculas de adhesión que facilitan la migración transendotelial de leucocitos, además de la activación de monocitos y neutrófilos (61). (Figura 5)

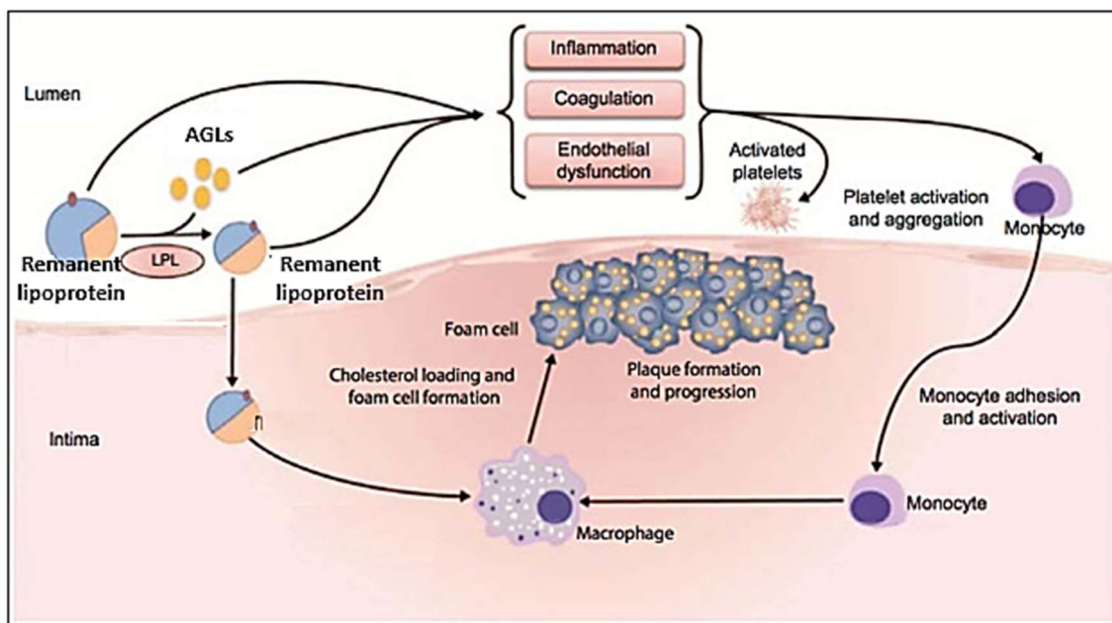


Figura 5. Formación de la placa de ateroma mediada por las lipoproteínas remanentes. 1. Concentraciones elevadas de Tg provocan un aumento de la concentración de lipoproteínas remanentes. La LPL las hidroliza liberando AGLs. 2. Las lipoproteínas remanentes ricas en Tg y los AGLs desencadenan procesos proinflamatorios y proaterotrombóticos activando plaquetas y monocitos. 3. Estos monocitos atraviesan el endotelio vascular y fagocitan las lipoproteínas remanentes ricas en Tg. 4. Este proceso origina células espumosas que promueven la progresión de la placa de ateroma. Imagen modificada Nat Rev Cardiol 2013 Nov;10(11):648-61. doi: 10.1038/nrcardio.2013.140.

En el caso de las hipertrigliceridemias la principal estrategia terapéutica es la adopción de hábitos saludables. La pérdida de peso y la actividad física han demostrado disminuir la concentración de Tg y mejorar la concentración y características del perfil lipoproteico (27).

2.3 Aterosclerosis y enfermedad cardiovascular

Las ECV se estudian conjuntamente porque comparten muchas características, pero, principalmente se agrupan debido a su relación con la aterosclerosis que se considera la causa directa de la mortalidad asociada a las ECV (62).

La arteriosclerosis es un término genérico que se refiere al engrosamiento y el endurecimiento de las arterias, independientemente de su tamaño. Cuando afecta a arterias de mediano y gran calibre se denomina aterosclerosis. Este es un proceso inflamatorio y crónico que se inicia desde

la infancia y se desarrolla a lo largo de los años. Durante las primeras décadas y hasta la edad media de la vida o, incluso en muchos individuos, hasta edades avanzadas, es asintomática. Es necesario estudiar los FRCV para poder estimar el RCV total y prevenir eventos isquémicos consecuencia de la aterosclerosis antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas, que con frecuencia son mortales o provocan secuelas graves (63). Las principales manifestaciones clínicas tienen lugar debido a la rotura de la placa de ateroma y la formación de un trombo en su superficie que provoca oclusión aguda parcial o total de la arteria afectada.

En función de las características clínicas en el momento de su manifestación distinguimos 4 grupos:

- **Cardiopatía isquémica o cardiopatía coronaria:** Es la forma más frecuente de ECV y engloba: infarto agudo de miocardio (IAM), angor e insuficiencia cardíaca (IC).
- **Enfermedad cerebrovascular (ACV) o Ictus:** En función de la manifestación clínica y su evolución distinguimos el evento vascular cerebral de tipo isquémico o hemorrágico y el evento isquémico transitorio.
- **Enfermedad arterial periférica:** Es la aterosclerosis de las arterias periféricas y la manifestación más frecuente es la claudicación.
- **Aterosclerosis aórtica:** Engloba las aneurismas torácicas y abdominales.

Una vez diagnosticada la ECV con evidencia clínica de aterosclerosis, debe instaurarse un tratamiento al paciente con estatinas y con anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios. De esta manera se evitan también los eventos trombóticos derivados de la ruptura de la placa de ateroma. En los casos más graves se puede optar por tratamientos quirúrgicos como la angioplastia que consiste en dilatar la arteria ocluida con el fin de restaurar el flujo sanguíneo obstruido (64).

3. RIESGO CARDIOVASCULAR RESIDUAL (RCVR)

Las estrategias para la prevención de la ECV mediante la estimación del RCV en base a los FRCV clásicos han demostrado disminuir la incidencia de esta patología (65). Más concretamente, la reducción con estatinas de la concentración de C-LDL disminuye directamente la mortalidad asociada a la ECV (11). Debido a la evidencia científica, en las guías se recoge la recomendación de centrar todo el esfuerzo terapéutico en la reducción hasta valores objetivos de C-LDL (10). Sin embargo, estudios realizados en el ámbito de la prevención primaria y secundaria, han demostrado que a pesar de conseguir reducciones de entre el 25 y el 40% de C-LDL y obtener una reducción del riesgo de ECV todavía persiste un elevado RCV. En el estudio PESA se detectó la presencia de aterosclerosis en individuos con concentraciones inferiores a 1.8 mmol/L (70 mg/dL) (33). (Figura 6). Incluso en los pacientes de prevención secundaria en tratamiento hipolipemiante permanece una elevada incidencia de eventos isquémicos (66).

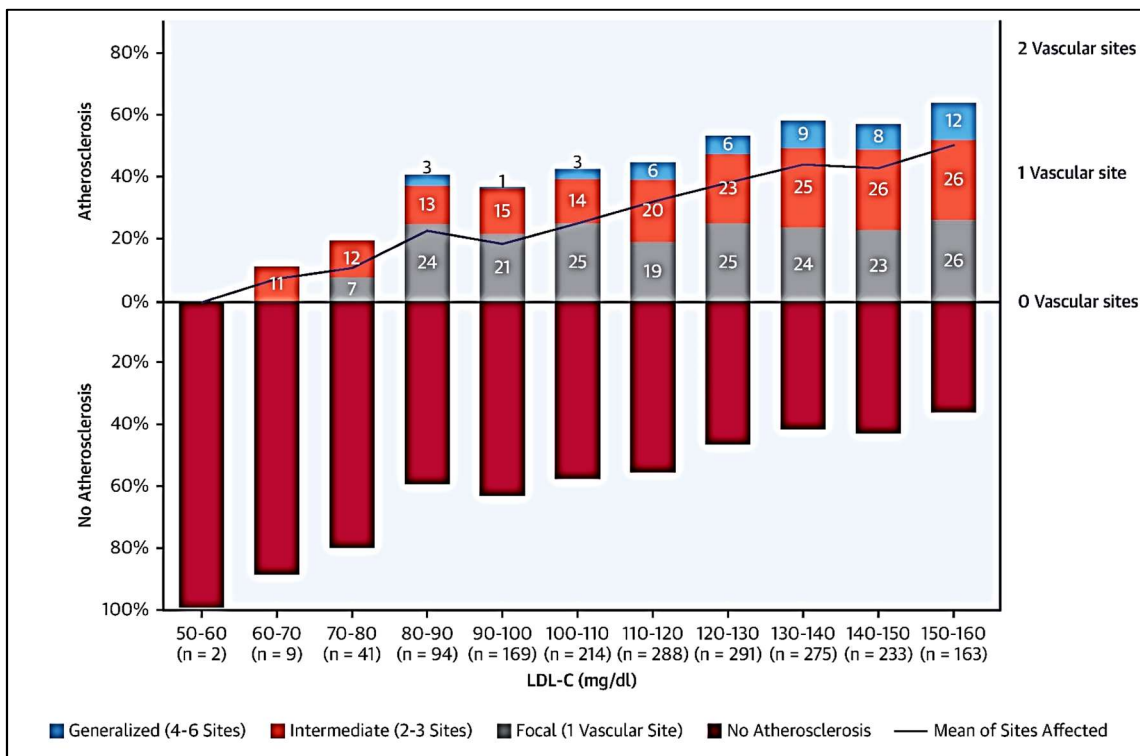


Figura 6. Relación entre la concentración de C-LDL y la progresión de la aterosclerosis. J Am Coll Cardiol 2017 Dec 19;70(24):2979-2991. doi: 10.1016/j.jacc.2017.10.024.

Por tanto, las estrategias basadas en centrar todos los esfuerzos terapéuticos en la disminución de la concentración de C-LDL parecen ser insuficientes, sobre todo en individuos con SM o DA que presentan un elevado RCVR (67,68). Estos resultados son indicativos de que es necesario buscar nuevos factores lipídicos con potencial acción aterogénica que contribuyan de forma significativa a la mortalidad asociada al RCVR.

3.1 Dislipemia Aterogénica y Síndrome Metabólico

La dislipemia aterogénica es una alteración lipídica caracterizada por la triada lipídica: aumento de la concentración de Tg y sdLDL y disminución del C-HDL. Este trastorno del metabolismo lipídico está asociado a un mayor RCV y se presenta en individuos de alto riesgo como los pacientes con SM (68).

El SM es un trastorno metabólico que además de caracterizarse por la triada lipídica presenta otras comorbilidades. Actualmente es necesario cumplir 3 de los siguientes criterios para el diagnóstico del SM (4):

- Perímetro abdominal aumentado: superior o igual a 102 cm en hombres y superior o igual a 88 cm en mujeres.
- Concentración de Tg superior o igual a 1.7 mmol/L (150 mg/dL)
- C-HDL disminuido inferior o igual a 1 mmol/L en hombres y 1.3 mmol/L en mujeres
- HTA: PS superior o igual a 130 mmHg; PD superior o igual a 85 mmHg
- Glucosa en ayunas superior o igual a 5.5 mmol/L (100 mg/dL)

Las partículas sdLDL no se han podido incluir como criterio diagnóstico porque actualmente no se miden de forma habitual en los laboratorios clínicos.

Las bases fisiopatológicas del SM se basan en el aumento de tejido adiposo y de la grasa visceral debido a hábitos poco saludables entre los que se incluye la dieta aterogénica y la inactividad física (69). El tejido adiposo se comporta como un órgano produciendo factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) leptina y resistina e inhibiendo la secreción de adiponectina (70). Esta citoquina estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce la concentración de Tg y aumenta la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina. Esta situación es el inicio de la resistencia a la insulina estado patológico que evoluciona hasta DM2 caracterizada en sus estadios iniciales por la secreción en exceso de insulina. La hiperinsulinemia provoca la retención de sodio en los túbulos renales debido al efecto antinatriurético de la insulina, esto provoca un aumento de la presión arterial (71). Por otro lado, el tejido adiposo también produce inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), promoviendo el estado protrombótico basal que presentan los pacientes con SM y que aumenta el riesgo de ruptura de la placa de ateroma.

La IL-6 y el TNF- α contribuyen al estado de inflamación crónica que presentan los pacientes con obesidad y hace que dicho tejido se vuelva resistente a la acción de la insulina. Por otro lado, estos factores estimulan la acción de la triacilglicerol lipasa que activa la lipólisis y aumenta la

liberación de AGLs a partir del adipocito del tejido adiposo visceral. Tanto la hiperinsulinemia como estos AGLs disminuyen la acción en el tejido adiposo de la lipoproteinlipasa. La inhibición de esta enzima tiene dos efectos perjudiciales (72). En primer lugar, se produce un aumento de la producción de Tg y VLDL que se acumulan en el hígado produciendo esteatosis hepática. En segundo lugar, el transporte reverso de los ésteres de colesterol desde el tejido periférico hacia el hígado también está inhibido disminuyendo la concentración de C-HDL (73) (Figura 6)

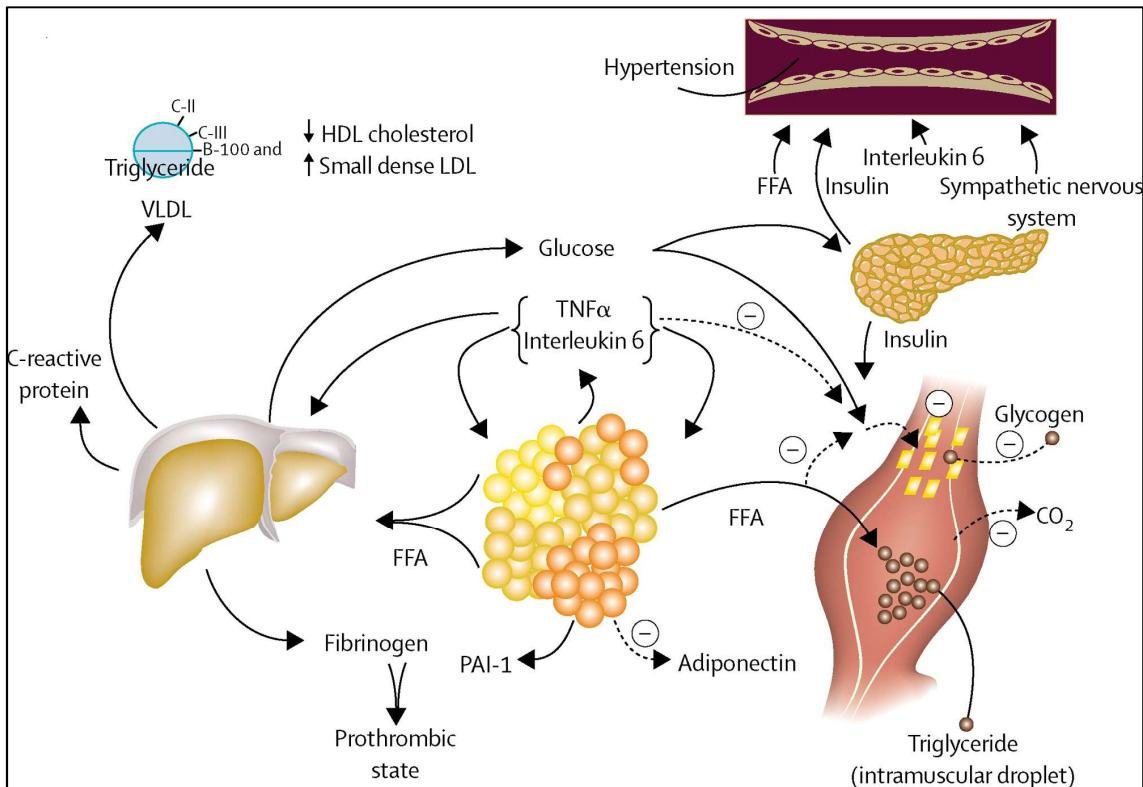


Figura 6. Fisiopatología del Síndrome Metabólico J Am Coll Cardiol . 2017 Dec 19;70(24):2979-2991. doi: 10.1016/j.jacc.2017.10.024. Lancet. 2005 Apr 16-22;365(9468):1415-28. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66378-7.

Todas estas alteraciones derivadas del exceso de grasa visceral convergen en la disfunción endotelial que inducirá el inicio del proceso de aterogénesis. Por eso los pacientes con SM son clasificados de riesgo elevado. En los primeros estadios de la enfermedad, la principal diana terapéutica es disminuir el tejido adiposo que ha originado el desorden metabólico, mediante la restricción calórica de la dieta y el ejercicio moderado (4).

3.1.1 Etiología de la dislipemia aterogénica

La DA se presenta en los individuos con obesidad y tiene su origen en un exceso del tejido adiposo que desencadena todas las alteraciones lipídicas interrelacionadas que se conocen como la triada lipídica y que desembocarán en la formación de la placa de ateroma.

La inactividad física y la ingesta de una dieta aterogénica genera un desequilibrio entre el aporte y la oxidación de los ácidos grasos (AG) lo que produce un aumento del tamaño del tejido adiposo. Este tejido actúa a su vez como fuente continua de AGLs que se acumulan en el hígado provocando esteatosis hepática y manteniendo concentraciones elevadas de Tg (69). Esta situación se agrava en el estado postprandial dando lugar a un rápido incremento de la concentración de lipoproteínas remanentes.

Estas lipoproteínas aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno aumentando la permeabilidad vascular y promoviendo la adhesión de leucocitos. También tienen efectos procoagulantes aumentando la agregación plaquetaria por medio de la activación del complejo protrombinasa y la expresión endotelial del factor tisular (74).

Debido a la mayor producción de VLDL las vías de eliminación de estas lipoproteínas no son tan efectivas y como consecuencia permanecen más tiempo en el torrente sanguíneo. En estas condiciones las lipoproteínas remanentes se van empobreciendo de Tg y enriqueciendo de colesterol, disminuyendo de tamaño. Las VLDL más aterogénicas con un menor tamaño y mayor proporción de colesterol pueden atravesar la íntima media donde son fagocitadas por los macrófagos, sin necesidad de oxidación previa como las LDL. Se generan en este proceso células espumosas que desencadenan la formación de la placa de ateroma además de contribuir a una situación de inflamación generalizada.

Durante todo el tiempo que las VLDL están en la circulación, la actividad de la proteína transportadora de esteres de colesterol (CEPT) se ve incrementada. Esta proteína aumenta el intercambio de esteres de colesterol entre las lipoproteínas ricas en Tg y las lipoproteínas HDL y LDL. En este proceso se producen partículas LDL y HDL con una mayor proporción de Tg. Aunque las lipoproteínas LDL y HDL no son el sustrato de la lipasa hepática en situación fisiológicas, debido a su alto contenido en Tg son hidrolizadas por esta enzima convirtiéndose en partículas LDL y HDL de menor tamaño (73).

Las partículas sdLDL son más aterogénicas. Debido a su pequeño tamaño y elevada densidad se infiltran más fácilmente en el endotelio vascular (41,42). Además, sufren modificaciones en la estructura de la Apo B que alagan su vida media disminuyendo su afinidad por el receptor de

LDL de hígado y aumentando su afinidad por los proteoglicanos de la superficie de la pared arterial. Estas modificaciones también facilitan su oxidación por lo que son más fácilmente reconocidas por macrófagos que gradualmente las convierten en células espumosas que se depositan en la íntima media. Por el contrario, las partículas HDL más pequeñas y densas, la subfracción HDL3, son más inestables y se degradan más rápidamente eliminándose por vía renal. Como consecuencia se obtiene una elevación de la subfracción más aterogénica de las LDL y una mayor degradación de las partículas HDL (75) (Figura 7).

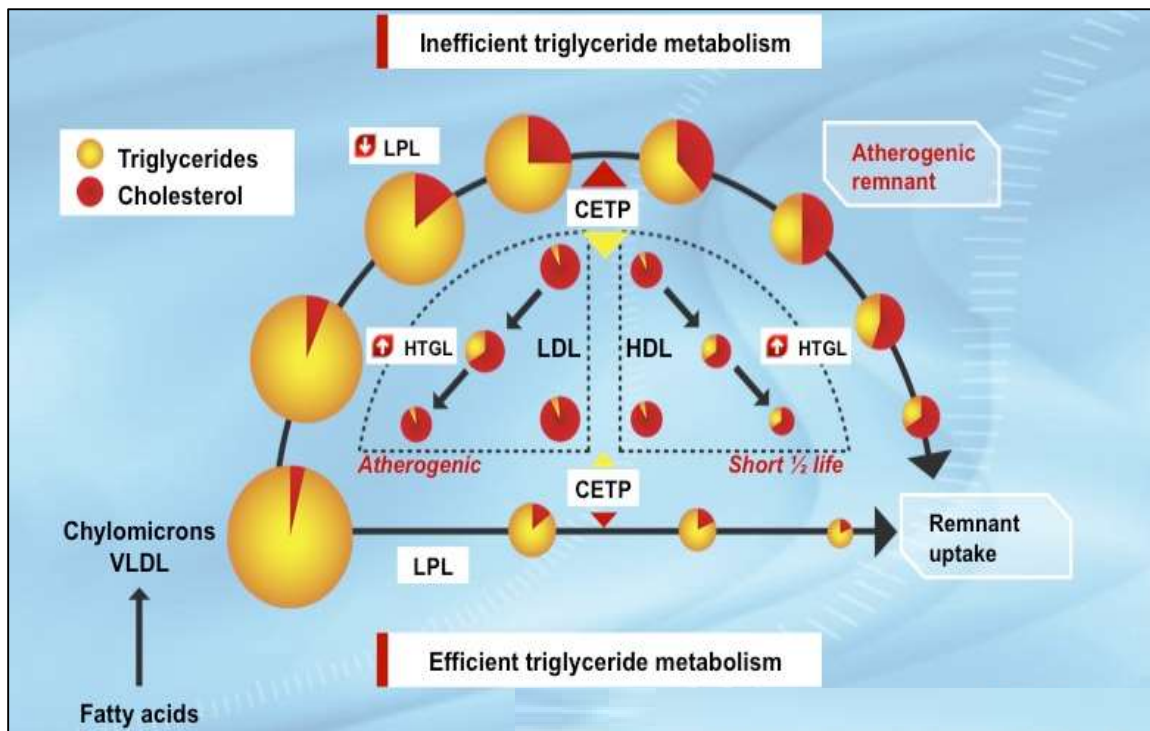


Figura 7. Alteraciones lipídicas en la dislipemia aterogénica. 2017 Dec 19;70(24):2979-2991. doi: 10.1016/j.jacc.2017.10.024. Imagen modificada [The International Chair on Cardiometabolic Risk](http://www.cardiometabolic-risk.org). www.cardiometabolic-risk.org.

Debido a la variabilidad en el contenido de colesterol de las partículas LDL, la concentración de C-LDL no refleja fielmente la cantidad de partículas existentes (LDL-P). Así, una cantidad elevada de LDL-P puede asociarse a concentraciones normales de C-LDL. En esta situación tendríamos un mayor número de partículas sdLDL con un mayor potencial aterogénico. Esta situación está descrita en diversos estudios que han descrito la discordancia entre C-LDL y LDL-P (76). Por tanto, en pacientes con C-LDL normal y LDL-P elevado su RCV estaría infraestimado. Diversos estudios han demostrado que LDL-P muestra mejor asociación con el riesgo de progresión de aterosclerosis y eventos isquémicos que el C-LDL (77) y, de hecho, en pacientes que presentan discordancia, las LDL-P se han propuesto como objetivo terapéutico en lugar de C-LDL.

3.1.2 Dislipemia Aterogénica y Riesgo Cardiovascular Residual

El perfil lipídico característico de la DA es el aumento de la concentración de Tg y de sdLDL y una disminución de C-HDL. Además, los pacientes con DA presentan un exceso de las lipoproteínas remanentes y por tanto de Apo B que está contenida en todas ellas. La concentración de C-LDL no tiene por qué ser elevada, pero sí que dentro de estas lipoproteínas las mayoritarias son las más pequeñas y densas. Este conjunto de alteraciones lipídicas es lo que se denomina riesgo cardiovascular residual (RCVR) de origen lipídico (35).

Debido a la disponibilidad de métodos estandarizados para la determinación de Tg y C-HDL existen numerosos estudios que se han focalizado en demostrar su contribución al RCVR. La evidencia es tan clara con respecto a la asociación de concentraciones bajas de C-HDL con el RCV que las tablas SCORE han presentado una nueva versión de la ecuación en la que se incluye su concentración (78).

Pero la medida única del C-HDL no permite cuantificar el potencial aterogénico global y es necesario incluir la concentración de Tg para una mejor estimación del RCVR sobre todo en pacientes con DM2 (79). En estudios epidemiológicos como Residual Risk Lipids and Standard Therapies (REALIST) se ha demostrado que los Tg y el C-HDL están relacionados con el RCVR en pacientes con síndrome coronario agudo y concentraciones de C-LDL inferior a 3.4 mmol/L (80). También se ha descrito en pacientes con IAM como el RCV se multiplica por 5 cuando se observa un aumento Tg o un descenso del C-HDL, aunque hayan alcanzado valores objetivos de C-LDL (81).

En individuos con elevado RCVR se propone como objetivo terapéutico secundario la concentración de C-No HDL inferior o igual a 2.25 mmol/L (200 mg/dL) ya que ofrece una estimación más global del riesgo cardiovascular residual (1). La DA es un trastorno metabólico que altera la concentración de las lipoproteínas y también su funcionalidad. Por tanto, es necesario evaluar también las diferentes subfracciones de las lipoproteínas HDL y LDL; tamaño, número de partículas y composición. Estos datos permitirían una mejora en la caracterización de la DA y por tanto una mejor clasificación de los pacientes en función de su RCVR.

La intervención sobre el estilo de vida es la primera línea de tratamiento para disminuir el RCVR. Desde el punto de vista farmacológico, los fibratos reducen significativamente el RCV no dependiente de C-LDL, ya que disminuyen la concentración de Tg (82). Esto es consecuencia del efecto del fenofibrato que reduce significativamente la trigliceridemia postprandial gracias a la reducción de las lipoproteínas remanentes de origen intestinal (83).

3.2 Perfil lipídico en la Dislipemia Aterogénica

Actualmente se recomienda la determinación en población general del colesterol total, Tg y de C-HDL antes de los 40 años en hombres y de los 45 años en las mujeres (4). A partir de los resultados de estas magnitudes y de los datos clínicos del paciente se puede calcular el RCV mediante el uso de la función SCORE. Para mejorar la estimación del RCV se debe ampliar el perfil lipídico en los pacientes con otras comorbilidades. En pacientes con DM2 que presenten hipertrigliceridemia se aconseja además del perfil lipídico clásico la determinación de C-No HDL y de Apo B (1). Esta recomendación no es extensible a pacientes con un fenotipo característico de DA que no hayan desarrollado resistencia a la insulina. A pesar de esto, la evidencia científica ha demostrado que la contribución del RCVR al riesgo total en estos pacientes no debería ser subestimada. Por tanto, se deberían ajustar los objetivos terapéuticos en función del RCVR como medida necesaria para reforzar la prevención de la ECV. A pesar de que las guías no incluyen el perfil lipídico avanzado en sus recomendaciones, los pacientes con DA y RCVR elevado se beneficiarían de la caracterización de las lipoproteínas y sus subfracciones. (35)

3.2.1 Perfil lipídico clásico

El perfil lipídico clásico incluye las concentraciones plasmáticas de colesterol total, C-LDL, Tg y C-HDL. La utilidad de estas magnitudes en la práctica clínica para la prevención de la ECV está ampliamente descrita.

El perfil lipídico clásico es el primer abordaje de la ECV en prevención primaria (4). Sin embargo, no es suficiente para la caracterización del RCVR y, por tanto, infraestima el riesgo a asociado a los pacientes con DM o DA (67). Estas patologías se asocian con concentraciones elevadas de Tg y en estas situaciones la concentración de C-LDL no es representativa del RCVR (76). En las guías se recomienda que una vez que se alcanzan los objetivos para la concentración de C-LDL, se deben establecer como objetivos terapéuticos secundarios los correspondientes para Apo B y también para C-No HDL (1).

A pesar de las mejoras que ha supuesto la incorporación de la Apo B y el C-No HDL a la práctica clínica aún hay aspectos del RCVR por resolver. La Apo B puede ser considerada un marcador del número de partículas aterogénicas, ya que cada partícula aterogénica tiene una molécula de Apo B, sin embargo, no aporta información sobre el tipo de partícula, ni tamaño ni composición. Por ello, es frecuente infraestimar el RCV a partir del perfil lipídico convencional (84). Por ese motivo se están estudiando nuevos marcadores de RCV como las diferentes lipoproteínas y sus

subfracciones. Estos resultados completan la información sobre el metabolismo lipídico y permiten una evaluación más completa de la situación clínica de los pacientes.

Métodos de laboratorio I

Actualmente, la mayoría de los laboratorios clínicos disponen en su catálogo de la medición del perfil lipídico clásico. Los sistemas de medida utilizados para su medición cumplen los requerimientos de calidad actuales, se dispone de controles de calidad internos y externos, valores de referencia adecuados y además son practicables facilitando su incorporación a los análisis clínicos rutinarios.

- **Colesterol:** Los laboratorios clínicos emplean comúnmente métodos enzimáticos colorimétricos automatizados. Estos métodos están validados frente al método de referencia de Abell Kendall (85). En la primera fase se hidrolizan todas las formas esterificadas, por tanto, se mide tanto el colesterol libre como el esterificado. Actualmente se dispone de un calibrador trazable a un material de referencia certificado NIST: SRM 911b
- **Triglicéridos:** También se emplean métodos enzimáticos colorimétricos automatizados. Estos métodos están validados frente al método de referencia la espectrometría de masas con dilución isotópica (86). Los triglicéridos se hidrolizan a glicerol y tras varias reacciones enzimáticas se mide la absorbancia del producto final. Los calibradores comercializados son trazables al material de referencia NIST: SRM 1595b.
- **C-HDL:** La molécula de HDL es muy heterogénea con diferentes subfracciones de diferente tamaño y composición, esto dificulta la estandarización de métodos para su medición. Actualmente no se disponen de métodos definitivos para su determinación, pero si de un método de referencia, la ultracentrifugación. Este procedimiento de medida es costoso y con tiempos de análisis largos, por tanto, se han propuesto alternativas adaptables al laboratorio clínico. La mayoría de laboratorios utilizan métodos enzimáticos homogéneos automatizados. Estos métodos se fundamentan en diferentes principios de medida. Todos ellos se basan en la inhibición de la reacción enzimática del colesterol no contenido en las lipoproteínas HDL, de tal manera que solo se mide la absorbancia del producto final procedente del C-HDL. Los actuales métodos comercializados están validados frente al método de referencia. Actualmente no se dispone de ningún material de referencia primario certificado por tanto se utiliza un material de referencia secundario para la preparación de los calibradores (87).

- C-LDL: Al igual que el HDL la molécula de LDL es muy heterogénea y no existen métodos compatibles con la rutina del laboratorio clínico que cumplan las especificaciones de calidad. Existen diversos test enzimáticos pero las principales sociedades científicas también recomiendan su cálculo mediante la fórmula de Friedewall: $C\text{-LDL (mmol/L)} = \text{Colesterol (mmol/L)} - (\text{C-HDL (mmol/L)} + \text{Tg (mmol/L)} / 2.21)$. Esta fórmula asume que existe una proporción constante de colesterol en las partículas VLDL y no contempla situaciones con exceso de partículas remanentes. Esta fórmula infraestima la concentración de C-LDL cuando la concentración de Tg es superior a 2,3 mmol/L (400 mg/dL). Cuando se supera dicha concentración de Tg se recomienda la determinación de C-No HDL y de Apo B (1).
- C-No HDL: Es una estimación del colesterol de todas las lipoproteínas aterogénicas. Se obtiene restando el C-HDL del colesterol total. Su ventaja es que no presenta ninguna de las limitaciones del cálculo de C-LDL por tanto se puede estimar si Tg es superior a 2,3 mmol/L (400 mg/dL).
- Apo B: Los métodos más utilizados en los laboratorios clínicos son totalmente automatizables y están basados en la inmunonefelometría o la inmunturbidimetría. Estos métodos emplean anticuerpos anti-Apo B y aunque no existen métodos de referencia, se han estandarizado con materiales trazables a un patrón de calibración universal (OMS/IFCC SP3-07). Los métodos comercializados cumplen los criterios de calidad requeridos por la OMS y la IFCC. (88)

3.2.2 Perfil lipídico avanzado

En el caso de la DA existen una serie de alteraciones lipídicas que afectan a la síntesis de las diferentes lipoproteínas no únicamente a su concentración sino también a su composición y características. Como ya se ha visto, el aumento de la concentración de Tg favorece la formación de un mayor número de partículas VLDL (VLDL-P) con un aumento de la proporción de las de tamaño más grande, las VLDL grandes (IVLDL-P). Estas partículas en el hígado darán lugar a un mayor número de partículas LDL (LDL-P) y HDL (HDL-P) con un mayor contenido de Tg. La lipasa hepática actuará sobre ellas produciendo sdLDL y HDL pequeñas (sHDL) que son muy inestables y se degradan fácilmente (73, 75) (Figura 7). Actualmente el perfil lipídico clásico no aporta información suficiente para poder describir todas estas alteraciones del metabolismo lipídico que presentan los individuos con DA (84). Por tanto, para poder comprender y prevenir mejor la DA es necesario cuantificar las diferentes subclases lipoproteicas y evaluar su potencial como marcadores del RCVR.

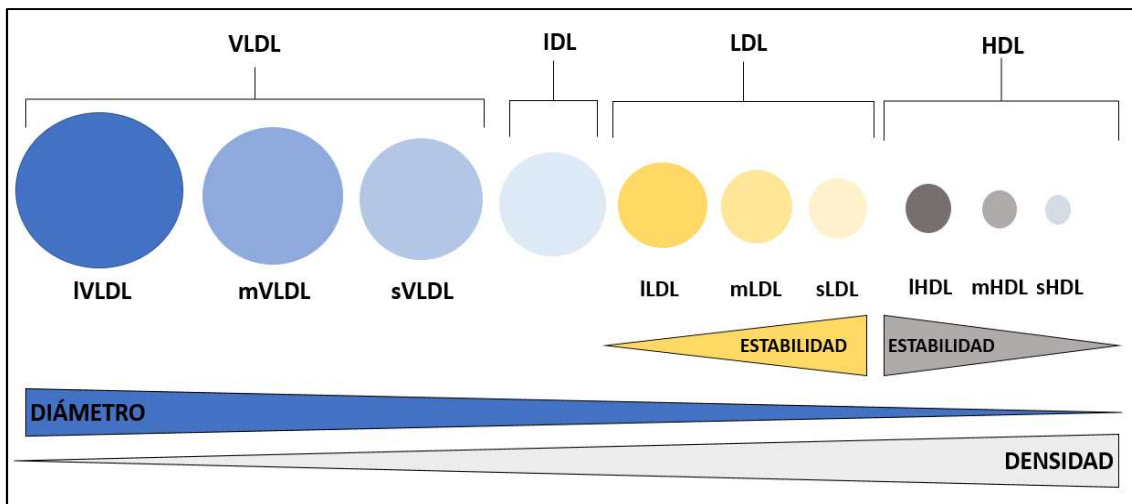


Figura 7. Perfil lipoproteico avanzado. Lipoproteínas y sus subclases en función de su diámetro y densidad. Figura de producción propia

La evidencia científica ha demostrado cómo condicionan las diferentes subfracciones lipoproteicas a la aterogénesis siendo las de mayor potencial aterogénico las partículas sdLDL (40). Se ha descrito como C-sdLDL se relaciona con un mayor RCV y con el engrosamiento de la íntima media (41). Se ha demostrado que el C-sdLDL es predictor a 5 años de la progresión de la placa de la carótida independientemente de otros FRCV (42). También se han presentado estudios en los que se relacionan concentraciones elevadas de colesterol en estas partículas con una mayor incidencia de eventos isquémicos prematuros (77).

Con respecto a las LDL-P, se ha demostrado que es un mejor indicador del RCV en individuos que han alcanzado concentraciones objetivo de C-LDL (89). La sociedad Americana de Diabetes recomienda guiar la terapia en función de LDL-P en lugar de C-LDL, después de que se demostrase que las terapias orientadas según LDL-P eran más efectivas para disminuir la incidencia de la ECV (68). Actualmente se ha establecido como valor objetivo de LDL-P la concentración de 1000 nmol/L. De entre sus subfracciones, las sLDL se han presentado como un factor independiente de RCV (73).

A pesar de que las investigaciones se han centrado sobre todo en el LDL y sus subfracciones, recientes publicaciones han presentado datos prometedores sobre la relación entre HDL y el RCV. En algunos estudios se demuestra que HDL-P está inversamente relacionado con la mortalidad asociada a la ECV (90, 91) y una mayor proporción de Tg en las HDL (Tg-HDL) está directamente relacionado con la progresión de la placa de ateroma (92). Por último, se ha demostrado que las fracciones más pequeñas de HDL (sHDL) y las más grandes (IHDL) se asocian positiva y negativamente con la extensión de la placa de ateroma establecida por angiografía (93).

Métodos de laboratorio II

La ultracentrifugación con gradiente de densidad es la técnica de referencia para la separación y cuantificación de las lipoproteínas. Se separan en función de sus densidades y se determina la concentración de los distintos lípidos en cada una de estas fracciones. Sin embargo, es un método muy laborioso con tiempos de análisis largos, lo cual se traduce en un elevado coste y en una falta de viabilidad para los laboratorios de análisis clínicos con un gran volumen de muestras (94). Se continúa empleando en los laboratorios de lípidos para medir las VLDL, pero aplicar esta metodología a gran escala no es posible por los largos tiempos de ejecución y costes.

Como alternativa, se han publicado métodos que utilizan surfactantes para facilitar la precipitación de las lipoproteínas sin necesidad de utilizar una ultracentrífuga. El grupo de investigación de Hirano, publicó un método de precipitación que permitía la separación de las sdLDL y la posterior cuantificación del colesterol contenido en las mismas (95). Este método utiliza como surfactante heparina de magnesio. Tras la incubación y centrifugación de la muestra se consigue precipitar las lipoproteínas con una densidad inferior a 1.044 g/mL. Por tanto, el sobrenadante contiene las partículas HDL y sdLDL. La concentración C-sdLDL se puede estimar mediante la diferencia entre la concentración de colesterol total y la concentración de C-HDL medidos en el sobrenadante. Este método es económico y adaptable a cualquier laboratorio clínico por tanto es una opción adecuada para poder estimar el RCVR mediante el colesterol contenido en las sdLDL.

De forma adicional, nuevas técnicas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) han permitido avanzar en la caracterización del perfil lipoproteico, aportando información sobre la composición y número de partículas de las diferentes lipoproteínas y sus subfracciones. La RMN mide la frecuencia de resonancia de los grupos metilos del colesterol esterificado y los Tg contenidos en las lipoproteínas. Esta frecuencia de resonancia depende del entorno químico de cada grupo metilo. Al aumentar la complejidad y tamaño de la lipoproteína la densidad electrónica en torno a los hidrógenos de los grupos metileno (CH₂) y metilo (CH₃) es mayor y necesitan un pulso de frecuencias mayor para vibrar. Por tanto, en el espectro de frecuencias de la RMN se representan como señales que resuenan a campos magnéticos mayores frente a las lipoproteínas de menor tamaño y complejidad. El resultado final es un espectro que nos permite identificar y cuantificar las diferentes lipoproteínas y sus subfracciones (96,97).

Actualmente hay disponibles dos aplicaciones de esta técnica, LipoProfile® Blood Test y una nueva versión más avanzada que se basa en la RMN en 2 dimensiones, el test Liposcale®. Este

método mide la atenuación de las señales de los picos lipídicos cuando están sometidos a un gradiente de campo magnético conocido. La diferencia en la atenuación de las señales se asocia a una difusión de las partículas lipoproteicas diferencial (Diffusion Ordered Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy [DOSY-NMR]). Del estudio DOSY-RMN bidimensional se pueden conocer las características hidrodinámicas de las moléculas, como el coeficiente de difusión asociado a cada subclase de lipoproteína. A través de la ecuación de Stokes-Einstein y de los coeficientes de difusión se calculan directamente los tamaños de las diferentes subfracciones. A partir de las medidas del tamaño se pueden calcular finalmente el número de partículas dividiendo el volumen espacial de las moléculas de lípidos totales por el volumen medio (97). Este análisis aporta información sobre la concentración del número de partículas de las lipoproteínas VLDL, LDL y HDL y sus subfracciones, pequeñas, medianas y grandes (sVLDL, mVLDL, IVLDL, sLDL, mLDL, ILDL, sHDL, mHDL, IHDL). También determina el diámetro medio de cada lipoproteína y el contenido en Tg y colesterol de las lipoproteínas: IDL, VLDL, LDL y HDL, pero no determina la composición de sus subfracciones (97) (Figura 8).

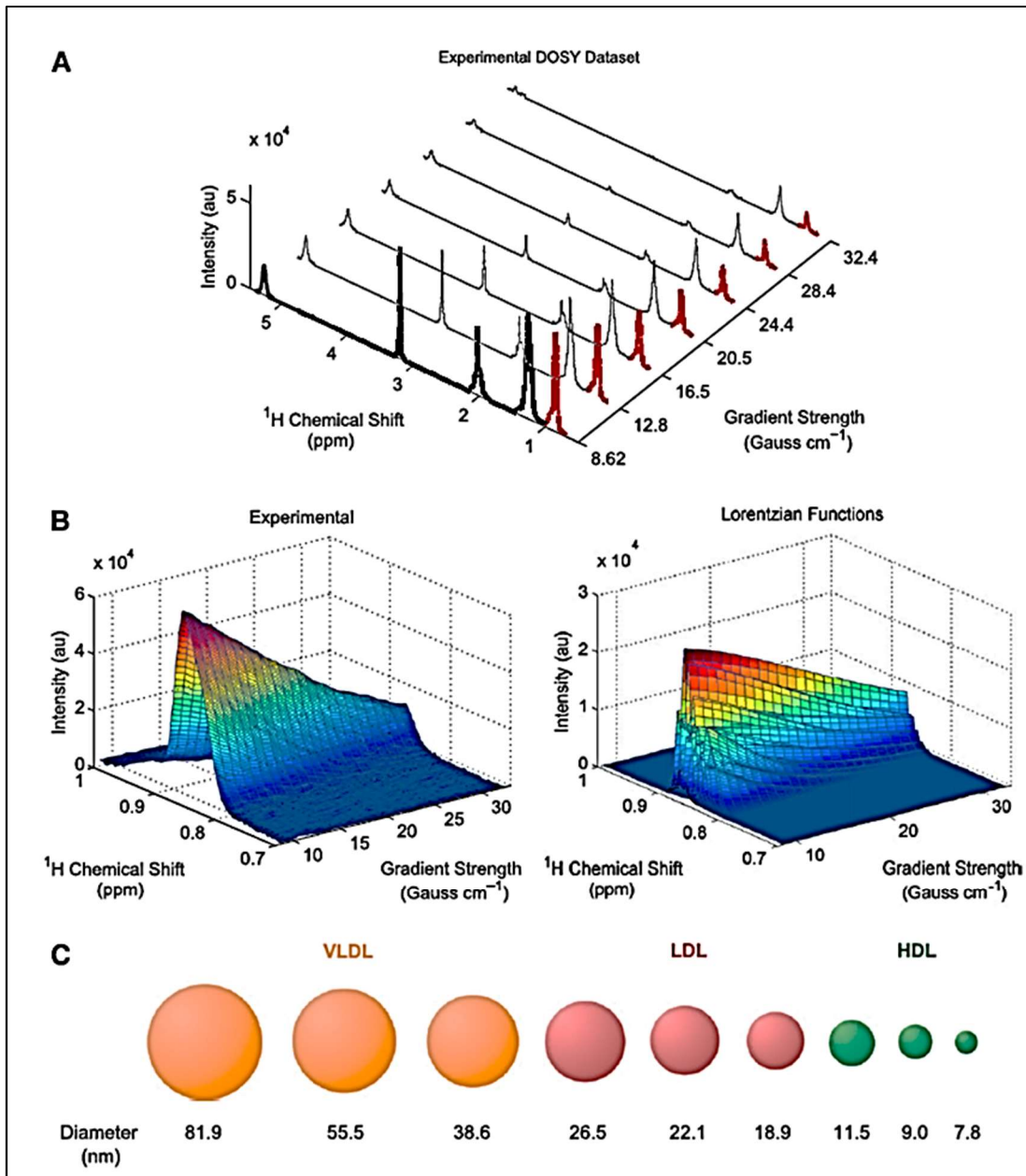


Figura 8. Descripción Liposcale® test. A: Espectro DOSY-RMN bidimensional. B: Atenuación experimental de la señal de RMN del metilo (izquierda) y las nueve funciones de RMN utilizadas para ajustar la superficie (derecha). C: A partir de cada una de estas funciones se determinan las partículas VLDL, LDL y HDL grandes, medianas y pequeñas.

Este sistema de medida se ha validado y ha demostrado una elevada correlación con la información sobre el tamaño de las partículas obtenida mediante el método de referencia. Actualmente esta tecnología no está disponible para su incorporación en los laboratorios clínicos, pero existen plataformas automatizadas que permitirían la externalización de estas determinaciones en pacientes con sospecha de RCVR elevado (97).

4. ATEROSCLEROSIS Y EVENTOS ISQUÉMICOS PREMATUROS

4.1 Actualización

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que se caracteriza por el engrosamiento de la íntima media que acaba en la formación de la placa de ateroma. La rotura de la placa de ateroma provoca la formación de un trombo en su superficie, produciendo isquemia o necrosis en la arteria afectada. Las principales guías proponen estrategias basadas en la detección y tratamiento de los FRCV clásicos, pero a pesar de las medidas adoptadas los eventos isquémicos siguen ocurriendo (98).

La enfermedad aterosclerótica comprende un largo período asintomático que se define como arterosclerosis subclínica. Frecuentemente, se detecta en una etapa avanzada o después de un evento cardiovascular, siendo la principal causa de los eventos isquémicos prematuros. En adultos jóvenes, después del evento, el riesgo de desarrollar una enfermedad coronaria crónica se incrementa y tienen un mayor riesgo de sufrir nuevos eventos coronarios. Por lo tanto, es necesario identificar la enfermedad en prevención primaria y así disminuir la morbimortalidad cardiovascular (99).

El estudio MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) investigó en individuos de mediana edad asintomáticos la presencia de aterosclerosis en la carótida, territorios aórticos, coronarios e iliofemorales utilizando técnicas de imagen no invasivas. Los resultados demostraron la presencia de aterosclerosis subclínica en pacientes sin FRCV clásicos y con concentraciones de LDL-C inferior a 1,8 mmol/L (70 mg/dL) (34). Por tanto, las actuales estrategias para la prevención de la ECV basadas en los FRCV clásicos no son efectivas en poblaciones de bajo riesgo. Otra publicación derivada del mismo estudio evaluó la progresión de la placa de ateroma en estos individuos a los 3 años. Se presentó un modelo predictivo para determinar qué factores promovían la extensión de la arterosclerosis y de todos los FRCV incluidos, la dislipemia era el que más contribuía al modelo (63). En consecuencia, un mayor conocimiento de las alteraciones lipídicas que subyacen detrás de los eventos isquémicos precoces ayudaría a mejorar su prevención.

Actualmente los eventos isquémicos se relacionan en población joven con hábitos poco saludables como el tabaquismo, el consumo de alcohol y sustancias tóxicas y la obesidad (100). También es importante considerar el factor hereditario de algunas dislipemias y por tanto se deben estudiar los casos con un familiar de primer grado que ha presentado un evento isquémico prematuro. En el estudio Framingham se demostró que la mayoría de pacientes con

enfermedad coronaria prematura presentaban una dislipemia de carácter familiar siendo las más frecuentes el exceso de Lp(a) y las relacionadas con alteraciones primarias en la concentración de Tg y C-HDL (hipertrigliceridemia e hipoalfalipoproteinemia) (101)

En España, la Sociedad Española de Arteriosclerosis está llevando a cabo un estudio para establecer nuevos FRCV en pacientes con enfermedad cardiovascular prematura (PRESARV). Los primeros resultados de este estudio han demostrado la relación entre C-sdLDL y Tg-HDL con el riesgo de ECV prematura (102).

4.2 Alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas

El proceso de aterogénesis comienza en la infancia, pero hay determinados factores que promueven la rápida progresión de la placa de ateroma. Los FRCV clásicos subyacen a este proceso y favorecen las alteraciones metabólicas que convergen en la formación de la placa de ateroma (10).

La evidencia ha demostrado que las concentraciones elevadas de C-LDL son las principales causantes de la aterogénesis, pero estas lipoproteínas son un grupo muy heterogéneo y no todas las subfracciones contribuyen de la misma manera a este proceso. En el estudio Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) se demostró por primera vez la importancia de su fracción más pequeña y densa en la progresión de la íntima media. A partir de ese momento nuevas investigaciones se centraron en descubrir las alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas que favorecían la síntesis de las sdLDL (103). Actualmente, las concentraciones elevadas de Tg se presentan como el principal desencadenante de las alteraciones metabólicas que subyacen a la formación de las sdLDL. Estas a su vez se relacionan por la misma ruta metabólica con una disminución de la concentración de C-HDL debido a la formación de sHDL que se degradan fácilmente (35).

A pesar de que los eventos isquémicos precoces no tienen por qué ocurrir en individuos con un fenotipo característico de DA, las alteraciones lipídicas subyacentes son similares. Se han detectado mutaciones que producen una disminución de la concentración de C-HDL y un aumento de la concentración de Tg en individuos con isquemia prematura (101). Aunque la causa primaria de estas alteraciones en la DA es la obesidad y en los pacientes con enfermedad coronaria precoz son alteraciones genéticas, el resultado es el mismo. Por tanto, no se debe subestimar el papel de los Tg y el C-HDL en el RCV ya que se ha demostrado su relación con alteraciones lipoproteicas que se asocian a un mayor riesgo de arteriosclerosis.

4.3 Riesgo cardiovascular residual e isquemia prematura

En individuos tratados con estatinas que han alcanzado los valores diana de C-LDL existe un RCVR que provoca que los eventos isquémicos prematuros se sigan sucediendo (33,34). En el caso de la DA ya se ha descrito la contribución del C-HDL, Tg y de las fracciones de las LDL al RCVR, pero en la enfermedad cardiovascular prematura no han sido bien definidas.

Al igual que en la DA, se cree que existe un desequilibrio entre las lipoproteínas proaterogénicas que contienen Apo B y las lipoproteínas antiaterogénicas que contienen Apo A, las HDL (67). Se ha descrito que determinados factores genéticos puede ser la causa de estas alteraciones en individuos sin otros FRCV (101). Sin embargo, hay individuos que presentan obesidad además de hábitos de vida perjudiciales, como consumo de alcohol y tabaco (100), que pueden presentar un fenotipo similar a la DA no diagnosticado y, por tanto, las mismas alteraciones lipídicas.

Las limitaciones en la prevención de la enfermedad cardiovascular prematura son debidas al desconocimiento de los principales factores que subyacen a esta patología. Se debería llevar a cabo un mayor esfuerzo para comprender la etiopatogenia de esta enfermedad. El conocimiento de las alteraciones en el perfil lipídico avanzado asociadas a la enfermedad coronaria precoz permitirían una mejor comprensión y prevención de los eventos isquémicos prematuros.

5. IMPACTO DEL ESTILO DE VIDA EN LA REDUCCIÓN DEL RIESGO CARDIOVASCULAR

5.1 Actualización

El estilo de vida incluye factores externos que pueden modular e influir en la salud. Entre ellos se incluyen factores socioeconómicos, ambientales, tabaquismo, dieta y actividad física. En este apartado se discutirán aspectos relacionados con el tabaquismo, la actividad física y la dieta debido a su gran importancia en el desarrollo de la ECV.

A pesar de que en la guía EAS 2019 se dedica una sección a recomendaciones sobre el estilo de vida, los niveles de evidencia que se han conseguido están lejos de los presentados con los ensayos clínicos con fármacos. Los estudios de intervención en los estilos de vida sobre objetivos primarios clínicos son escasos. Uno de los más relevantes es el estudio PREDIMED, un ensayo clínico que evaluó la relación entre la dieta mediterránea y el RCV. Pero la mayoría de recomendaciones se basan en estudios de tipo observacional debido a las dificultades que supone la estandarización de la dieta y la recogida de datos.

- **Actividad física**

La actividad física regular y mantenida protege frente a la aparición de las ECV. En las guías ESC/EAS de 2019 se recomienda realizar ejercicio aeróbico moderado de 30 a 60 minutos al día. Realizar ejercicio equivalente a caminar a paso ligero 25 Km a la semana demostró aumentar el C-HDL de 0.08 a 0.15 mmol/L (3.1 a 6 mg/dL) (1).

- **Tabaquismo**

Dejar de fumar tiene claros beneficios con respecto al RCV general, y específicamente aumentando la concentración de C-HDL (29,30).

- **Dieta**

La dieta influye en el desarrollo de las ECV, ya sea directamente o mediante su acción sobre otros FRCV como la PA y las concentraciones séricas de lípidos y glucosa. Diversos estudios han demostrado la relación entre diferentes nutrientes y las concentraciones de lípidos (104).

Los ácidos grasos saturados (AGS) se relacionan con un aumento de la concentración de C-LDL, cada incremento en un 1% de AGS de la dieta supone un aumento de 0,02 a 0,04 mmol/L de C-LDL (105). Los AGS trans presentes en las margarinas también disminuyen la concentración de C-HDL. Sin embargo, los Ácidos Grasos Monosaturados (AGM) han demostrado disminuir el C-LDL, pero únicamente el aceite de oliva virgen ha demostrado tener efectos directos sobre la morbimortalidad asociada a la ECV (106). Este efecto se cree que se debe a los compuestos fenólicos como la oleuropeina y el hidroxitirosol que no están presentes en el resto de aceites debido al proceso de refinamiento (107).

Las concentraciones de Tg se ven aumentadas debido al consumo de alcohol y dietas ricas en hidratos de carbono y fructosa (1). Este efecto no se observa en el caso de hidratos de carbono ricos en fibra. En estudios sobre el efecto directo de los hidratos de carbono en la incidencia de la ECV se ha demostrado que las dietas bajas en carbohidratos no están asociadas con una menor prevalencia de enfermedad aterosclerótica (108).

En las actuales guías se recomienda evitar el consumo de AGS trans y que la mayoría de las grasas consumidas sean AGM, preferiblemente provenientes del aceite virgen de oliva. El consumo de grasas debería representar menos del 10% del aporte calórico diario. Ingestas muy bajas de grasas pueden contribuir a la reducción del C-HDL. y al déficit de vitamina E con efectos antioxidantes. El consumo de hidratos de carbono se recomienda que se encuentre entre el 45-

55% del total de calorías diarias. Se aconseja que mayoritariamente provengan de alimentos ricos en fibra presentes en legumbres, frutas, vegetales y cereales integrales. Se recomienda que el aporte de proteínas de la dieta provenga de productos lácteos bajos en grasa, aves de corral, pescado, marisco y frutos secos. Se limita la ingesta de carnes rojas, dulces y bebidas azucaradas. Se debe evitar el consumo de azúcares que no provengan de frutas o productos lácteos. El consumo de alcohol está restringido en individuos con hipertrigliceridemia y en población general debe ser inferior a 10 g /día. Este patrón dietético debe ser ajustado a los requisitos calóricos de cada individuo y a las preferencias alimentarias y culturales (1, 27).

Además de las recomendaciones generales de la dieta existen determinados nutrientes que se encuentran en suplementos alimentarios que reducen el RCV (1).

- Fitoesteroles: Son esteroides vegetales presentes en aceites vegetales, frutos secos y legumbres. El consumo de 2 g de fitoesteroides disminuye el C-LDL de un 7 al 10%.
- Monacolina K y levadura roja del arroz: Al igual que las estatinas inhiben la acción de la HMG-CoA reductasa. Se ha demostrado en ensayos clínicos el efecto de la monacolina en la reducción de hasta el 20% la concentración de colesterol y hasta del 45% de los eventos cardiovasculares. A pesar de estos datos se recomienda una mejor regulación en la producción de estos suplementos alimentarios.
- Fibra: El β -glucano es una fibra viscosa que está presente en la avena y la cebada y ha demostrado reducir la concentración de colesterol total y C-LDL.
- Soja: La soja contiene isoflavonas y fitoestrógenos que reducen la concentración de colesterol, pero su contenido disminuye con el procesamiento de la soja para consumo humano.
- Ácidos grasos poliinsaturados N-3: Reducen la concentración de Tg al alrededor del 30% y también reducen la respuesta lipémica postprandial, pero una dosis mayor de 2-4 g/día puede aumentar el C-LDL.

Además de las recomendaciones generales sobre hábitos alimentarios saludables, se han estudiado diferentes patrones dietéticos y su relación con los FRCV y la ECV (104). Las principales dietas y sus efectos en el RCV y la ECV se resumen en la tabla 3. Todas incluyen en sus recomendaciones la actividad física moderada.

DIETA	RECOMENDACIÓN CARACTERÍSTICA	RECOMENDACIONES GENERALES	EFFECTOS FRCV	EFFECTOS ECV
DASH	Reducción del sodio procedente de la dieta	<ul style="list-style-type: none"> - Consumo regular: Vegetales, frutas y productos lácteos bajos en grasa. - Consumo moderado: pescado, aves y frutos secos. - Consumo restringido: Grasas saturadas, carnes rojas, y alimentos procesados: bebidas azucaradas. 	<p>PA ↓</p> <p>Colesterol total ↓</p> <p>C-LDL ↓</p>	<p>DM2 ↓</p> <p>ECV ↓</p> <p>Eventos isquémicos ↓</p> <p>Mortalidad ↓</p>
MEDITERRÁNEA	Consumo de aceite de oliva y frutos secos	<ul style="list-style-type: none"> - Consumo regular: Verduras, frutas, cereales integrales, legumbres y frutos secos - Consumo moderado: pescado, aves, lácteos y vino - Consumo restringido: Carnes rojas, y alimentos procesados: bebidas azucaradas. 	<p>PA ↓</p> <p>Tg ↓</p> <p>C-LDL ↓</p> <p>Colesterol total ↓</p>	<p>DM2 ↓</p> <p>ECV ↓</p> <p>Mortalidad ↓</p> <p>Eventos isquémicos ↓</p>
ATLÁNTICA	Consumo de pescados	<ul style="list-style-type: none"> - Consumo regular: Hortalizas, frutas cereales, patatas, legumbres, lácteos bajos en grasa, pescado, mariscos y aceite de oliva - Consumo moderado: carnes magras y huevos. 	<p>C-LDL ↓</p> <p>Colesterol total ↓</p>	No hay estudios
NÓRDICA	Consumo de pescados y mariscos y aceite de colza.	<ul style="list-style-type: none"> - Consumo regular: frutas, bayas, vegetales, legumbres, patatas, cereales integrales, pescado, mariscos, productos lácteos bajos en grasa, y aceite de colza. - Consumo moderado: carne de caza, huevos, queso y yogurt - Consumo restringido: Carnes rojas, y alimentos procesados: bebidas azucaradas. 	<p>PA ↓</p> <p>C-LDL ↓</p> <p>Colesterol total ↓</p>	No se han descrito relaciones estadísticamente significativas

PORTFOLIO	Consumo de 4 alimentos que han demostrado reducir el colesterol	<ul style="list-style-type: none"> - Restricción calórica 2000 kcal/día. - 42 g de frutos secos. - 50 gramos proteína vegetal de soja o legumbres. - 20 g de fibra soluble viscosa de avena o cebada. - 2 g de esteroles vegetales. 	PA ↓ Tg ↓ C-LDL ↓ Colesterol total ↓ C-No HDL ↓ Apo B ↓	Mortalidad ECV ↓ (*)
VEGETARIANA	No consumo de proteína animal	Consumo exclusivo de frutas, verduras, legumbres y cereales integrales.	PA ↓ C-LDL ↓ C-No HDL ↓	Mortalidad ECV ↓ (*)

Tabla 3. Resumen de las características de las principales dietas y su efecto sobre las lipoproteínas el RCV y la mortalidad o eventos CV. Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) (109); Dieta Mediterránea (110); Dieta Atlántica (111); Dieta Nórdica (112,113); Dieta Portfolio (114); Dieta Vegetariana (115). Presión Arterial (PA); (*) Nivel de evidencia muy bajo.

DIETAS Y SUS RECOMENDACIONES NUTRICIONALES

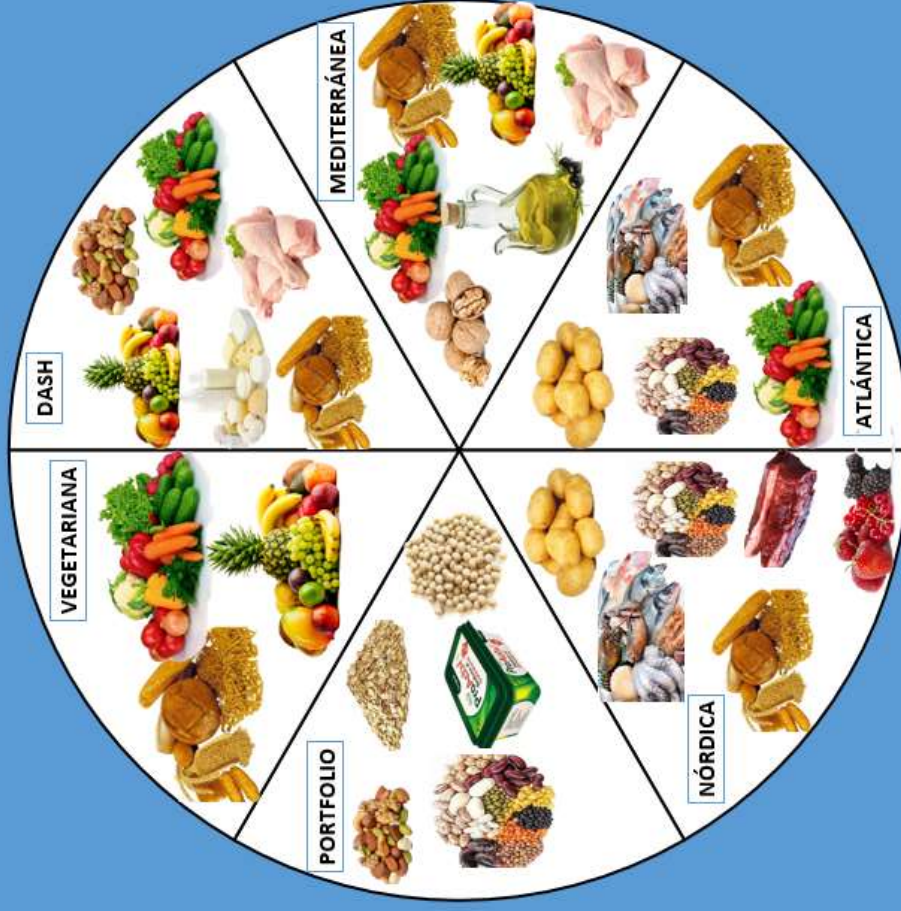


Figura 8. Alimentos recomendados por las principales dietas. Figura de producción propia

5.2 Dieta mediterránea y reducción del riesgo cardiovascular

5.2.1 PREDIMED

El estudio PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) es un ensayo clínico aleatorizado de los efectos de la dieta mediterránea (MedDiet) sin restricción calórica sobre la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular. Se evaluó la MedDiet suplementada con aceite de oliva o con frutos secos y se observó que disminuía las complicaciones de la ECV frente a una dieta hipocalórica. Además, se estudió su efecto en sobre la mortalidad global e incidencia de insuficiencia cardíaca, diabetes, cáncer, deterioro cognitivo y otras enfermedades neuro-degenerativas.

Los participantes del estudio fueron hombres (de 55 a 80 años) y mujeres (de 60 a 80 años) con DM2 o tres FRCV. Ninguno de los participantes presentaba ningún síntoma de ECV cardiovascular al inicio del estudio y se siguieron durante 5 años. Todos ellos fueron aleatorizados a uno de los tres grupos de intervención:

- Grupo control: formado por individuos que no reciben ningún tipo de educación sobre MedDiet y se les aconseja seguir una dieta hipocalórica.
- 2 Grupos de intervención: Uno con MedDiet suplementada con aceite de oliva virgen extra (5 cucharadas soperas al día) y otro con frutos secos (30 g al día).

Para valorar la adhesión a la MedDiet en la visita basal y en cada uno de los seguimientos se realizó un cuestionario de 14 puntos.

Los resultados publicados demostraron que la MedDiet enriquecida con frutos secos y aceite de oliva reducen en un 30% el riesgo de IAM, de ACV o de muerte por causa cardiovascular (106).

A partir de la base de datos recogida y con las muestras biológicas almacenadas durante el estudio PREDIMED, se ha podido seguir investigando y publicando nuevos resultados que demuestran los beneficios de la MedDiet. Se han demostrado sus beneficios en la prevención primaria del cáncer de mama (116) entre otros. También se ha demostrado su relación con la mejora en la capacidad de eflujo e incremento de la actividad paraoxonase-1 en las HDL (117). En 2020 también se publicó la respuesta de la impronta metabólica a la MedDiet y su relación con la disminución del RCV independientemente de otros FRCV (118).

5.2.2 PREDIMED PLUS

Después de comprobar la efectividad de la MedDiet, mediante el estudio PREDIMED-PLUS se planteó evaluar el efecto de la terapia conductual y la restricción calórica en la disminución de la morbimortalidad cardiovascular. El objetivo principal de este estudio es determinar el efecto sobre los eventos cardiovasculares de una intervención intensiva de pérdida de peso basada en un patrón de MedDiet hipocalórica, actividad física y terapia conductual versus MedDiet y los cuidados sanitarios habituales para la prevención cardiovascular.

Este estudio incluyó a individuos de prevención primaria, hombres de 55-75 años y mujeres de entre 60-75 años, con un IMC ≥ 27 y < 40 kg/m², que cumplen al menos 3 criterios de SM. Los participantes fueron aleatorizados en una proporción 1:1 a un grupo control o a un grupo de intervención intensiva sobre el estilo de vida. La intervención se mantuvo durante 6 años, con un seguimiento medio de 8 años para eventos clínicos. En cada visita se evaluarán los hábitos alimentarios e ingesta dietética mediante un cuestionario de 17 ítems de adhesión a una dieta mediterránea hipocalórica en el grupo intensivo. Se otorga un punto por cada objetivo que se cumpla:

1. Uso culinario exclusivo de aceite de oliva virgen (exclusivamente de la variedad extra virgen) para cocinar, aderezar ensaladas y para untar.
2. Consumo de frutas ≥ 3 piezas por día.
3. Consumo de verduras y hortalizas ≥ 2 raciones/día (por lo menos una de ellas en forma de ensalada).
4. Reducción del consumo de pan blanco a ≤ 1 ración / día (1 ración = 75 g).
5. Consumo de cereales y pasta integrales ≥ 5 veces por semana.
6. Consumir ≤ 1 ración (una ración = 100-150 g) de carne roja, hamburguesas o productos cárnicos (jamón, salchichas, etc.) por semana.
7. Consumir < 1 porción de mantequilla o de nata a la semana (1 ración = 12 g).
8. Consumir < 1 bebida azucarada o zumo de fruta con azúcar añadido por semana.
9. Consumir ≥ 3 raciones/semana de legumbres (1 ración = 150 g).
10. Consumir ≥ 3 raciones/semana de pescado o mariscos (1 ración: 100-150 g de pescado, o 4-5 unidades o 200 g de marisco).

11. Consumir < 3 unidades/semanas dulces, postres dulces, tales como pasteles, galletas, bizcochos o natillas.
12. Consumir ≥ 3 raciones/semana de frutos secos (cacahuetes incluidos) a la semana (1 ración = 30 g).
13. Consumir pollo, pavo o carne de conejo en lugar de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas.
14. Usar sofrito ≥ 2 veces/semana (salsa hecha con tomate y cebolla, puerros o ajo, a fuego lento, con aceite de oliva).
15. No añadir azúcar a las bebidas (café, té), sino que se sustituirá por edulcorantes no calóricos artificiales.
16. Reducir el consumo de pasta o arroz a menos de tres raciones por semana (a no ser que se trate de productos integrales).
17. Beber los hombres entre 2-3 vasos (200 mL) de vino al día, y las mujeres entre 1-2 vasos de vino al día. Este punto sólo se promocionará entre los participantes que fueron consumidores de alcohol al inicio del estudio. Los abstemios nunca serán invitados a comenzar a consumir vino o cualquier otra bebida alcohólica

Los estudios preliminares han demostrado que la intervención intensiva en el estilo de vida durante 12 meses fue eficaz en reducir el IMC, la grasa visceral y los FRCV (119). Futuras publicaciones evaluarán el efecto de la intervención intensiva en el perfil lipídico avanzado.

Las estrategias para la prevención de la ECV basadas en la detección de FRCV y en el tratamiento centrado en la disminución de la concentración de C-LDL han conseguido disminuir la morbimortalidad asociada a la ECV. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, siguen teniendo lugar eventos isquémicos. Una posibilidad para explicar esto, es que exista un riesgo cardiovascular residual (RCVR). Este riesgo, está asociado frecuentemente a la dislipemia aterogénica (DA) y a alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas que afectan a su concentración y composición. Actualmente, la identificación de este RCVR se basa en la detección de fenotipos caracterizados por obesidad, resistencia a la insulina y concentraciones aumentadas de Tg y sdLDL y disminuidas de C-HDL. Sin embargo, a pesar de estas herramientas para identificarlo, aún existen pacientes con un RCV infraestimado. Teniendo en cuenta las publicaciones recientes, es posible que el estudio del perfil lipídico avanzado pueda explicar este RCVR.

Por otro lado, la prevención de eventos isquémicos mediante la dieta MedDiet y su efecto en el perfil lipídico tradicional y en el peso está comprobada. Teniendo en cuenta esto, sería interesante averiguar el impacto de la MedDiet en el perfil lipídico avanzado, y de esta forma averiguar si es posible disminuir el RCVR mediante esta dieta.

Teniendo en cuenta lo comentado en el párrafo anterior, se plantean las siguientes hipótesis:

- La determinación del perfil lipídico avanzado podría ser de utilidad para explicar el RCVR en pacientes con un perfil lipídico clásico normal;
- La MedDiet podría tener un impacto importante en el perfil lipídico avanzado y contribuir a mejorarlo.

Los objetivos de esta tesis tienen una doble finalidad:

- a) Poner a punto y validar un procedimiento para medir el C-sdLDL, así como estudiar su relación con los biomarcadores obtenidos mediante RMN;
- b) Estudiar el impacto clínico del perfil lipídico avanzado (C-sdLDL y perfil lipídico establecido por RMN) en la evaluación del RCVR y su respuesta a la MedDiet

Según este abordaje, los objetivos han sido los siguientes:

1. Adaptar un procedimiento de medida eficiente para la cuantificación de C-sdLDL y establecer unos valores de referencia adecuados a nuestra población.
2. Estudiar la relación entre el diámetro de las partículas LDL y la concentración de colesterol en las sdLDL.
3. Evaluar la eficiencia diagnóstica de un modelo basado en el perfil lipídico avanzado para la predicción de eventos isquémicos prematuros y valorar su impacto en el RCVR
4. Determinar el efecto de la MedDiet sobre el perfil lipídico avanzado en términos de concentración del número de partículas, diámetro y composición de las diferentes subclases lipoproteicas y sus subfracciones.
5. Evaluar el efecto de una intervención intensiva de pérdida de peso basada en la MedDiet hipocalórica, actividad física y terapia conductual frente a la MedDiet sin restricción calórica en el perfil lipídico avanzado y en las características antropométricas.

1 **Primer estudio: *Reference values assessment in a Mediterranean population for small dense low-density lipoprotein concentration isolated by an optimized precipitation method.***

1.1 Cita al estudio publicado: Fernández-Cidón B, Padró-Miquel A, Alía-Ramos P, Castro-Castro MJ, Fanlo-Maresma M, Dot-Bach D, Valero-Politi J, Pintó-Sala X, Candás-Estébanez B. *Reference values assessment in a Mediterranean population for small dense low-density lipoprotein concentration isolated by an optimized precipitation method.* Vasc Health Risk Manag. 2017; 13:201-207.

1.2 Presentación

La presencia de las partículas sdLDL se asocian a un mayor riesgo de enfermedad aterosclerótica (41). En condiciones fisiológicas, la fracción predominante son las *large LDL* (lLDL), pero incluso en las situaciones más favorables se producen sdLDL. Establecer cuáles son los valores fisiológicos de C-sdLDL en población sin factores de riesgo cardiovascular (FRCV) ni antecedentes de enfermedad cardiovascular (ECV) sería de gran utilidad para identificar qué individuos presentan concentraciones elevadas de sdLDL y por tanto un mayor riesgo cardiovascular (RCV). Actualmente el método de referencia para la separación de estas partículas incluye un paso de ultracentrifugación para aislarlas, lo cual dificulta su incorporación en la práctica clínica habitual ya que no es coste-eficaz (95), especialmente en laboratorios con grandes volúmenes de muestras. Existe un estudio que describe un método de precipitación que facilita la separación de las partículas sdLDL mediante el uso de heparina de magnesio como surfactante para la posterior cuantificación del colesterol contenido en ellas (96). A partir de este estudio, nuestro grupo de trabajo se plantea si sería posible adaptarlo a nuestra práctica clínica habitual y si es posible mejorar algunos aspectos metodológicos del mismo. Además, nos planteamos si es intercambiable con el método de referencia y si disponía de unos valores de referencia adecuados a la población del noreste de España.

Este estudio ha tenido dos objetivos:

- Adaptar un método de precipitación para la separación de las partículas sdLDL a los procesos habituales de un Laboratorio Clínico, basado en el uso de heparina de magnesio como surfactante. Medir la concentración de colesterol en estas partículas mediante un método automatizado, y verificar el método mediante el estudio de la intercambiabilidad de resultados empleando la ultracentrifugación como método de separación.

- Obtener valores de referencia para la concentración sérica del colesterol contenido en las partículas sdLDL (C-sdLDL) en una población adulta mediterránea empleando este método sencillo adaptado a nuestro laboratorio.

1.3 Resultados y discusión

Para llevar a cabo el primer objetivo de este estudio se evaluó el procedimiento de precipitación publicado anteriormente por *Hirano* (95) previa adaptación a las condiciones del Laboratorio Clínico. Para promover la precipitación se utiliza heparina de magnesio que se mezcla con el suero en igual proporción y luego se incuba 10 minutos a 37 °C. Se mantiene la mezcla preparada a 4 °C durante 15 min y se centrifuga a 21913 g. De esta forma se consigue precipitar las lipoproteínas con una densidad inferior a 1.044 g/mL. Una de las principales limitaciones descritas en la bibliografía de este método, es la dificultad en la separación de las partículas sdLDL en muestras lipémicas (120). Se ha considerado que esta limitación es muy importante ya que la utilidad de la medición de estas partículas reside especialmente en individuos con dislipemia aterogénica, que tienen además de las sdLDL, concentraciones elevadas de Tg y disminuidas de C-HDL (21). Por tanto, frecuentemente se tendrán que medir en individuos con hipertrigliceridemia.

Para solventar esta limitación se modificó el procedimiento de medida y se disminuyó la temperatura de enfriamiento de 4 °C a 0 °C. El motivo para realizar este paso, es que, a temperaturas más bajas, el precipitado se empaqueta mas firmemente y se puede separar más fácilmente el sobrenadante. De esta manera se evitan las interferencias por las lipoproteínas ricas en Tg y se aumenta el rendimiento del método, ya que permite procesar un mayor número de muestras antes de que el precipitado comience a disolverse. También se disminuyó a 21913 g (14000 rpm) la velocidad de centrifugación para adaptarla a la centrifuga disponible en nuestro laboratorio.

El sobrenadante contiene las partículas HDL y sdLDL con una densidad comprendida entre 1.044–1.063 g/mL. Entonces se separa empleando una pipeta, y se mide la concentración de C-HDL y de colesterol total en el analizador Cobas 8000 (Roche® Diagnostics). Como el sobrenadante solo contiene partículas HDL y sdLDL, la concentración C-sdLDL es la diferencia entre la concentración de colesterol total menos la concentración de C-HDL. (Figura 8)

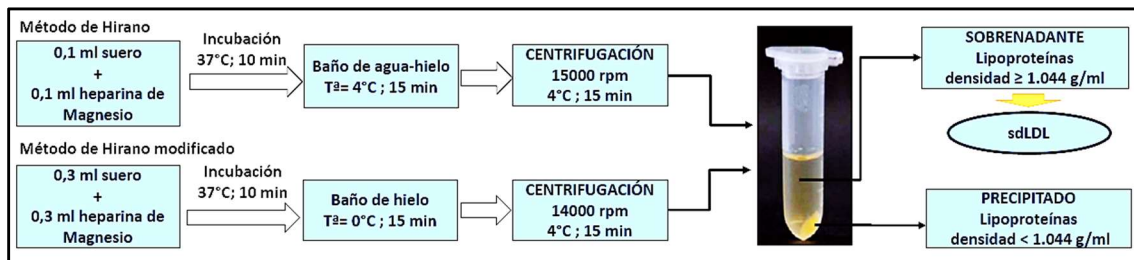


Figura 8. Método de Hirano modificado. Figura de producción propia

Para validar las modificaciones del procedimiento de medida se estudió la intercambiabilidad de los resultados obtenidos con la ultracentrifugación como método de separación, ya que es el método de referencia. Para ello se midió la concentración de C-sdLDL en 45 muestras, 15 de ellas pertenecientes a pacientes con dislipemia, por ambos métodos. Las diferencias entre los métodos se evaluaron utilizando el método no paramétrico de Passing-Bablok. La regresión lineal presentaba un coeficiente de correlación de $R^2= 0.99$ y una ecuación lineal de $y = 1.52 [0.72 \text{ a } 1.73] + 0.07 [-0.1 \text{ a } 0.13]$. La y (variable dependiente) corresponde a los valores obtenidos mediante el método adaptado a nuestro laboratorio y la x (variable independiente) a los valores obtenidos mediante la ultracentrifugación. El resultado con su IC del 95% para la pendiente es $(1.52 [0.72 \text{ a } 1.73])$ y para la intersección es $(0.07 [-0.1 \text{ a } 0.13])$. No se observó, por tanto, ni error constante ni proporcional. Podemos concluir que los resultados obtenidos mediante el método de precipitación modificado son intercambiables con el método de referencia.

Es importante destacar que existen otros métodos comerciales para la cuantificación de la concentración de C-sdLDL en la actualidad (121). Además, emplean reactivos que pueden emplearse en equipos automatizados y casi todos están basados en el método de la peroxidasa. El principio de este método se basa en el mayor contenido de esfingomielina en las partículas LDL con respecto a las partículas más pequeñas y densas. Este método utiliza esfingomielinasa que disocia preferentemente las partículas LDL y dos surfactantes diferentes, uno que disocia todas lipoproteínas que no son LDL y el otro que “protege” las partículas sdLDL (122). Se han evaluado diversas versiones de este método con modificaciones en los surfactantes y en la esfingomielinasa. El reactivo comercializado por Denka Seiken (sdLDL-EX “Seiken”, Denka Seiken, Tokyo, Japan) ha sido aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) (121). La dificultad de su incorporación en los laboratorios clínicos de rutina para la estimación del RCV, reside en la falta de valores de referencia en población española, así como su validación en distintos grupos de población, además de su alto coste.

Una vez verificada la intercambiabilidad de los resultados con el método de referencia, se llevó a cabo el objetivo principal de este trabajo, la estimación de un intervalo de referencia para la

concentración sérica de C-sdLDL. Para ello se reclutaron 79 individuos, 33 de ellos hombres, del noreste de España con edades comprendidas entre los 18 y los 60 años. Como criterios de exclusión se establecieron: edad inferior a 18 años, resistencia a la insulina o DM, dislipemia, embarazo, cáncer, trastornos del tiroides, antecedentes de ECV e IMC > 25 kg/m².

Para el cálculo de los valores de referencia se siguieron las recomendaciones de las guías internacionales CLSI y la Federación Internacional de Química Clínica (123). Después de descartar resultados aberrantes y confirmar que los resultados seguían una distribución gaussiana se seleccionó el 95% central de los valores poblacionales desde el percentil 2.5 hasta el percentil 97.5, descartando el 2.5% de cada uno de los extremos. Para determinar si era necesario hacer particiones por sexo y edad se aplicaron los criterios de Harris y Boyd y no se detectaron diferencias entre grupos. El intervalo de referencia obtenido fue 0.04–0.47 mmol/L.

Se han publicado otros valores de referencia empleando el método de la peroxidasa obteniéndose un intervalo de 0.24 a 0.88 mmol/L (121). Si comparamos este intervalo con el obtenido por nuestro grupo de trabajo, observamos que es superior. Un motivo que podría explicar esto, es que ha sido calculado en población sin dislipemia, pero no se han excluido otras condiciones como la obesidad, la resistencia a la insulina, DM o el hipotiroidismo, causas comunes de las alteraciones en el metabolismo lipoproteico.

A partir del método de la peroxidasa se han desarrollado diferentes kits comerciales para analizadores automatizados. Las comparaciones son complicadas de llevar a cabo porque no está detallada la metodología con la que se han realizado los valores de referencia ni tampoco la selección de la población. Un ejemplo es el reactivo de Denka Seiken y todas sus adaptaciones a diversos fabricantes. Con este reactivo se publicaron unos valores de referencia de 0.025 a 0.66 mmol/L para individuos sin resistencia a la insulina (124). Mindray Medical International Limited (Shenzhen, China) presentó una modificación para este kit de reactivos y se publicaron otros valores de referencia de 0.05 a 0.61 mmol/L (121).

Los valores de referencia presentados por la casa comercial Randox para el reactivo de Denka Seiken modificado están estratificados según grupos de edad y sexo. Los valores descritos en sus especificaciones son para población con edad inferior de 44 años en hombres y 54 años en mujeres de 0.32 a 1.24 mmol/L y para edad superior a 44 años en hombres y 54 años en mujeres de 0.32 a 1.33 mmol/L. En las especificaciones de calidad de la casa comercial Randox no se describen las características de la población, el método de cálculo de los valores de referencia ni los criterios de exclusión, lo cual dificulta la comparación y hace dudar de los criterios utilizados para la selección de la población.

Hasta el momento, este es el primer artículo en el que se calcula un intervalo de referencia por un método de precipitación sencillo, económico y fácilmente adaptable a los laboratorios clínicos para la concentración de C-sdLDL.

A pesar de que los intervalos de referencia varían según el método de medida empleado, se puede observar que la diferencia entre los límites superiores de los intervalos obtenidos por Denka Seiken y Mindray Medical International Limited no es muy elevada, siendo el valor más restrictivo el propuesto en nuestro trabajo. Esto puede ser debido a que en nuestro estudio se cumplió estrictamente con todos los criterios de inclusión de pacientes sanos, empleando un cuestionario sobre salud y estilo de vida, así como una analítica general de todos los participantes eliminando a los individuos que no cumplieren todos los requisitos. Las diferencias observadas con el reactivo de Randox no son exclusivas de nuestro método ya que duplican el límite superior presentado por Denka Seiken y Mindray Medical International Limited. Además de las diferencias metodológica (el método estudiado se basa en la precipitación con heparina de magnesio y el método de Randox se basa en el método de la peroxidasa) la selección de la población también puede influir en las diferencias observadas con el valor de referencia publicado por Randox.

El interés clínico en la estimación de valores de referencia está claro, y es una necesidad. Sin embargo, éstos únicamente indican si los resultados obtenidos para un individuo están dentro del 95% de los resultados poblacionales, pero no indican la presencia o ausencia de enfermedad. Actualmente para el perfil lipídico clásico se utilizan los valores discriminantes propuesto por la National Cholesterol Education Program (NCEP) que indican el riesgo de desarrollar una ECV en 10 años. (10) Por tanto, sería de gran utilidad establecer un valor discriminante de ECV para la concentración de C-sdLDL, y después de este estudio nos planeamos dar un paso más en este sentido.

En este contexto, en el estudio Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) se incluyeron 10225 individuos sin historia previa de eventos cardiovasculares que fueron seguidos durante 11 años. Un total de 1158 desarrollaron un evento cardiovascular durante este periodo. La media de la concentración plasmática de C-sdLDL de este grupo determinada mediante el método de Denka Seiken fue 43.5 mg/dL (1.13 mmol/L) (125). Este podría ser un valor discriminante aproximado para la concentración de C-sdLDL, aunque deberían llevarse a cabo más estudios con los análisis estadísticos adecuados mediante el uso de curvas de eficiencia diagnóstica (ROC) que evalúen la sensibilidad y especificidad, así como el valor predictivo positivo y negativo.

1.4 Conclusiones

El método evaluado en este trabajo es intercambiable con el método de referencia y es coste-eficaz y adaptable a la rutina clínica en los laboratorios clínicos. El intervalo de referencia calculado para la concentración de C-sdLDL obtenido mediante este método de precipitación es útil para la interpretación de los resultados de individuos en prevención primaria.

1.5 Publicación completa

Reference values assessment in a Mediterranean population for small dense low-density lipoprotein concentration isolated by an optimized precipitation method

This article was published in the following Dove Press journal:

Vascular Health and Risk Management

6 June 2017

[Number of times this article has been viewed](#)

Bárbara Fernández-Cidón¹⁻³
Ariadna Padró-Miquel¹
Pedro Alía-Ramos¹
María José Castro-Castro¹
Marta Fanlo-Maresma⁴
Dolors Dot-Bach¹
José Valero-Politi¹
Xavier Pintó-Sala⁴
Beatriz Candás-Estébanez¹

¹Clinical Laboratory, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; ²Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine, Autonomous University of Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; ³Department of Pharmacotherapy, Pharmacogenetics and Pharmaceutical Technology, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Spain; ⁴Cardiovascular Risk Unit, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

Background: High serum concentrations of small dense low-density lipoprotein cholesterol (sd-LDL-c) particles are associated with risk of cardiovascular disease (CVD). Their clinical application has been hindered as a consequence of the laborious current method used for their quantification.

Objective: Optimize a simple and fast precipitation method to isolate sd-LDL particles and establish a reference interval in a Mediterranean population.

Materials and methods: Forty-five serum samples were collected, and sd-LDL particles were isolated using a modified heparin-Mg²⁺ precipitation method. sd-LDL-c concentration was calculated by subtracting high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) from the total cholesterol measured in the supernatant. This method was compared with the reference method (ultracentrifugation). Reference values were estimated according to the Clinical and Laboratory Standards Institute and The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine recommendations. sd-LDL-c concentration was measured in serums from 79 subjects with no lipid metabolism abnormalities.

Results: The Passing-Bablok regression equation is $y = 1.52 (0.72 \text{ to } 1.73) + 0.07x (-0.1 \text{ to } 0.13)$, demonstrating no significant statistical differences between the modified precipitation method and the ultracentrifugation reference method. Similarly, no differences were detected when considering only sd-LDL-c from dyslipidemic patients, since the modifications added to the precipitation method facilitated the proper sedimentation of triglycerides and other lipoproteins. The reference interval for sd-LDL-c concentration estimated in a Mediterranean population was 0.04–0.47 mmol/L.

Conclusion: An optimization of the heparin-Mg²⁺ precipitation method for sd-LDL particle isolation was performed, and reference intervals were established in a Spanish Mediterranean population. Measured values were equivalent to those obtained with the reference method, assuring its clinical application when tested in both normolipidemic and dyslipidemic subjects.

Keywords: sd-LDL-c, small dense lipoprotein, sd-LDL reference values

Introduction

High concentration of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) is one of the major coronary heart disease (CHD) risk factors.¹ The LDLs are a heterogeneous group of particles differing in size and density.² Small dense LDL (sd-LDL) particles are more atherogenic than large buoyant LDL particles (lb-LDL)³⁻⁵ and are associated with CHD risk.⁶⁻⁹ These particles are formed as a consequence of a high activity of cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase enzyme in subjects with elevated triglyceride

Correspondence: Bárbara Fernández-Cidón
Hospital Universitari de Bellvitge, Carrer de la Feixa Llarga, s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
Email barbara.fernandez@bellvitgehospital.cat

(TG) concentration.^{10,11} The increased atherogenicity of sd-LDL particles is due to their small size and density, which facilitates their infiltration in the subendothelial layer of arteries. It is also known that sd-LDL particles have a different apolipoprotein B conformation with a lower affinity for LDL receptors in the liver resulting in a decrease of LDL particle clearance.¹² The sd-LDL particles are associated with hypertriglyceridemia and low HDL-c concentration. These three lipid abnormalities are usually called the lipid triad (LT) and are frequent in patients with premature CHD.^{13–16} The LT is a common finding in atherogenic dyslipidemia (AD) associated with insulin resistance, abdominal obesity and metabolic syndrome. Although LDL-c-lowering drugs are effective in AD management, in some subjects, the cardiovascular disease (CVD) risk is not increased although not achieving LDL-c targets.^{17–19} On the contrary, >20% of patients who had achieved LDL-c ≤ 1.81 mmol/L still show an atherogenic plaque progression.^{19,20} Therefore, studying the contribution of individual components of the LT to the atherogenic process can lead to an important improvement in the current understanding of the residual CVD risk in subjects who are on target of LDL-c concentrations.

TGs and HDL-c are usually included in the lipid profile, but the determination of sd-LDL particles is not performed in the routine analysis as its quantification is traditionally measured by ultracentrifugation that requires expensive equipment, complicated techniques and long assay times.²¹ Recently, new methods have been developed²² such as the nuclear magnetic resonance (NMR)^{23,24} that determines the size and number of LDL particles simultaneously and the Quantimetrix Lipoprint LDL System that quantifies LDL particle size subfractions²⁵ or an automatized homogeneous assay for sd-LDL-c quantification,^{26–28} but both of them have limited clinical use because of their cost.

A precipitation method for sd-LDL particle isolation with heparin-Mg²⁺ was developed in 2003,²⁹ being an easy and inexpensive method. However, this method has not been adapted to routine laboratories, and the reference values and the clinical utility in healthy and dyslipidemic population have not been studied. Therefore, it is interesting to optimize this method, check its interchangeability with ultracentrifugation, which is considered the reference method, and establish reference values in order to improve its contribution to clinical assessment.

CVD still remains a major cause of disability and premature death through the world, despite a number of breakthroughs in its prevention diagnosis and treatment. The accuracy in the diagnosis will decrease cardiovascular

events as patients will benefit from more effective treatment.³⁰ Although CVD mortality rates are lower in the southern countries of Europe, frequently considered to be a consequence of the Mediterranean diet, in Spain the hazard ratio estimated for CVD is 0.89% (95% confidence interval [CI]: 0.71–1.12)³¹ and for AD is 5.7%.¹⁹ Nevertheless, reference values for sd-LDL-c concentrations have not yet been studied in a Mediterranean population by this method. Therefore, the classification of patients according to their cardiovascular risk based on sd-LDL-c has not been possible. Effective detection of pathological sd-LDL-c concentrations in subjects with AD who have achieved LDL-c target could be very useful since it may explain the CVD residual risk associated to the LT.^{14,32–35} Subjects with a higher CVD risk with sd-LDL-c concentration above the reference value but normal LDL-c concentration would benefit from a combined therapy with statins plus fenofibrates instead of statin monotherapy or other therapeutic strategies.^{13,36–38}

The evidence that correlates sd-LDL particles and CVD^{14,33,34,35,36} is clear. However, the current lack of practicability for its quantification in the routine laboratory and the absence of reference values in Mediterranean population make difficult to implement its measure in clinical laboratories. Achieving an inexpensive, easy and short time analysis method could facilitate sd-LDL-c concentration measurement in the clinical practice as a new dyslipidemia biomarker.

The aims of this study are to optimize a modification of the heparin-Mg²⁺ precipitation method for sd-LDL particle isolation and subsequent quantification, assess the results interchangeability with the reference method, and establish reference values using Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.

Materials and methods

Method optimization

Subjects

To evaluate the interchangeability with the reference method – ultracentrifugation – patients of both sexes with and without dyslipidemia attending to the clinical laboratory for their routine checkup were recruited. First, 30 serums from patients (aged 50–70 years) with no abnormal lipid concentrations according to the National Cholesterol Education Program (NCEP) guidelines were collected. In addition, 15 serums from patients (aged 55–75 years) with mixed dyslipidemia diagnosed in the Risk Cardiovascular Functional Unit of our hospital were selected.

In order to guarantee the method applicability in hypertriglyceridemic samples, serums from 50 severe

dyslipidemic patients belonging to PREDIMED-PLUS trial³⁹ were analyzed, and the correct isolation of sd-LDL was also checked. The inclusion criteria for these patients were the same as in PREDIMED-PLUS: adult males aged 55–75 years and adult females aged 60–75 years with a body mass index (BMI) ≥ 27 and < 40 kg/m² and who meet at least three criteria for the metabolic syndrome considered for the NCEP.

Measurement of sd-LDL-c concentration

All serum samples were collected in tubes without anticoagulant and with separating gel (Vacuette ref: 456069). Serum samples were conserved at 80°C until analysis. The precipitation assay was performed during next 2 weeks after blood extraction. The sd-LDL particles were isolated with a precipitation reagent that contains 150 U/mL heparin-Na⁺ (H3393; Sigma-Aldrich) and 90 mmol/L MgCl₂. Each sample was prepared by mixing 300 μ L of serum with 300 μ L of the precipitation reagent and incubated for 10 min at 37°C. Then, the samples were maintained for 15 min at 0°C and centrifugated at 21913 \times g (14000 rpm) for 15 min at 4°C (centrifuge 6K15; Sigma-Aldrich). After that, the lipoproteins with a density < 1.044 g/mL remained at the bottom of the tube forming a yellow precipitate. The supernatant is clear and contains HDL and sd-LDL particles with a density between 1.044 and 1.063 g/mL. An aliquot of the supernatant was removed for HDL-c and cholesterol analyses at the Cobas 711 (Roche[®] Diagnostics). The reagents used in the homogeneous automatized assays were Colesterol Liq Gen 2 for cholesterol and HDL-Cholesterol plus 3rd generation HDL-c. As the supernatant only contains cholesterol from HDL and sd-LDL lipoproteins, the sd-LDL-c concentration was estimated by subtracting HDL-c from the total cholesterol.

Precipitation method modifications

We adapted the precipitation method to the available equipment in our laboratory and reproduced the Hirano experiment cooling to 4°C and centrifuging at 14000 rpm. To promote the precipitate formation instead of centrifuging at 15000 rpm, we placed the samples at 0°C for 15 min. As a consequence of the lower temperature, the precipitate is packed tightly and larger numbers of samples can be processed before the precipitate begins to dissolve avoiding rich TG lipoproteins interferences. These modifications successfully ensure the sd-LDL particles isolation preserving the supernatant for longer until the separation from the sedimented lipoproteins takes place.

Method comparison

To validate the measuring procedure modifications, we compared sd-LDL particles after the precipitation and those obtained by the ultracentrifugation. To confirm the interchangeability between results obtained by both methods, sd-LDL-c concentration was measured in 30 normolipidemic and 15 dyslipidemic samples from patients described in the “Subjects” section. The sd-LDL particles were isolated by the precipitation assay as described earlier and by ultracentrifugation (290000 \times g for 7 h at 16°C). Supernatant obtained by both methods was removed, and cholesterol was measured at the Cobas 711 (Roche[®] Diagnostics).

To verify the method applicability in real patients with lipid metabolism disorders, we reproduced the precipitation conditions in serum collected from 50 patients included in the PREDIMED-PLUS trial.

Data were analyzed using Analyse-It v1.72 (Analyse-It Software Ltd., Leeds, UK). The outliers were eliminated using the Bland–Altman analysis that evaluates bias and 95% CI limits of agreement. Differences between methods were tested using the nonparametric method of Passing–Bablok regression.

Reference values assessment

Subjects

Seventy-nine participants (33 males), from the North East of Spain, aged 18–60 years were recruited. The demographic data collected included sex, age, height, weight, BMI, lifestyle habits (special diet, alcohol intakes, smokers and regular physical activity), family history, medication and glycated hemoglobin, lipids and lipoprotein measurement. We excluded subjects with the following conditions: < 18 years of age, diabetes mellitus, dyslipidemia, pregnancy, cancer or undergoing chemotherapy, thyroid disorders, history of CVDs, BMI > 25 kg/m², those currently on lipid-lowering therapy and lipid concentrations above the cutoff values proposed by the NCEP to evaluate the CVD risk. Written informed consent was obtained from each subject, and the study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Bellvitge University Hospital. Lipid profile, glycated hemoglobin, anthropomorphic characteristics and lifestyle habits are specified in Table 1.

Measurement of sd-LDL-c concentration

Blood samples were collected in tubes without anticoagulant and with separating gel (Vacuette ref: 456069). Serum aliquots from the primary tube were stored at -80°C for a maximum of 15 days. All analyses were performed the following 15 days

Table 1 Subjects' characteristics for the reference values assessment

Variables	Mean (range)
Age, years	31.73 (18–60)
Weight, kg	61.4 (45–82)
BMI, kg/cm ²	21.26 (16.9–24.5)
HbA1c (NGSP), %	5.23 (4.38–5.9)
Cholesterol, mmol/L	4.1 (2.1–5.1)
Triglycerides, mmol/L	0.7 (0.35–1.53)
HDL-c concentration, mmol/L	1.67 (1.13–2.63)
LDL-c concentration, mmol/L*	2.16 (0.68–3.12)
Apolipoprotein A, nmol/L	1.39 (0.36–3.30)
Apolipoprotein B, nmol/L	0.78 (0.35–1.99)
sd-LDL-c concentration, mmol/L	0.26 (0.07–0.53)
Smoking, yes, %	13.92
Alcohol, occasionally, %	37.97
Physical activity, occasionally, %	48.10

Note: *Calculated by Friedewald formula.

Abbreviations: BMI, body mass index; HbA1c (NGSP), glycated hemoglobin (National Glycohemoglobin Standardization Program units); HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; sd-LDL-c, small dense low-density lipoprotein cholesterol.

after the blood extraction. The sd-LDL particles are isolated as described earlier, and then cholesterol and HDL-c were measured at the Cobas 711 (Roche® Diagnostics). Finally, sd-LDL-c concentration was estimated by subtracting HDL-c from the cholesterol measured in the supernatant.

Statistical analysis for the reference interval establishment

We performed the reference interval study according to the CLSI and The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine recommendations.⁴⁰ Data were analyzed using Analyse-It v1.72 (Analyse-It Software Ltd.). Outliers were identified and omitted using a box plot. Data lying outside 3 interquartile ranges (IQRs) from the upper or lower edge of the box were eliminated. Reference interval partitioning test by sex and age was performed using Harris and Boyd's approach. The Anderson–Darling nonparametric test was used to study the distribution data. As sd-LDL-c concentrations are distributed according to a Gaussian curve, a parametric method was used to establish the reference interval. The remainder 95% of values was considered to establish the reference interval.

Results

Evaluation of the precipitation method modifications

The modifications implemented promote the lipoproteins sedimentation when centrifugation at 14000 rpm is carried out. In order to facilitate the precipitation, the samples are cooled at 0°C. After the centrifugation, the pellet is formed

and a clear supernatant can be easily removed in the case of normolipidemic serum. When assay is performed with lipidemic serum, TG aggregates remain on the top of the tube hampering the supernatant pipetting. However, the absence of TG aggregates sedimentation does not interfere with the sd-LDL-c quantification in the supernatant, as long as the TG aggregates are carefully removed from the supernatant before pipetting it. HDL-c values obtained in the serum before the sd-LDL particles isolation are used as a control of the precipitation method efficiency. If all the lipoproteins with a density >1.044 g/mL should remain in the supernatant after the rich TG lipoproteins sedimentation, the HDL-c measured in the supernatant should not have any change from the HDL-c initial values measured before the precipitation. This is a fast and inexpensive method that allows to measure sd-LDL-c concentration. Thirty samples can be processed at the same time, and 40 min are needed to isolate and quantify sd-LDL-c concentration.

Comparison between the precipitation method and the ultracentrifugation

The good association between the sd-LDL-c concentration measured after sd-LDL particles isolation by the precipitation method and the ultracentrifugation method for both normolipidemic and dyslipidemic samples (n=45) is shown in the linear equation ($R_2=0.993$) provided by the Passing - Bablok regression analysis ($y=1.52 [0.72 \text{ to } 1.73] + 0.07 [-0.1 \text{ to } 0.13]$). Outliers were detected and excluded by the Bland–Altman analysis. Passing–Bablok regression analysis showed no significant deviation from linearity. The results with 95% CI for the slope (1.52 [0.72 to 1.73]) and the intercept (0.07 [–0.1 to 0.13]) demonstrate that no constant or proportional error was detected.

Reference interval estimation

Comparison of sd-LDL-c concentration in males and females demonstrated no distinct partitioning patterns, but sd-LDL-c concentrations are higher in males than females (Table 2). Age differences were not detected by Harris and Boyd's test, and sd-LDL-c concentrations are not increased with age (Table 3).

Any outliers were detected, and the sd-LDL-c data observed a normal distribution ($p=0.06$). The reference interval estimated is 0.04–0.47 mmol/L.

Table 2 sd-LDL-c concentration by sex

Sex	Male (n=33)	Female (n=49)
sd-LDL-c (mmol/L)	0.26 (0.08–0.53)	0.19 (0.07–0.50)

Note: Data are presented as mean (range).

Abbreviation: sd-LDL-c, small dense low-density lipoprotein cholesterol.

Table 3 sd-LDL-c concentration by age

Age (years)	19–30 (n=23)	31–40 (n=12)	41–59 (n=9)
sd-LDL-c (mmol/L)	0.25 (0.07–0.50)	0.26 (0.12–0.44)	0.19 (0.07–0.30)

Note: Data are presented as mean (range).

Abbreviation: sd-LDL-c, small dense low-density lipoprotein cholesterol.

Discussion

In this study, the original method reported by Hirano has been adapted to our laboratory technical conditions. In order to overcome such technical limitations, several modifications had to be integrated in the precipitation procedure like the cooling sample temperature during the rich TG lipoproteins sedimentation. Although a small number of samples were included in the method comparison, which may be considered a limitation of this study, slight modifications have been made from the original method. The results obtained by the original method had already been demonstrated to be interchangeable with the reference method in previous studies, and our results are consistent with them. Its clinical application has been tested in serum from dyslipidemic patients showing no differences in the precipitation procedure from the normolipidemic serum. Only serums from patients with hypertriglyceridemia showed aggregates that remained on the top of the tube. Despite the absence of lipoprotein sedimentation, the TG aggregates can be removed from the supernatant and no interference in the sd-LDL-c quantification was detected.^{28,29,41}

The other aim of this study is to present reference values for serum sd-LDL-c concentration in a Mediterranean population from the North East of Spain. The reference value for serum sd-LDL-c concentration was 0.04–0.47 mmol/L. Thus far, no reference values for sd-LDL-c concentration have been reported using this methodology and this is not only the case in a Mediterranean population, but in other regions sd-LDL-c concentration also has not been estimated in a reference population. The method-specific reference values assessment rather than the universal reference values improves the decision-making process in a clinical setting enabling the CVD risk stratification. Regarding the strengths of this study, we determined the reference values in subjects who strictly met all the inclusion criteria and who had already completed an application form about their lifestyle instead of exporting data from the laboratory database, in order to provide the best reference intervals for use in preventive medicine.

These reference values were validated in a dyslipidemic population from the PREDIMED-PLUS trial.³⁹ Even though all the participants are in lipid-lowering therapy, not every

patient responds to the current treatment in the same way. Those who had achieved TG and LDL-c concentration targets presented sd-LDL-c concentration within the reference interval estimated. Subjects who still have elevated concentrations of TG and LDL-c after the lipid-lowering therapy presented sd-LDL-c concentrations higher than the established reference values. Further information about specific lipid-lowering treatments from patients with lower sd-LDL-c concentration should be analyzed in future investigations.

Conclusion

This study optimizes the interchangeability of the modified heparin-Mg²⁺ precipitation method and the ultracentrifugation method. Reference values for sd-LDL-c concentration were estimated in a Mediterranean population and proven in patients from the PREDIMED-PLUS trial. To our knowledge, it is the first study in which reference values have been established using this useful and easy-to-carry-out method. Further studies should determine the role of the concentration of sd-LDL particles in the atheroma progression and the severity of CHD, especially in patients with normal LDL-c concentrations with diabetes or hypertriglyceridemia and other conditions related with AD. Likewise, it would be necessary to establish a cutoff value from which the risk of CVD is increased compared to healthy individuals. Therefore, the measurement of sd-LDL-c concentration by this method could be useful to improve the evaluation of cardiovascular risk and to tailor preventive strategies in patients with high sd-LDL-c. The reference range obtained was from 0.04 to 0.47 mmol/L.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Silverman MG, Blaha MJ, Krumholz HM, et al. Impact of coronary artery calcium on coronary heart disease events in individuals at the extremes of traditional risk factor burden: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2014;35(33):2232–2241.
2. Rizzo M, Berneis K. Small, dense low-density-lipoproteins and the metabolic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23(1):14–20.
3. Moriyama K, Takahashi E. Non-HDL cholesterol is a more superior predictor of small-dense LDL cholesterol than LDL cholesterol in Japanese subjects with TG levels <400 mg/dL. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23(9):1126–1137.
4. Voros S, Joshi P, Qian Z, et al. Apoprotein B, small-dense LDL and impaired HDL remodeling is associated with larger plaque burden and more non calcified plaque as assessed by coronary CT angiography and intravascular ultrasound with radiofrequency backscatter: results from the ATLANTA I study. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(6):e000344.
5. Phillips CM, Perry IJ. Lipoprotein particle subclass profiles among metabolically healthy and unhealthy obese and non-obese adults: does size matter? *Atherosclerosis*. 2015;242(2):399–406.

6. Nishikura T, Koba S, Yokota Y, et al. Elevated small dense low-density lipoprotein cholesterol as a predictor for future cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21(8):755–767.
7. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(5):1069–1077.
8. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM*. 2006;99(1):1–14.
9. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 1988;260(13):1917–1921.
10. Shimada A, Kimura H, Oida K, et al. Serum CETP status is independently associated with reduction rates in LDL-C in pitavastatin-treated diabetic patients and possible involvement of LXR in its association. *Lipids Health Dis*. 2016;15(1):57.
11. Leança CC, Nunes VS, Panzoldo NB, et al. Metabolism of plasma cholesterol and lipoprotein parameters are related to a higher degree of insulin sensitivity in high HDL-C healthy normal weight subjects. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:173.
12. Mitsche MA, Packer LE, Brown JW, Jiang ZG, Small DM, McKnight CJ. Surface tensiometry of apolipoprotein B domains at lipid interfaces suggests a new model for the initial steps in triglyceride-rich lipoprotein assembly. *J Biol Chem*. 2014;289(13):9000–9012.
13. Cabrera M, Sánchez-Chaparro MA, Valdivielso P, et al; ICARIA (Ibermutuamur Cardiovascular Risk Assessment) Study Group. Prevalence of atherogenic dyslipidemia: association with risk factors and cardiovascular risk in Spanish working population. “ICARIA” Study. *Atherosclerosis*. 2014;235(2):562–569.
14. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*. 2007;298(3):299–308.
15. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. 1990;82(2):495–506.
16. Arca M, Montali A, Valiante S, et al. Usefulness of atherogenic dyslipidemia for predicting cardiovascular risk in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2007;100(10):1511–1516.
17. Wong ND, Zhao Y, Patel R, et al. Cardiovascular risk factor targets and cardiovascular disease event risk in diabetes: a pooling project of the Atherosclerosis Risk in Communities Study, Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, and Jackson Heart Study. *Diabetes Care*. 2016;39(5):668–676.
18. Alexopoulos D, Anastasiou-Nana M, Elisaf MS, et al; CHALLENGE Investigators. A contemporary cross-sectional study on dyslipidemia management, cardiovascular risk status, and patients’ quality of life in Greece: the CHALLENGE Study. *Int J Cardiol*. 2016;217:183–189.
19. Aguiar C, Alegria E, Bonadonna RC, et al. A review of the evidence on reducing macrovascular risk in patients with atherogenic dyslipidaemia: a report from an expert consensus meeting on the role of fenofibrate-statin combination therapy. *Atheroscler Suppl*. 2015;19:1–12.
20. Shen H, Xu L, Lu J, et al. Correlation between small dense low-density lipoprotein cholesterol and carotid artery intima-media thickness in a healthy Chinese population. *Lipids Health Dis*. 2015;14:137.
21. Grundy SM. Atherogenic dyslipidemia: lipoprotein abnormalities and implications for therapy. *Am J Cardiol*. 1995;75(6):45B–52B.
22. Williams PT, Zhao XQ, Marcovina SM, Otvos JD, Brown BG, Krauss RM. Comparison of four methods of analysis of lipoprotein particle subfractions for their association with angiographic progression of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2014;233(2):713–720.
23. Decewicz DJ, Neatrou DM, Burke A, et al. Effects of cardiovascular lifestyle change on lipoprotein subclass profiles defined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Lipids Health Dis*. 2009;8:26.
24. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. 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(9):1632–1638.
25. Hoefner DM, Hodel SD, O’Brien JF, et al. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the quantimetrix lipoprint LDL system. *Clin Chem*. 2001;47(2):266–274.
26. Kikkawa K, Nakajima K, Shimomura Y, et al. Small dense LDL cholesterol measured by homogeneous assay in Japanese healthy controls, metabolic syndrome and diabetes patients with or without a fatty liver. *Clin Chim Acta*. 2015;438:70–79.
27. Albers JJ, Kennedy H, Marcovina SM. Evaluation of a new homogenous method for detection of small dense LDL cholesterol: comparison with the LDL cholesterol profile obtained by density gradient ultracentrifugation. *Clin Chim Acta*. 2011;412(7–8):556–561.
28. Ito Y, Fujimura M, Ohta M, Hirano T. Development of a homogeneous assay for measurement of small dense LDL cholesterol. *Clin Chem*. 2011;57(1):57–65.
29. Hirano T, Ito Y, Saegusa H, Yoshino G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J Lipid Res*. 2003;44(11):2193–2201.
30. Writing C, Smith SC Jr, Collins A, et al. Our time: a call to save preventable death from cardiovascular disease (heart disease and stroke). *Glob Heart*. 2012;7:297–305.
31. Jankovic N, Geelen A, Streppel MT, et al. WHO guidelines for a healthy diet and mortality from cardiovascular disease in European and American elderly: the CHANCES project. *Am J Clin Nutr*. 2015;102(4):745–756.
32. Tani S, Matsumoto M, Nagao K, Hirayama A. Association of triglyceride-rich lipoproteins-related markers and low-density lipoprotein heterogeneity with cardiovascular risk: effectiveness of polyacrylamide-gel electrophoresis as a method of determining low-density lipoprotein particle size. *J Cardiol*. 2014;63(1):60–68.
33. Arai H, Kokubo Y, Watanabe M, et al. Small dense low-density lipoproteins cholesterol can predict incident cardiovascular disease in an urban Japanese cohort: the Suita Study. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(2):195–203.
34. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with non-fasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *J Am Med Assoc*. 2007;298(3):309–316.
35. González Santos P. Dislipemia aterogénica. *Clin Invest Arterioscler*. 2012;24(suppl 1):3–7.
36. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, et al; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J*. 2011;32(11):1345–1361.
37. Ito MK. Long-chain omega-3 fatty acids, fibrates and niacin as therapeutic options in the treatment of hypertriglyceridemia: a review of the literature. *Atherosclerosis*. 2015;242(2):647–656.
38. Tokuno A, Hirano T, Hayashi T, et al. The effects of statin and fibrate on lowering small dense LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb*. 2007;14(3):128–132.
39. PREDIMED-PLUS [homepage on the Internet]. Available from: <http://predimedplus.com/>. Accessed September 6, 2016.
40. Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, et al. *Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory: Approved Guideline-3rd Ed. CLSI Document C28-A3E*. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008.
41. Cavalcante Lda S, da Silva EL. Application of a modified precipitation method for the measurement of small dense LDL-cholesterol (sd-LDL-C) in a population in Southern Brazil. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(9):1649–1656.

2. Segundo estudio: *Precipitated sdLDL: An easy method to estimate LDL particle size.*

2.1 Cita al estudio publicado: Fernández-Cidón B, Candás-Estébanez B, Ribalta J, Rock E, Guardiola-Guionnet M, Amigó N, Padró-Miquel A, Alía-Ramos P, Pintó-Sala X. *Precipitated sdLDL: An easy method to estimate LDL particle size.* J Clin Lab Anal. 2020; 34(7): e23282

2.2 Presentación

Las partículas LDL son un grupo heterogéneo de diferente tamaño y composición que incluyen desde las subfracciones más voluminosas y ligeras hasta las más pequeñas y densas. En condiciones fisiológicas las partículas más grandes son las prevalentes, pero la acción de varios factores exógenos y endógenos altera el metabolismo de las lipoproteínas induciendo una mayor producción de sdLDL (40). Aunque las sdLDL se asocian a una mayor concentración de Tg y una disminución de C-HDL, se desconoce de qué manera otras variables del perfil bioquímico y del perfil lipídico avanzado influyen en la concentración de C-sdLDL.

Por otro lado, no se han publicado estudios que evalúen la relación entre C-sdLDL y el número de partículas o el diámetro de las LDL obtenido mediante RMN. Se ha descrito el fenómeno de la discordancia entre el número de partículas LDL (LDL-P) y el colesterol LDL (C-LDL), pero se desconoce cuál es la relación con las C-sdLDL (76). Esta situación ocurre comúnmente en pacientes con hipertrigliceridemia y por tanto con una mayor prevalencia de sdLDL. Actualmente, algunas sociedades han propuesto las LDL-P como objetivo terapéutico cuando hay discordancia entre C-LDL y LDL-P (79). Por este motivo, es muy interesante determinar la relación que existe entre LDL-P y C-sdLDL, ya que la diferencia entre concentración de partículas y concentración de colesterol puede ser consecuencia de una mayor presencia de sdLDL.

Los objetivos de este estudio son dos:

- Estudiar la relación entre C-sdLDL y los resultados de la RMN, LDL-P y el diámetro de las partículas LDL (LDL-Z);
- Establecer qué variables podrían explicar de forma significativa las variaciones en la concentración de C-sdLDL.

2.3 Resultados y discusión

Para conseguir los objetivos de este estudio se analizó el perfil lipídico avanzado de las muestras de plasma pertenecientes a 85 hombres de 19 a 75 años pertenecientes al estudio VITAGE (126). La sinergia establecida con otros grupos de trabajo en el transcurso de esta tesis fue fundamental para conseguir realizar comparaciones entre la concentración de C-sdLDL y los

biomarcadores de lipoproteínas obtenidos por RMN. Las muestras de plasma estaban almacenadas a -80°C y fueron cedidas de forma desinteresada para nuestro estudio. Se disponía de datos previos del perfil bioquímico de todos los participantes incluidas variables antropométricas, perfil lipídico clásico, Vitamina E (VitE), C-VLDL, Colesterol en las lipoproteínas de densidad Intermedia (C-IDL), Apo B, Apo A, Apolipoproteína E (Apo E), Apolipoproteína CIII (Apo CIII), AGLs, diámetro LDL(LDL-Z) e información sobre dieta y consumo de alcohol.

En primer lugar, se quiso evaluar la asociación entre C-sdLDL y los resultados obtenidos mediante la RMN, concretamente con la concentración de partículas (LDL-P) y su tamaño (LDL-Z). Para ello después de estudiar la normalidad de las distribuciones se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (r_{xy}). Los resultados obtenidos para C-sdLDL vs LDL-P fueron $r_{xy}=0.687$ [0.555-0.785]; $p=2.1\cdot 10^{-7}$ y para C-sdLDL vs LDL-Z fueron $r_{xy}=-0.603$ [-0.723-0.447]; $p=1.6\cdot 10^{-12}$. Ambas asociaciones mostraron una correlación estadísticamente significativa.

Atendiendo a estos resultados, se puede decir que concentraciones elevadas de LDL-P se asocian a una mayor concentración de partículas sdLDL y del colesterol contenido en las mismas. En el estudio MESA se describió que la concentración de LDL-P es mayor que la de C-LDL en individuos con síndrome metabólico (SM); sin embargo, los individuos sin esta patología presentan una concentración de C-LDL mayor que la de LDL-P (127). Por tanto, en pacientes con SM se infraestima el RCV y en otros pacientes se sobrestimaría el RCV si se consideran únicamente los valores de C-LDL. La discordancia entre C-LDL y LDL-P observada en pacientes con SM se ha justificado por el colesterol contenido en las lipoproteínas remanentes ricas en Tg que no es cuantificado por C-LDL. Por tanto, en pacientes con hipertrigliceridemia el valor de C-LDL no es representativo del RCV. Sin embargo, el mismo grupo ha demostrado la discordancia entre LDL-P y C-No HDL (128); como consecuencia la diferencia entre C-LDL y LDL-P no puede deberse únicamente al colesterol contenido en las lipoproteínas remanentes. Por tanto, estas diferencias podrían deberse a las partículas sdLDL, ya que el incremento en el número de partículas aumenta el colesterol, pero principalmente el contenido en las partículas sdLDL y no el C-LDL total. Por otro lado, cuanto menor es el diámetro de estas partículas mayor es su contenido en colesterol.

Para llevar a cabo el segundo objetivo de este estudio y evaluar el efecto de las diferentes variables en la variación de la concentración de C-sdLDL se elaboró un modelo multivariante. El primer paso fue hacer análisis univariantes para determinar qué variables se relacionaban con C-sdLDL. De todas las variables incluidas en el estudio las que mostraban una $p<0.05$ (estudios

univariantes) fueron: Índice de masa corporal (IMC), Alanina aminotransferasa (ALT), Vitamina E (VitE), Tg, C-LDL, C-HDL, C-VLDL, Colesterol en las lipoproteínas de densidad Intermedia (C-IDL), Apo B, Apo A, Apolipoproteína E (Apo E), Apolipoproteína CIII (Apo CIII), AGLs, Diámetro LDL (LDL-Z).

Todas ellas se asocian a fenotipos caracterizados por obesidad e IMC elevados, consecuencia de un estilo de vida poco saludable. La inactividad física y la ingesta de una dieta aterogénica genera un desequilibrio entre el aporte y la oxidación de los AGLs que se acumulan en el hígado provocando un aumento de Tg y esteatosis hepática con un aumento de la ALT (69). Esta situación da lugar a un rápido incremento de la concentración de lipoproteínas remanentes, VLDL e IDL, cuyos principales componentes son el colesterol y las apolipoproteínas Apo E y Apo CIII. Al aumentar la concentración de estas lipoproteínas las vías de eliminación de las mismas son menos eficientes, y permanecen más tiempo en el torrente sanguíneo donde son el sustrato de la CEPT. En este proceso se producen partículas LDL y HDL con una mayor proporción de Tg y menor de colesterol. Los Tg son hidrolizados por la lipasa hepática y las partículas LDL y HDL disminuyen su tamaño. Las partículas LDL tienen con un LDL-Z menor tienen una menor afinidad por el receptor hepático para la eliminación de las LDL es también menor, por tanto, tiene lugar un aumento de la concentración de C-LDL, C-sdLDL y Apo B. Por otro lado, el efecto en las HDL es el inverso, cuanto menor es su diámetro, mayor es su degradación, por tanto, disminuyen la concentración de C-HDL y de la Apo A (73).

En cuanto a la Vit E, es el principal antioxidante transportado por las lipoproteínas LDL. La resistencia a la oxidación de estas partículas depende de su contenido (129) y se observa una asociación inversa entre sdLDL y Vit E ($B=-15.525$ $p=0.001$). Esto podría ser la causa de la mayor tendencia a la oxidación de las partículas sdLDL. La facilidad para oxidarse induce a la formación de placas de aterosclerosis inestables, que aumentan el riesgo de eventos isquémicos (130).

Una vez excluidas aquellas variables que no se relacionaban con la concentración de C-sdLDL, se descartan las variables que presentan colinealidad entre ellas mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman (ρ). De las parejas de variables con $\rho > 0,5$ únicamente se incluyen en el modelo multivariante aquellas que presentan el valor p más significativo. Las variables colineales fueron: C-LDL ($p=0.01$) y Apo B ($p=2.83 \cdot 10^{-8}$); C-VLDL ($p=1.02 \cdot 10^{-9}$) y Tg ($p=5.43 \cdot 10^{-13}$); C-HDL ($p=0.06 \cdot 10^{-6}$) y Apo A ($p=0.002$), por tanto, se excluyeron del estudio C-LDL, Apo A y C-VLDL.

Tal y como se describe en la bibliografía, ya se observa en los estudios bivariantes que las partículas sdLDL se relacionan más con Tg y C-HDL que con C-LDL (73). Como consecuencia, se infraestima el RCV si únicamente se considera el C-LDL para guiar la terapia hipolipemiente (67).

En el modelo multivariante final la y es la concentración de C-sdLDL y la x las variables: Edad ($B=0.169$, $p=0.904$), **IMC ($B=0.016$, $p=0.048$)**, ALT ($B=78.172$, $p=0.372$), Vit E ($B=-8.78$, $p=0.147$), **Tg ($B=0.182$, $p=0.013$)**, C-HDL ($B=-10.388$, $p=0.931$), C-IDL ($B=245.684$, $p=0.353$), **Apo B ($B=0.071$, $p=0.003$)**, Apo E ($B= 3.997$, $p=0.904$), Apo CIII($B= 10.638$, $p=0.225$), **AGLs ($B=0.001$, $p=0.084$)** y **LDL-Z($B=- 126$, $p=0.005$)**. La regresión multivariante es significativa con $p=8.77 \cdot 10^{-12}$ y $R^2= 0.568$, por tanto, el modelo explica el 56.8% de la variación de la concentración de C-sdLDL. Las pendientes (B) cuantifican la magnitud del efecto de cada variable sobre la concentración de C-sdLDL.

Las variables con tendencia a la significación, $p < 0,1$, son IMC, Tg, Apo B, AGLs y LDL-Z. Tal y como se ha descrito todas estas variables están muy ligadas a la dislipemia aterogénica y al riesgo cardiovascular residual. De todas ellas la que más contribuye a la concentración de C-sdLDL son la Apo B y LDL-Z. La relación con la Apo B es evidente ya que forma parte de su estructura. En cuanto al diámetro de LDL-Z, podemos concluir que el aumento de 1 nm supone un incremento 126 $\mu\text{mol/L}$ en la concentración de colesterol contenido en las sdLDL. Después de revisar la literatura este es el primer artículo que ha demostrado la relación entre el diámetro de las partículas LDL y su contenido en colesterol. Esto podría explicar que el potencial aterogénico de las sdLDL no se deba únicamente a su pequeño tamaño y elevada densidad sino también a su mayor contenido en colesterol.

De los resultados obtenidos se puede concluir que para conseguir una disminución en la concentración de C-sdLDL son necesarias terapias dirigidas a disminuir el IMC, AGLs y Tg. Las actuales recomendaciones de las guías clínicas están dirigidas al tratamiento con estatinas para la disminución de C-LDL, (1) pero esta estrategia puede no ser efectiva para disminuir la concentración de C-sdLDL. Se ha demostrado como la terapia combinada con estatinas y fenofibratos es útil para disminuir el RCVR asociado a la hipertrigliceridemia en los pacientes con DA (82). A pesar de esto, se deben realizar más ensayos clínicos que valoren cómo modificaciones en la dieta y la pérdida de peso influyen en la concentración de C-sdLDL.

Por otro lado, aunque en el presente estudio la Vit E pierde la significación en el modelo final, es importante resaltar que aporta más al modelo que otras variables lipídicas como C-HDL y el C-IDL. En estudios observacionales se ha encontrado una relación entre el consumo de suplementos de Vit E y una menor incidencia de ECV (131). Estos tratamientos se fundamentan

en la capacidad de la Vit E para estabilizar la placa de ateroma y por tanto reducir el número de eventos isquémicos. No obstante, el nivel de evidencia es muy bajo y es necesario llevar a cabo ensayos clínicos que verifiquen el beneficio de los suplementos de Vit E en la prevención de la ECV.


2.4 Conclusiones

Estos resultados demuestran que la determinación de C-sdLDL puede ser una alternativa a la resonancia magnética nuclear cuando se considere que la determinación del C-LDL no es suficiente para valorar el RCVR y prevenir los eventos isquémicos prematuros.

2.5 Publicación completa

RESEARCH ARTICLE

Precipitated sdLDL: An easy method to estimate LDL particle size

Bárbara Fernández-Cidón^{1,2} | Beatriz Candás-Estébanez¹  | Josep Ribalta³ | Edmond Rock⁴ | Montserrat Guardiola-Guionnet³ | Núria Amigó³ | Ariadna Padró-Miquel¹ | Pedro Alía-Ramos¹ | Xavier Pintó-Sala¹

¹Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

²Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine, Autonomous University of Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

³Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Reus, Spain

⁴French National Institute for Agricultural Research, Paris, France

Correspondence

Beatriz Candás-Estébanez, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Catalunya, Spain.
Email: beatrizcandas@gmail.com

Funding information

This study was funded by Hospital Universitari de Bellvitge, part of the Institut Català de la Salut (ICS) and Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine, Autonomous University of Barcelona (UAB), Barcelona, Spain.

Abstract

Background: LDL-C lowering is the main measure in cardiovascular disease prevention but a residual risk of ischemic events still remains. Alterations of lipoproteins, specially, increase in small dense LDL (sdLDL) particles are related to this risk.

Objective: To investigate the potential use of sdLDL cholesterol concentration (sdLDL-C) isolated by an easy precipitation method and to assess the impact of a set of clinical and biochemical variables determined by NMR on sdLDL concentration.

Methods: sdLDL-C and NMR lipid profile were performed in 85 men samples. Association among them was evaluated using Pearson coefficients (r_{xy}). A multivariate regression was performed to identify the influence of NMR variables on sdLDL-C.

Results: A strong association between sdLDL-C and LDL-LDL-P ($r_{xy} = 0.687$) and with LDL-Z ($r_{xy} = -0.603$) was found. The multivariate regression explained a 56.8% in sdLDL-C variation ($P = 8.77.10^{-12}$). BMI, ApoB, triglycerides, FFA, and LDL-Z showed a significant contribution. The most important ones were ApoB and LDL-Z; a 1nm increase (LDL-Z) leads to decrease 126 nmol/L in sdLDL-C.

Conclusion: The association between sdLDL-C, LDL-Z, and LDL-P is clear. From a large number of variables, especially LDL-Z and apoB influence on sdLDL-C. Results show that the smaller the LDL size, the higher their cholesterol concentration. Therefore, sdLDL-C determination by using this easy method would be useful to risk stratification and to uncover cardiovascular residual risk.

KEYWORDS

atherosclerosis, lipoprotein precipitation, nuclear magnetic resonance lipid profile, residual cardiovascular risk, small dense LDL

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; Apo, CIII apolipoprotein CIII; ApoA-I, apolipoprotein A; ApoB, apolipoprotein B; ApoE, apolipoprotein E; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; CRP, creatinine, c-reactive protein; CVD, Cardiovascular diseases; CVRFs, cardiovascular risk factors; FFAs, free fatty acids; Fib, fibulin; GPT, glutamate-pyruvate transaminase; HDL, high-density cholesterol; IDL-C, intermediate-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; LDL-P, LDL particles; LDL-Z, LDL size; LPA, lipoprotein A; MUFAs, monounsaturated fatty acids; NMR, nuclear magnetic resonance; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; r_{xy} , Pearson coefficients; sdLDL, small dense LDL particles; sdLDL-C, small dense LDL particles cholesterol; Tg, triglycerides; Vit A, vitamin A; Vit E, vitamin E; VLDL-C, very low-density lipoprotein cholesterol; ρ , Spearman correlation coefficients.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2020 The Authors. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* published by Wiley Periodicals, Inc.

1 | INTRODUCTION

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of mortality in the occidental countries being subclinical atherosclerosis the triggering factor for most of these events.¹ Premature atherosclerotic disease commonly occurs in individuals with atherogenic dyslipidemia who share a phenotype characterized by centripetal obesity, insulin resistance, and physical inactivity. In addition, they also have a lipid profile characterized by an increase in triglycerides (Tg) and small dense lipoproteins (sdLDL) concentrations. Also, a decrease in concentration of high-density cholesterol (HDL) and normal to moderately elevated low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) are generally observed in these patients.²

Reducing the incidence of cardiovascular events requires the early detection of cardiovascular risk factors (CVRFs), such as LDL-C concentration, nowadays the most important therapeutic target.³ However, it has been demonstrated that lowering LDL-C concentration is not enough to prevent all ischemic events even in patients without CVRFs.⁴ People with LDL-C concentrations lower than 3.4 mmol/L suffer from subclinical atherosclerosis. In fact, it has been shown that in 20% of patients whose treatment results in reductions in LDL-C to 1.81 mmol/L or less continue to show atherosclerotic plaque progression.⁵ Therefore, it seems that measuring LDL-C alone does not provide enough information for CVD early detection, and treatment strategy based on lowering LDL-C concentration would be not enough for preventing all premature ischemic events. Nowadays, in some American scientific societies the LDL-C therapeutic threshold value is simply being lowered.⁶ Nevertheless, the latest data suggest that LDL-C, by itself, cannot explain all aspects of atherosclerotic disease,^{7,8} summarizing that LDL-C is not a good predictor of cardiovascular events in all cases.⁹

The number of particles, their size, and cholesterol concentration in different subclasses of lipoproteins are three factors that could be useful to estimate the residual cardiovascular risk unexplained by LDL-C concentrations alone.⁸⁻¹⁰ It is well known that sdLDL particles are more atherogenic. Due to their small size and high density, these particles can easily infiltrate the vascular endothelium and promote atheroma formation.¹¹ The concentration of cholesterol derived from sdLDL (sdLDL-C) particles is related to the thickening of the intima media^{7,12} and to a higher risk of cardiovascular disease.^{13,14} Despite sdLDL particles are considered a new CVRF and its measurement is recommended by guidelines, sdLDL analyses are not being easily implemented in the clinical routine.¹⁵ The principal reason is that quantifying sdLDL concentration is expensive and time consuming. An alternative method using Magnesium Heparin as surfactant was developed to precipitate lipoproteins in a way that facilitates the enrichment of sdLDL particles.¹⁶

It was well known that divalent cations and polyanions precipitate apolipoprotein B containing lipoproteins. Basing in this fact, Hirano et al tested different combinations of polyanion and divalent cations and compared the results with the reference method, the ultracentrifugation. They achieved to find the combination which showed the best correlation with results obtained by the ultracentrifugation.

They concluded that the combination of 150 U/mL Heparin-Na and 90 mmol/L MgCl₂ allow to precipitate selectively lipoproteins with density <1.044 g/mL.

However, until 2017 there were not reference values established by this method.¹⁷

Nuclear magnetic resonance (NMR) can be used to estimate the number and diameter of lipoprotein particles from different subclasses.^{18,19} This method is consolidated to measure LDL particles number (LDL-P) and their diameters (LDL-Z). However, discrepancies are often observed between LDL-P and the concentration of cholesterol derived from these particles (LDL-C).²⁰⁻²² LDL-P is more linked to atherothrombosis and is a better predictor of coronary events than LDL-C alone in some cases.^{13,23} NMR lipid profile provides better risk stratification for subclinical atherosclerosis than traditional lipid profile.²⁴ New consensus guides for cardiovascular risk assessment recommend that lipid-lowering therapies should be guided by LDL-P and not by LDL-C.²⁵

Taking into account the literature, LDL-P has been established as a predictor of cardiovascular events. However, the relationship between LDL-P, LDL-Z, and LDL-C is still unclear.

The aim of this study is to investigate the relationship between sdLDL-C obtained by precipitation and characteristics established by NMR in order to know whether performing the sdLDL-C concentration measurement could be useful as a complementary tool in cardiovascular risk assessment.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Subjects

Eighty-five patients from a population selected in Reus (Spain) and Clermont-Ferrand (France) were included in this study. All 85 participants were 19- to 75-year-old male non-smokers who were enrolled in the VITAGE study. The exclusion criteria were as follows: enolism and history of familial hypercholesterolemia and chronic diseases, such as diabetes, cancer, heart failure, and arterial hypertension. Demographic and dietary variables were collected using a questionnaire. These variables included: age, BMI, systolic and diastolic blood pressure, alcohol consumption (g/d), and diet (kcal/d). Informed consent was obtained from all participants, after which blood samples were drawn. Samples were collected in tubes containing the anticoagulant EDTA-K4 and were centrifuged immediately for 15 minutes at 1500 g and at 4°C. The plasma was separated and stored at -80°C until analyzed. In order to guarantee the study reliability, all measurements, which differ from the results obtained before samples freezing more than 3% for Cholesterol and 4% for HDL, were excluded of the study.

The research protocol was approved by the ethics committees of both participating hospitals.

Each patient had their biochemical profiles assessed. This included plasma concentrations of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutamate-pyruvate transaminase

(GPT), creatinine, c-reactive protein (CRP), albumin, transthyretin, glucose, Free Fatty Acids (FFAs), polyunsaturated fatty acids (PUFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), fibulin (Fib), vitamin A (Vit A), and vitamin E (Vit E). A complete lipid profile for each patient was also attained including plasma concentrations of cholesterol, very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C), intermediate-density lipoprotein cholesterol (IDL-C), triglycerides (Tg), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), apolipoprotein A (ApoA-I), apolipoprotein B (ApoB), apolipoprotein E (ApoE), apolipoprotein CIII (ApoCIII), and lipoprotein A (LPA). In addition, atherogenic indices were calculated using the following formula: IA = LDL-C/HDL-C. LDL-Z and LDL-P and sdLDL-C were also measured (Table 1).

2.2 | Determining sdLDL-C

As a first step, sdLDL particles were isolated. This was carried out using a previously reported precipitation method adapted for use in our laboratory to process samples containing elevated concentrations of triglycerides. This method has been validated comparing the results obtained with the reference method, the ultracentrifugation.^{16,17} Interassay imprecision of the precipitation method was calculated measuring 10 aliquots of 2 samples, one of them with pathological values of sdLDL-c and the other one with values within the reference interval for sdLDL-c. The study has been carried out during 2 weeks, and the aliquots were stored at -80°C . Interassay imprecision estimated by the variation coefficient (CV %) was 9%, 2%.

The surfactant magnesium heparin was prepared as a solution of 150 U/mL of Heparin- Na^+ (Sigma Aldrich H3393) and 90 mmol/L of MgCl_2 . 300 μL of Magnesium Heparin was added to each 300 μL of plasma and incubated for 10 minutes at 37°C . The mixture was then kept at 0°C for 15 minutes and centrifuged in at 21 913 g for 15 minutes at 4°C (6K15 SIGMA centrifuge). At this point, lipoproteins with a density <1.044 g/mL were precipitated. The supernatant contained HDL and sdLDL particles that had densities of between 1.044 and 1.063 g/mL. Supernatant HDL-C and total cholesterol were measured using a Cobas 8000 modular analyzer (Roche[®] Diagnostics by homogeneous assays. The linearity range for cholesterol (Cholesterol gen.2) is 0.08-20.7 mmol/L and for HDL (HDL-Cholesterol plus 3rd generation) is 0.08-3.12 mmol/L.

Cholesterol concentration is determined enzymatically using cholesterol esterase and cholesterol oxidase in Cobas 701, Roche Diagnostics[®]. HDL is also determined by a homogeneous enzymatic assay in Cobas 701, which involves the same enzymes modified with polyethyleneglycol (HDL-Cholesterol plus 3rd generation). In these conditions, hydrogen peroxide is liberated and oxidizes 4-aminoantipyrine to a quinoneimine, which is directly proportional to HDL concentration.

Since supernatant only contained HDL and sdLDL particles, the sdLDL-C was calculated by subtracting the HDL-C from the total cholesterol concentration.

TABLE 1 Demographic variables and lipid and biochemical profile

Variable	Units	Average (range)
Age	years	45.8 (19-75)
BMI	kg/cm ²	25.1 (19.3-30)
Systolic pressure	mm Hg	124 (100-140)
Diastolic pressure	mm Hg	78 (60-96)
Alcohol	g/d	13 (0-100)
Diet	kcal/d	2240 (999-4347)
ALT	$\mu\text{kat/L}$	0.40 (0.16-1.55)
AST	$\mu\text{kat/L}$	0.39 (0.25-0.80)
GPT	$\mu\text{kat/L}$	0.35 (0.1-1.3)
Creatine	$\mu\text{mol/L}$	91.2 (57-120)
CRP	mg/L	6.2 (6-28.3)
Albumin	mg/L	44 (34-49)
TTR	g/L	0.28 (0.19-0.37)
Glucose	mmol/L	5.3 (4.2-6.8)
Fib	ng/L	0.48 (0-2)
Vit A	$\mu\text{mol/L}$	1.81 (1.15-2.81)
Vit E	$\mu\text{mol/L}$	30.12 (18.14-48.42)
Cholesterol	mmol/L	1.67 (1.13-2.63)
Tg	mmol/L	0.47 (0.52-2.76)
LDL-C	mmol/L	2.65 (1.40-4.28)
HDL-C	mmol/L	1.27 (0.76-2.39)
IDL-C	mmol/L	0.19 (0.01-0.56)
VLDL-C	mmol/L	0.32 (0.06-1.62)
Apo A	mg/dL	129.8 (95-195)
Apo B	mg/dL	72.2 (37-122)
Apo E	mg/dL	3.49 (1.6-5.8)
Apo CIII	mg/dL	16.03 (9.4-22.8)
Lpa	mg/L	25.22 (2-144)
FFAs	ng/mL	10 802 (6929-21506)
PUFAs	ng/mL	16.08 (6.19-52.49)
MUFAs	ng/mL	49.90 (22.62-80.32)
AI	n.a.	2.20 (1.04-4.80)
LDL-Z	nm	21.13 (19.1-22.7)
LDL-P	nmol/L	684 (0-2432)
sdLDL-C	nmol/L	350 (0-1260)

Abbreviations: AI = LDL-C/HDL-C, atherogenic index; ALT, alanine amino transferase; ApoA-I, apolipoprotein A; ApoB, apolipoprotein B; ApoCIII, apolipoprotein CIII; ApoE, apolipoprotein E; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; CRP, c-reactive protein; FFA, free fatty acids; Fib, fibulin; GPT, glutamate-pyruvate transaminase; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; IDL-C, intermediate-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; LDL-P, particle concentration; LDL-Z, LDL diameter; Lpa, lipoprotein A; MUFAs, monounsaturated fatty acids; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; sdLDL-C, small, dense LDL cholesterol concentration; Tg, triglycerides; TTR, transthyretin; Vit A, vitamin A; Vit E, vitamin E; VLDL-C, very low-density lipoprotein.

2.3 | NMR characterization of LDL particles

The NMR analyses were carried out with the Vantera[®] analyzer (LipoScience, Inc). This equipment is approved for in vitro diagnoses by the US Food and Drug Administration (FDA). This technique was used to determine the LDL diameters and estimate particle concentrations (LDL-Z and LDL-P). NMR spectra were acquired by 400 MHz 1H NMR spectrometers included in the Vantera Clinical Analyzer. The methyl signal envelope appearing between 0.718 and 0.914 ppm was analyzed using the LipoProfile-3 algorithm. The contribution of each subcomponent was determined by linear least squares. Results were expressed as LDL-P in nmol/L and LDL-Z in nm.²⁶

2.4 | Statistical analyses

2.4.1 | Validation of precipitation technique to measure sdLDL-C

First of all, a correlation study was carried out in order to assess the association between LDL-Z, LDL-p, and sdLDL-C by precipitation. The NMR lipid profile data are used as the gold standard. Outliers were identified using the Bland-Altman concordance analysis of paired data. The association of sdLDL-C with LDL-Z and LDL-P was determined by calculating the Pearson correlation coefficient (r_{xy}) with a confidence interval of 95% [95% CI] as well as levels of significance.

2.4.2 | Assessing the impact of a set of clinical and biochemical variables on sdLDL concentration

To study the relation between LDL-Z and sdLDL-C, a multivariate regression analysis adjusted for control variables was performed. Here, the dependent variable (Y) was the sdLDL-C, and the independent variable (X) was LDL-Z.

Those variables which contribute significantly to the sdLDL-C concentration in univariate analysis were included in the multivariate model. Significance levels were set to 0.05.

By using correlation matrices and calculating Spearman correlation coefficients (ρ), collinearities between variables were evaluated. Those variables with a $\rho > 0.5$ were discarded. A multivariate regression model was constructed using the selected variables. The adjusted coefficient of determination (adjusted R^2) was calculated to determine the proportion of variation in sdLDL-C concentration that could be explained by the adjusted model. B and β coefficients were used to assess the contribution of each variable to the multivariate regression model. A higher β coefficient was indicative of a greater contribution.

The analysis was adjusted for the control variables. The SPSS v.17.0 software package was used in all statistical analyses. Results with a P -value $< .05$ were considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Subjects

All 85 participants included in the study completed a questionnaire. Demographic, biochemical, and lipid variables are listed in Table 1. The average age was 45.8 (19-75) years.

3.2 | Validation of precipitation technique to measure sdLDL-C

Only three outliers were discarded. The correlation study showed that there was a direct linear association between sdLDL-C and LDL-P ($r_{xy} = 0.687$ [0.555-0.785]; $P = 2.1 \times 10^{-7}$, (Figure 1). In addition, there was an inverse association between sdLDL-C and LDL-Z ($r_{xy} = -0.603$ [-0.723-0.447]; $P = 1.6 \times 10^{-12}$; (Figure 2). Both associations were statistically significant.

3.3 | Impact of a set of clinical and biochemical variables on sdLDL concentration

To evaluate the impact between a set of clinical and biochemical variables on sdLDL, a multivariate analysis was carried out. Results of the univariate analysis are laid out in Table 2. Variables found to be significant in the univariate analyses were BMI, ALT, Vit E, Tg, LDL-C, HDL-C, VLDL-C, IDL-C, ApoA-I, ApoB, ApoE, ApoCIII, FFAs, and LDL-Z. These variables were included in the multivariable model. By convention, age was also included.

Three pairs of variables were found to be collinear. These were as follows: LDL-C and ApoB; VLDL-C and Tg; and HDL-C and ApoA-I. LDL-C, VLDL-C, and ApoA-I contribute less to sdLDL-C concentration variations and were excluded in later analyses.

The multivariate regression model was found to be significant ($P = 8.77 \times 10^{-12}$; $R^2 = 0.568$). The model explains 56.8% of sdLDL-C variation. Regression coefficients were calculated for each variable included in the multivariate analysis (see Table 3). B values were significant for BMI, ApoB, Tg, FFAs, and LDL-Z. ApoB and sdLDL-C concentrations were the two variables, which contributed most to the model ($\beta = 0.415$) and LDL-Z ($\beta = -0.394$). The way of LDL-Z significantly influence on sdLDL-C concentration is by a 1nm increase in LDL-Z leads to a 126 nmol/L reduction in sdLDL-C concentration.

4 | DISCUSSION

In this article, we investigated the relationship between the cholesterol derived from precipitated sdLDL particles (sdLDL-C) and the characteristics of LDL lipoproteins, measured by NMR. From a cohort of 85 frozen samples belonging to men enrolled in the VITAGE study,²⁷ the sdLDL-C concentration was measured and its association with all variables collected was investigated.

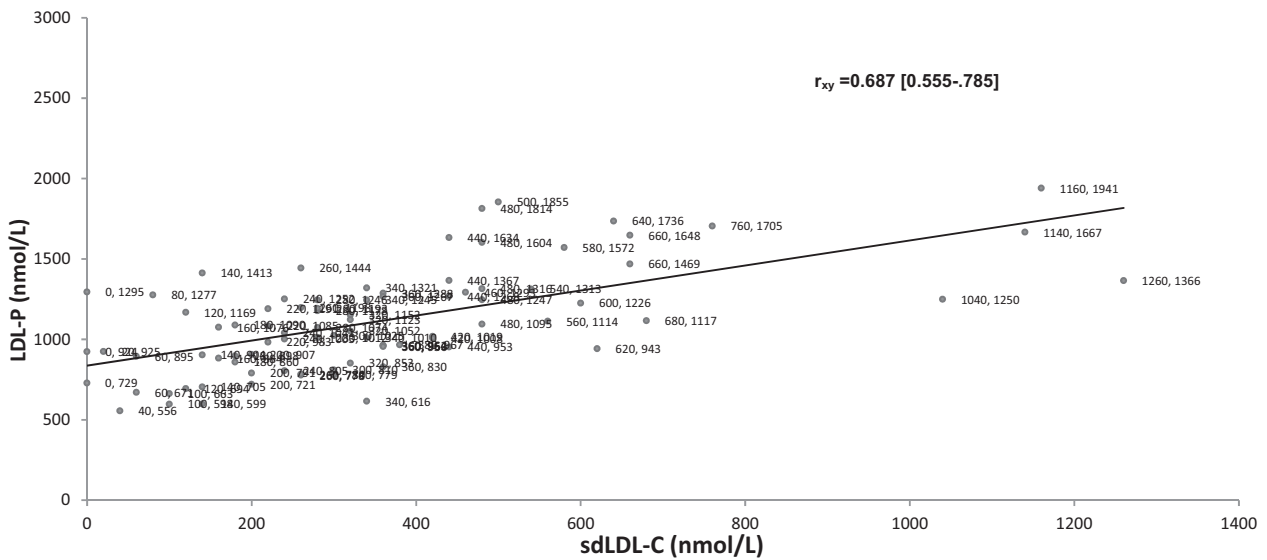


FIGURE 1 Association between sdLDL-C and LDL-P

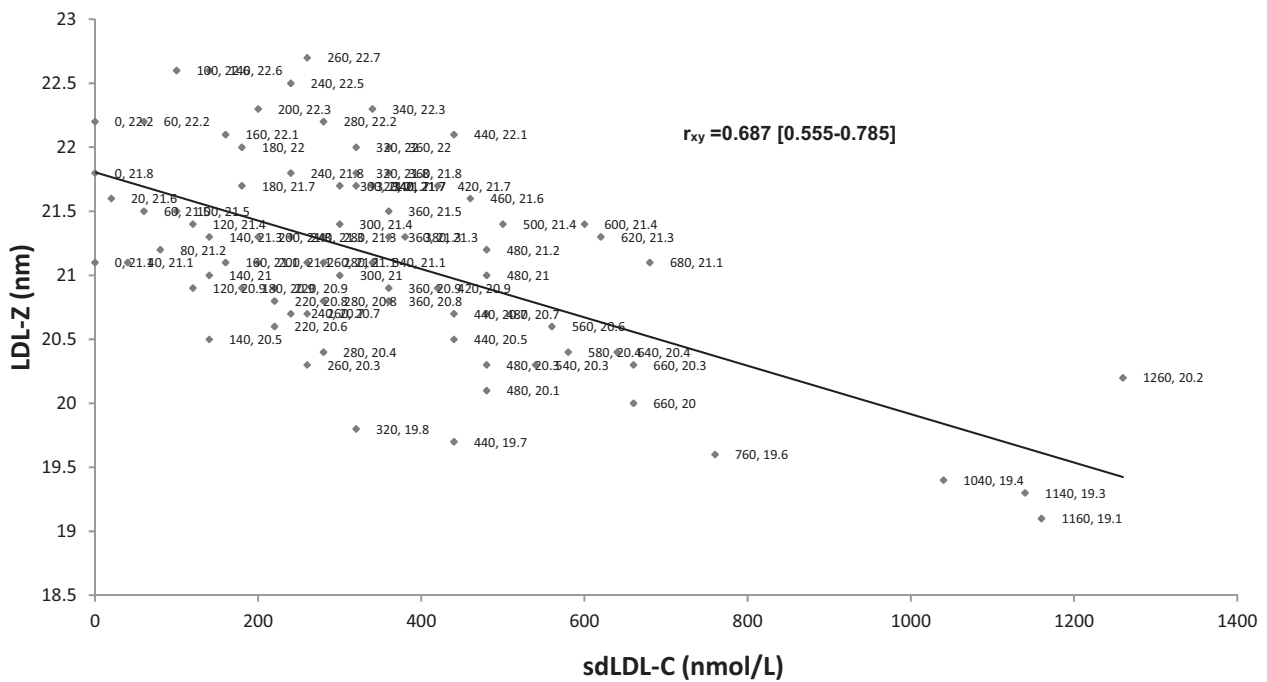


FIGURE 2 Association between sdLDL-C and LDL-Z

In Tables 1 and 2, some characteristic of population studied are shown. In table 1, means and ranges of each variable included in VITAGE study can be seen. Means and ranges from each variable are representative of general population.

With these data, the principal aim of this study was to investigate the relationship between all these characteristics and the concentration of sdLDL-C obtained by precipitation.

Firstly, a correlation study was carried out as a tool to assess the validity of the precipitation method. As shown in Figures 1 and

2, there was a direct linear association between sdLDL-C and LDL-P ($r_{xy} = 0.687 [0.555-0.785]$; $P = 2.1 \times 10^{-7}$). Besides, there was an inverse association between sdLDL-C and LDL-Z ($r_{xy} = -0.603 [-0.723-0.447]$; $P = 1.6 \times 10^{-12}$). Both were statistically significant associations.

The strong positive association between sdLDL-C and LDL-P proves that the cholesterol isolated by the precipitation method represents a great part of the cholesterol contained in sdLDL particles as determined by NMR. Therefore, it could be that by

TABLE 2 Univariate regression analyses results

Variable	B	P
Age (y)	0.18	.174
BMI (kg/cm ²)	23.30	.04
Systolic pressure (mm Hg)	-1.350	.755
Diastolic pressure (mm Hg)	2.859	.571
Alcohol (g/d)	0.62	.8
Diet (kcal/d)	0.073	.925
ALT (μkat/L)	323.063	.021
AST (μkat/L)	414.234	.087
GPT (μkat/L)	210.727	.167
Creatinine (μmol/L)	2.248	.500
CRP (mg/L)	1.167	.648
Albumin (mg/L)	1.163	.942
TTR (g/L)	1.614	.070
Glucose (mmol/L)	4.585	.487
Fib (ng/L)	23.233	.063
Vit A (μmol/L)	-21.507	.062
Vit E (μmol/L)	-15.525	.001
Cholesterol (mmol/L)	113.001	.059
Tg (mmol/L)	374.575	5.43 × 10 ⁻¹³
LDL-C (mmol/L)	135.64	.01
HDL-C (mmol/L)	-445.004	.06 × 10 ⁻⁶
IDL-C (mmol/L)	414.234	5.63 × 10 ⁻⁵
VLDL-C (mmol/L)	688.12	1.02 × 10 ⁻⁹
Apo A (mg/dL)	-5.036	0.002
Apo B (mg/dL)	10.55	2.83 × 10 ⁻⁸
Apo E (mg/dL)	77.65	.04
Apo CIII (mg/dL)	28.064	.001
Lpa (mg/L)	1.538	.376
FFAs (ng/mL)	0.077	6.26 × 10 ⁻⁹
PUFAs (ng/mL)	2.498	.988
MUFAs (ng/mL)	0.598	.476
IA	240.718	.078
LDL-Z (nm)	-185.137	1.02 × 10 ⁻⁹

Abbreviations: AI = c-LDL/c-HDL, atherogenic index; ALT, alanine amino transferase; ApoA-I, apolipoprotein A; ApoB, apolipoprotein B; ApoCIII, apolipoprotein CIII; ApoE, apolipoprotein E; AST, aspartate aminotransferase; B, regression coefficient; BMI, body mass index; c-HDL, high-density lipoprotein cholesterol; c-IDL, intermediate-density lipoprotein cholesterol; c-LDL, low-density lipoprotein cholesterol; CRP, c-reactive protein; c-VLDL, very low-density lipoprotein; FFA, free fatty acids; Fib, fibulin; GPT, glutamate-pyruvate transaminase; LDL cholesterol; Tg, triglycerides; LDL-P, particle concentration; LDL-Z, LDL diameter; Lpa, lipoprotein A; MUFAs, monounsaturated fatty acids; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; sdLDL-C, small dense; TTR, transthyretin; Vit A, vitamin A; Vit E, vitamin E.

measuring sdLDL-C, LDL-P can be estimated. On the other hand, the negative association between in sdLDL-C concentration and LDL size indicates that people that have smaller particles have

TABLE 3 Regression coefficients for the variables included in the multivariate model

Variable	B [95% CI]	β	P
Age (y)	0.169 [-2.627 a 2.966]	0.011	.904
BMI (kg/cm ²)	0.016 [0.032 a 0.114]	0.175	.048
ALT (μkat/L)	78.172 [-95.288 a 251.631]	0.068	.372
Vit E (μmol/L)	-8.780 [-20.717 a 3.158]	-0.230	.147
Tg (mmol/L)	0.182 [0.391 a 0.325]	0.352	.013
HDL-C (mmol/L)	-10.388 [-248.315 a 227.539]	-0.013	.931
IDL-C (mmol/L)	245.684 [-769.679 a 278.312]	0.080	.353
Apo B (mg/dL)	0.071 [0.025 a 0.116]	0.415	.003
Apo E (mg/dL)	3.997 [-70.137 a 62.142]	-0.011	.904
Apo CIII (mg/dL)	10.638 [-27.980 a 6.702]	0.132	.225
FFAs (ng/mL)	0.001 [-0.004 a 0.061]	0.264	.084
LDL-Z (nm)	-126 [-212 a -396]	-0.394	.005

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; ApoB, apolipoprotein B; ApoCIII, apolipoprotein CIII; ApoE, apolipoprotein E; B, regression coefficient at a 95% confidence interval or CI 95%; BMI, body mass index; c-HDL, high-density lipoprotein cholesterol; c-IDL, intermediate-density lipoprotein; FFAs, free fatty acids; LDL-Z, LDL diameter; Tg, triglycerides; Vit E, vitamin E; β, standardized regression coefficient.

more cholesterol transported by them. To summarize, these first results confirm that there is an association between LDL characteristics obtained by NMR and cholesterol measured after isolating sdLDL by precipitation.

Taking into account these results, it would be interesting to study whether it is possible to estimate the presence of particles of small size and its number by measuring sdLDL-C.

According to recent articles, it seems that the presence of an elevated number of sdLDL particles is a clear risk. In fact, the Horteaga-Liposcale Follow-up study²³ found an association between the presence of lipoproteins with small and medium size and the increased cardiovascular risk, especially of coronary heart disease.

This is particularly important due to the fact that discordance between LDL-C and LDL-P has been described in some cases.^{20,21} The discordance is due to the fact that cholesterol concentration in these particles varies depending on the size of the different LDL subclasses.²⁰⁻²² Especially relevant is the MESA study.²² This study has demonstrated the discordance between LDL-C and LDL-P and its relationship with the development of atherosclerosis and coronary events.

In another study (clinical trial), it has been found that in women with discordant LDL-related measures, coronary risk could be overestimated or underestimated when LDL-C concentration was considered alone.²⁰ Recently, Tsai MY et al have demonstrated that sdLDL-C concentration measured by Denka Seiken automated assay is associated with CHD events independent of LDL-C concentration. Clinically, they found that sdLDL-C assessment would be more beneficial in patients with intermediate CHD risk, since they could be benefit from intensive treatments.²⁸

On account of these studies, LDL-C concentration is not enough to estimate the cardiovascular risk in patients in which LDL-C goals are achieved but elevated concentration of sdLDL particles is found. Keeping in mind this fact, it would be really interesting to know this information through a simple, fast, and inexpensive method. In a recent study, it was demonstrated that in patients with elevated LDL-P the risk of a CHD event increased, and patients undergoing LDL-P measurements were more likely to receive more aggressive lipid-lowering therapy and had a lower cardiovascular risk than a cohort in which just LDL-C was measured.^{28,29}

Considering the results from this first study, a regression analysis was performed. The main objective of this second part is to assess the impact of a set of clinical and biochemical variables on sdLDL concentrations. In Table 2, all univariate regressions between sdLDL-C concentration and each variable are shown. Only those significant variables ($P < .05$) were included in the multivariate analysis: age, BMI, ALT, vitamin E, and concentrations of HDL, IDL, ApoB, Apo E, Apo CIII, FFAs, and LDL-Z. Once the variables were included in the multivariate analysis, only TG, LDL-Z, FFA and ApoB concentration continued to be significant (see Table 3).

The final multivariate model is summarized in Table 3. It explains a 57% of sdLDL-C variation. The major contributors in the model are ApoB and LDL-Z. This is a coherent result because sdLDL particles are formed by cholesterol and a single ApoB molecule. However, LDL-C was not finally included in the last model due to its collinearity with apoB and minor significance. Extrapolating to clinical practice, these results agree with literature, since they imply that there are individuals with a normal LDL-C and a high sdLDL-C and vice versa.²⁰ The discordance phenomenon could be present in people with low LDL-C concentration, even in people who achieve LDL-C goals.^{20,21}

Regarding the relation between sdLDL-C concentration variation and LDL-Z, we found that an increase in the diameter of LDL particles implies a decrease in sdLDL-C concentration. Importantly, taking into account the multivariate regression, an increment of 1 nm in LDL size leads to a 126 nmol/L reduction in sdLDL-C concentration. As a consequence, smaller LDL particles contain a higher concentration of cholesterol. Due to its composition, smaller LDL particles would support the formation and progression of the atheroma plaques in higher degree than larger ones. Considering the relationship between sdLDL particles and the development of atherosclerosis, sdLDL-C should be thoroughly investigated as a novel predictor of premature ischemic events. Therefore, when NMR is not available, measuring sdLDL-C concentration could be a reliable tool for diagnosis risk stratification instead of LDL-C measurement. Implementing this method in clinical laboratories is easy since it does not require the acquisition of new equipment nor does it require specialized training. It could be especially important in cases as premature cardiovascular disease, or in patients under lipid-lowering therapy with high cardiovascular CVR who achieve LDL-C goals.

Finally, it is also important to consider the contribution of significant variables as Tg, BMI, and FFAs in the multivariate model. All of

these are linked to atherogenic dyslipidemia, which is well-related to the presence of sdLDL particles. Individuals with a high BMI have an excess of FFA, which in turn leads to a high concentration of Tg. An elevated concentration of Tg leads to increased formation of sdLDL particles. Consequently, the concentration of Tg influences sdLDL-C more than it does LDL-C; reviewing the most relevant articles, we could deduce that the LDL-C reducing therapies should not be the only therapeutic strategy for preventing atherothrombosis events. Other factors should be considered, such as Tg concentration, which implies sdLDL particles formation.

Only significant variables from the univariate analyses were used to construct the multivariate model.

Vitamin E concentration is relevant even though it was not included in the multivariate model. However, Vit E contribution to variations in sdLDL-C was more significant than other lipid variables directly related to the formation of sdLDL particles such as IDL-C. Vit E is an antioxidant primarily transported by LDL particles. The oxidation resistance of these particles will depend on their carrying antioxidants such as Vit E.³⁰ We have verified that there is an inverse relationship between Vit E and sdLDL-C. However, a study should be carried out to determine whether a Vit E deficiency favors the formation of sdLDL particles. In addition, we should find out whether Vit E deficiency is the reason why sdLDL particles have a greater tendency to undergo oxidation and give rise to more unstable atheromas, which increase the risk of ischemic events.³¹

To summarize, it is important to emphasize the fact that the number of articles that show the lack of concordance between the LDL-C and the number of sdLDL particles is increasing, and it must be taken into account to explore residual cardiovascular risk. In cases when NMR is not available, to determine the sdLDL-C concentration could be a good strategy to carry out.

5 | CONCLUSION

This study demonstrates that the cholesterol contained in sdLDL measured by an easy and inexpensive method is related to the particle size determined by NMR independently of a great number of variables. Taking into account the necessity of improving risk stratification in cases when LDL-C determination is not enough, when NMR is not available, to quantify the cholesterol concentration in sdLDL particles can be a reliable alternative to estimate residual cardiovascular risk.

ACKNOWLEDGMENTS


The authors thank CERCA Program/Generalitat de Catalunya for providing institutional support. This study was funded by Hospital Universitari de Bellvitge, part of the Institut Català de la Salut (ICS) and Department of Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine, Autonomous University of Barcelona (UAB), Barcelona, Spain.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BFC and BCE involved in design of the study, experimental part, and writing and revising full article; JR and ER contributed to select

population, experimental part, and revising full article; MGG, APM, and PA involved in revising full article; NA involved in experimental part and revising full article; XPS involved in writing and revising full article.

ORCID

Beatriz Candás-Estébanez  <https://orcid.org/0000-0001-9154-5193>

REFERENCES

1. Baber U, Mehran R, Sartori S, et al. Prevalence, impact, and predictive value of detecting subclinical coronary and carotid atherosclerosis in asymptomatic adults: the BiImage study. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:1065-1074.
2. Cabrera M, Sánchez-Chaparro MA, Valdivielso P, et al. Prevalence of atherogenic dyslipidemia: association with risk factors and cardiovascular risk in Spanish working population. "ICARIA" study. *Atherosclerosis*. 2014;235(2):562-569.
3. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: the Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2016;37:2315-2381.
4. Berry JD, Liu K, Folsom AR, et al. Prevalence and progression of subclinical atherosclerosis in younger adults with low short-term but high lifetime estimated risk for cardiovascular disease: the coronary artery risk development in young adults' study and multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation*. 2009;119:382-389.
5. Fernández-Friera L, Fuster V, López-Melgar B, et al. Normal LDL-Cholesterol levels are associated with subclinical atherosclerosis in the absence of risk factors. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(24):2979-2991.
6. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Guidelines for management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. *Endocr Pract*. 2017;23(Suppl 2):1-87.
7. Li G, Wu HK, Wu XW, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol and cholesterol ratios to predict arterial stiffness progression in normotensive subjects over a 5-year period. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):27.
8. Lawler PR, Akinkuolie AO, Harada P, et al. Residual Risk of atherosclerotic cardiovascular events in relation to reductions in very-low-density lipoproteins. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(12):e007402.
9. Pallares-Carratala V, Navarro-Perez J, Valls-Roca F, et al.; ESCARVAL Study Group. Lipid profile, cardiovascular disease and mortality in a Mediterranean high-risk population: the ESCARVAL-RISK study. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186196.
10. Shiffman D, Louie JZ, Caulfield MP, Nilsson PM, Devlin JJ, Melander O. LDL subfractions are associated with incident cardiovascular disease in the Malmö prevention project study. *Atherosclerosis*. 2017;263:287-292.
11. Phillips CM, Perry IJ. Lipoprotein particle subclass profiles among metabolically healthy and unhealthy obese and non-obese adults: does size matter? *Atherosclerosis*. 2015;242(2):399-406.
12. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(5):1069-1077.
13. Mora S, Otvos JD, Rifai N, Rosenson RS, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation*. 2009;119:931-939.
14. Nishikura T, Koba S, Yokota Y, et al. Elevated small dense low-density lipoprotein cholesterol as a predictor for future cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21(8):755-767.
15. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third REPORT of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106(25):3143-3421.
16. Hirano T, Ito Y, Saegusa H, Yoshino G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J Lipid Res*. 2003;44(11):2193-2201.
17. Fernández-Cidón B, Padró-Miquel A, Alía-Ramos P, et al. Reference values assessment in a Mediterranean population for small dense low-density lipoprotein concentration isolated by an optimized precipitation method. *Vasc Health Risk Manag*. 2017;13:201-207.
18. Matyus SP, Braun PJ, Wolak-Dinsmore J, et al. NMR measurement of LDL particle number using the Vantera Clinical Analyzer. *Clin Biochem*. 2014;47(16-17):203-210.
19. Mallol R, Amigó N, Rodríguez MA, et al. Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered 1H NMR spectroscopy. *J Lipid Res*. 2015;56(3):737-746.
20. Otvos JD, Mora S, Shalaurova I, Greenland P, Mackey RH, Goff DC Jr. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *J Clin Lipidol*. 2011;5:105-113.
21. Degoma EM, DavisMD DRL, Mohler ER III, Greenland P, French B. Discordance between non-HDL-cholesterol and LDL-particle measurements: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013;229:517-523.
22. Mackey RH, Greenland P, Goff DC Jr, Lloyd-Jones D, Sibley CT, Mora S. High-density lipoprotein cholesterol and particle concentrations, carotid atherosclerosis, and coronary events: MESA (multi-ethnic study of atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:508-516.
23. Pichler G, Amigó N, Tellez-Plaza M, et al. LDL particle size and composition and incident cardiovascular disease in a South-European population: the Hortega-Liposcale follow-up study. *Int J Cardiol*. 2018;264:172-178.
24. Würtz P, Raiko JR, Magnussen CG, et al. High-throughput quantification of circulating metabolites improves prediction of subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2012;33:2307-2316.
25. Cole TG, Contois JH, Csako G, et al. Association of apolipoprotein B and nuclear magnetic resonance spectroscopy-derived LDL particle number with outcomes in 25 clinical studies: assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clin Chem*. 2013;59:752-77026.
26. Matyus SP, Braun PJ, Wolak-Dinsmore J, et al. NMR measurement of LDL particle number using the Vantera Clinical Analyzer. *Clin Biochem*. 2014;47(16-17):203-210.
27. Vasson MP, Farges MC, Goncalves-Mendes N, et al. Does aging affect the immune status? A comparative analysis in 300 healthy volunteers from France, Austria and Spain. *Immun Ageing*. 2013;10(1):38.
28. Tsai MY, Steffen BT, Guan W, et al. New automated assay of small dense low-density lipoprotein cholesterol identifies risk of coronary heart disease: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(1):196-201.
29. Toth PP, Grabner M, Puneekar RS, Quimbo RA, Cziraky MJ, Jacobson TA. Cardiovascular risk in patients achieving low-density

- lipoprotein cholesterol and particle targets. *Atherosclerosis*. 2014;235(2):585-591.
30. Rashidi B, Hoseini Z, Sahebkar A, Mirzaei H. Anti-Atherosclerotic effects of vitamins D and E in suppression of atherogenesis. *J Cell Physiol*. 2017;232(11):2968-2976.
 31. Nishi K, Itabe H, Uno M, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(10):1649-1654.

How to cite this article: Fernández-Cidón B, Candás-Estébanez B, Ribalta J, et al. Precipitated sdLDL: An easy method to estimate LDL particle size. *J Clin Lab Anal*. 2020;34:e23282. <https://doi.org/10.1002/jcla.23282>

3. Tercer estudio: *Physicochemical Properties of Lipoproteins Assessed by Nuclear Magnetic Resonance as a Predictor of Premature Cardiovascular Disease. PRESARV-SEA Study*

3.1 Cita al estudio publicado: Fernández-Cidón B, Candás-Estébanez B, Gil-Serret M, Amigó N, Corbella E, Rodríguez-Sánchez MÁ, Padró-Miquel A, Brotons C, Hernández-Mijares A, Calmarza P, Jarauta E, Brea AJ, Mauri M, Guijarro C, Vila À, Valdivielso P, Corbella X, Pintó X. *Physicochemical Properties of Lipoproteins Assessed by Nuclear Magnetic Resonance as a Predictor of Premature Cardiovascular Disease. PRESARV-SEA Study*. J Clin Med. 2021 29;10(7):1379.

3.2 Presentación

A pesar de los avances en la prevención de las ECV, los eventos isquémicos prematuros se siguen produciendo. Las actuales recomendaciones de prevención cardiovascular se basan en la detección y tratamiento precoz de los FRCV y entre ellos se ha prestado especial atención a la disminución de la concentración de C-LDL, sobre todo con estatinas; una visión C-LDL *centralista*. Sin embargo, en el estudio MESA se demostró la presencia de aterosclerosis subclínica en individuos con C-LDL inferior a 1.8 mmol/L (34). Este estudio, puso de manifiesto que las estrategias que se centran únicamente en la disminución de la concentración de C-LDL no son suficientes para prevenir los eventos isquémicos. Por este motivo estudiar nuevos FRCV que nos permitan profundizar en la comprensión del desarrollo de la enfermedad aterosclerótica es imperativo para entender el riesgo cardiovascular residual.

En este contexto, el perfil lipídico avanzado ha demostrado ser útil en la caracterización del riesgo cardiovascular residual, especialmente asociado a la dislipemia aterogénica (128). En diversos estudios se ha verificado la discordancia que existe entre C-LDL y LDL-P, y publicaciones recientes establecen como diana terapéutica un LDL-P inferior a 1000 nmol/L, cuando se han alcanzado los objetivos de C-LDL (79). Actualmente es objeto de estudio el efecto de otras lipoproteínas y sus subfracciones, en el riesgo cardiovascular residual y en las ECV. Un ejemplo de ello son las HDL. Sin embargo, se desconoce cuáles son las alteraciones del perfil lipídico avanzado que subyacen a la enfermedad aterosclerótica prematura. Un mayor profundizaje en el conocimiento de las disfunciones en las lipoproteínas y sus subfracciones facilitaría la detección y, por tanto, la prevención de los eventos isquémicos prematuros (104).

En este contexto, y siguiendo las líneas de sinergia con otros grupos de investigación que estudien en el RCVR, surge la colaboración con el proyecto PRESARV-SEA. Este proyecto tiene como objetivo ahondar en las bases bioquímicas de la aterosclerosis prematura en una población que incluye pacientes con historia previa de eventos isquémicos prematuros.

El objetivo de nuestro grupo de trabajo es determinar si algunos biomarcadores del perfil lipídico avanzado podrían ser predictores de eventos isquémicos prematuros y contribuir de esta forma a caracterizar el riesgo cardiovascular residual de estos pacientes.

3.3 Resultados y discusión

Para llevar a cabo este estudio se analizó el perfil lipídico avanzado de 125 pacientes con historia previa de eventos isquémicos antes de los 50 años pertenecientes al estudio PRESARV-SEA y de 190 individuos aparentemente sanos sin antecedentes de ECV. El 93% de los pacientes del grupo de estudio estaban en tratamiento con estatinas y por tanto la media de la concentración de C-LDL fue de 96.49 mg/dL, significativamente inferior a la del grupo control, sin tratamiento y por debajo del valor objetivo de 100 mg/dL establecido. Sin embargo, el IMC y la concentración de Tg fueron significativamente superiores y el C-HDL significativamente inferior en el grupo de pacientes con respecto al grupo control; estos resultados indican la posible existencia de un riesgo cardiovascular residual no controlado. Estos hallazgos concuerdan con los de otros estudios, como el MESA y el PESA, en los que ya se había demostrado la presencia de aterosclerosis subclínica en individuos con concentraciones normales de C-LDL (33,34)

Se analizaron las muestras de suero de ambos grupos que se conservaron a -80 °C hasta su análisis. Se realizó un estudio lipídico ampliado mediante RMN y se midió también la concentración de C-sLDL. Una vez obtenidos los resultados se compararon las medianas del grupo estudio con las del grupo control. Se observó que existían diferencias significativas entre las subfracciones de las VLDL-P entre los dos grupos. El grupo de pacientes con isquemia prematura presentaba una mayor prevalencia de partículas IVLDL con una tendencia a la significación en su contenido de Tg ($p=0.06$). Estos resultados coinciden con estudios previos donde se ha demostrado que el tratamiento con estatinas no reduce de forma significativa, ni las partículas VLDL, ni sus subfracciones (132). En cuanto a las LDL, se detectan diferencias significativas en los biomarcadores relacionados con estas lipoproteínas determinadas mediante la RMN y también en la concentración de C-sLDL, empleando para cuantificar estas últimas el método de precipitación puesto a punto en nuestro laboratorio. En el caso del C-LDL y LDL-P, la concentración del grupo control es más elevada que la del grupo de pacientes con isquemia prematura, hecho que se explica por la mayor proporción de pacientes tratados con estatinas en este segundo grupo.

Por otro lado, el diámetro de las partículas LDL es mayor en el grupo control. Estos resultados indican partículas más grandes en este grupo, y se confirma con una mayor presencia de ILDL-P con respecto al grupo con eventos isquémicos prematuros. En cuanto a la composición de las

LDL se observa que el grupo control tiene una mayor proporción de Tg y una menor concentración de C-sdLDL. Estos resultados parecen indicar que las estatinas podrían modificar la concentración de C-LDL y LDL-P, pero no serían efectivas para modificar la composición y las características de sus subfracciones más aterogénicas. Estos hallazgos son coherentes con el estudio previo publicado por nuestro grupo. En este estudio se demostró que la variación de la concentración de C-sdLDL estaba muy influida por variables como el IMC y la concentración de AGLs y Tg y por tanto el tratamiento con estatinas podría no ser tan efectivo como cambios en el estilo de vida dirigidos a la pérdida de peso.

Por último, en lo que respecta a las lipoproteínas HDL existen diferencias significativas en sus subfracciones y su contenido en Tg. Las HDL que presentan los individuos del grupo PRESARV-SEA tienen un mayor contenido de Tg. Estas partículas son disfuncionales y pierden su efecto ateroprotector dando lugar a partículas sHDL más lábiles.

En la bibliografía se ha descrito que las partículas de HDL (HDL-P y sHDL-P) están inversamente relacionados con la ECV (132,133). Sin embargo, en este estudio se ha comprobado que el grupo control tiene una mayor concentración de partículas HDL pequeñas (sHDL). El tamaño de las partículas HDL en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica no está bien definido, por tanto, aún deben realizarse más estudios profundizando en el papel de las sHDL en la ECV.

Una vez evaluada la estadística descriptiva en ambos grupos se llevaron a cabo análisis univariantes para establecer la relación entre las variables del perfil lipídico avanzado y la sucesión del evento isquémico. Las variables que influyen de forma estadísticamente significativa en los estudios univariantes son: IVLDL-P($p=0.001$), VLDL-Z($p=3.38 \cdot 10^{-8}$), C-LDL($p=2.90 \cdot 10^{-13}$), Tg-LDL ($p=1.30 \cdot 10^{-8}$), LDL-P($p=7.31 \cdot 10^{-13}$), ILDL-P($p=2.60 \cdot 10^{-12}$), mLDL-P($p=2.41 \cdot 10^{-8}$), sLDL-P($p=1.30 \cdot 10^{-8}$), LDL-Z ($p=1.02 \cdot 10^{-9}$), C-sdLDL($p=0.001$), C-HDL ($p=0.024$), Tg-HDL($p=1.35 \cdot 10^{-25}$), IHDL-P($p=3.25 \cdot 10^{-11}$), mHDL-P($p=2.95 \cdot 10^{-7}$), sHDL-P($p=0.001$) y HDL-Z($p=1.30 \cdot 10^{-10}$). Para descartar colinealidades se calculan los coeficientes de correlación de Spearman(ρ). La variable que influye más significativamente en la sucesión de los eventos isquémicos es Tg-HDL ($p=1.35 \cdot 10^{-25}$). Por tanto, se eliminan todas las variables colineales a ella con $p > 0.5$: IHDL-P, mHDL-P, sHDL-P, HDL-Z, IVLDL-P; LDL-P, mLDL-P, sLDL-P, LDL-Z y C-LDL.

Una vez descartadas estas variables se analizan todas las posibles combinaciones de magnitudes que se incluirán en la regresión logística. Se selecciona el modelo que presenta la mayor bondad de ajuste evaluada con el índice de Hosmer-Leshow (*HL*) y la eficiencia diagnóstica más elevada mediante el análisis de curvas ROC. De todas las combinaciones estudiadas la que mejor cumplía estas especificaciones es el modelo que incluye Tg-HDL, C-sdLDL y ILDL-P. La regresión

logística fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$) y presentó un pseudo- R^2 de Nagelkerke de 0.73; es decir, que el modelo estimado puede predecir el 73% de los eventos isquémicos. Todas las variables mantuvieron la significación en el modelo final y presentaron unas Odds Ratio (OR) de: C-sdLDL (OR=1.002[1.00-1.03]); Tg-HDL (OR=1.62 [1.30-1.76]) y ILDL-P (OR=0,956[0.941-0.967]). Estos resultados indican que el riesgo de sufrir un evento isquémico aumenta el 62% cuando se incrementa 1 mg/dL la concentración de Tg-HDL y se reduce un 4,4% por cada aumento de 1nmol/L de la concentración de ILDL-P, mientras que C-sdLDL apenas contribuye el riesgo.

Cabe destacar que, ni C-LDL, ni LDL-P, han entrado en el modelo, lo que sugiere que no son buenos indicadores del riesgo cardiovascular residual en los pacientes tratados con estatinas que han alcanzado los objetivos terapéuticos de C-LDL. Por otro lado, tanto las subfracciones ILDL-P como las sLDL-P y el colesterol contenido en ellas se han relacionado en estudios previos con el grosor de la íntima media. Las partículas ILDL tienen más dificultad para infiltrarse en el endotelio vascular mientras que las sdLDL son más pequeñas y densas lo que facilita que atraviesen la pared arterial, esto determina el menor efecto aterogénico de las primeras (40-42). Esto explicaría el efecto ateroprotector de las ILDL en el modelo predictivo propuesto en este estudio.

Un mayor contenido de Tg en las partículas HDL se relaciona con una pérdida del potencial protector (antiaterogénico) de estas partículas que se transforman en partículas HDL más pequeñas e inestables. En estudios más recientes se ha demostrado que las concentraciones de Tg-HDL son más elevadas en pacientes con SM o DM2 y se asocian con la presencia de placas carotídeas (93). Por este motivo no se debería subestimar la aportación de las diferentes subfracciones de las LDL y la composición de las HDL al riesgo de enfermedad aterosclerótica prematura.

Una vez seleccionado el modelo que incluye Tg-HDL, C-sdLDL y ILDL-P se realizó una curva ROC y se estimó el Área Bajo la Curva (AUC). El análisis ROC fue validado de forma cruzada para evitar el riesgo de sobreajuste y para aumentar la capacidad predictiva del mismo. El valor de AUC fue 0.95 [0.92-0.99], por tanto, el modelo presenta una elevada eficiencia diagnóstica para predecir eventos isquémicos prematuros. Estos resultados concuerdan con los estudios publicados que prueban que el perfil lipídico avanzado es mejor predictor de la enfermedad aterosclerótica que el perfil lipídico clásico y que el C-LDL(40). Por tanto, el perfil lipídico avanzado es útil como indicador precoz de enfermedad aterosclerótica en pacientes con familiares con historia de

eventos isquémicos prematuros o en individuos con riesgo cardiovascular residual que han alcanzado objetivos de C-LDL.

Los resultados presentados subrayan la importancia del potencial del perfil lipídico avanzado en la explicación del RCVR. Este hecho es especialmente importante en aquellos pacientes que han alcanzado concentraciones C-LDL objetivo y se sospeche de la presencia de RCVR no identificado por el perfil lipídico clásico. En particular la concentración de Tg-HDL ha demostrado ser un factor de riesgo importante en el desarrollo de eventos isquémicos prematuros. A pesar de esto, parece que las estatinas no influyen en su concentración y se desconoce que estrategias terapéuticas serían las más adecuadas para disminuir Tg-HDL. Teniendo en cuenta estos resultados sería interesante dedicar esfuerzos para evaluar cómo los cambios en el estilo de vida afectan a la concentración de las subfracciones de LDL y Tg-HDL y si estos se relacionan directamente con una disminución de la morbimortalidad asociada a la ECV.

3.4 Conclusiones

En este estudio se ha demostrado como el perfil lipídico avanzado, sobre todo Tg-HDL, C-sdLDL y LDL-P, pueden predecir eventos isquémicos prematuros en individuos que han alcanzado los objetivos terapéuticos de C-LDL, en los que el RCV ha sido infraestimado.

3.5 Publicación completa



Article

Physicochemical Properties of Lipoproteins Assessed by Nuclear Magnetic Resonance as a Predictor of Premature Cardiovascular Disease. PRESARV-SEA Study

Bárbara Fernández-Cidón ^{1,†} , Beatriz Candás-Estébanez ^{1,2,†}, Miriam Gil-Serret ³, Núria Amigó ^{3,4} , Emili Corbella ^{5,6} , M. Ángeles Rodríguez-Sánchez ⁵, Ariadna Padró-Miquel ¹ , Carlos Brotons ⁷ , Antonio Hernández-Mijares ⁸ , Pilar Calmarza ⁹, Estibaliz Jarauta ⁹, Angel J. Brea ¹⁰, Marta Mauri ¹¹, Carlos Guijarro ¹² , Àlex Vila ¹³, Pedro Valdivielso ¹⁴ , Xavier Corbella ^{5,15} and Xavier Pintó ^{5,6,16,*}



Citation: Fernández-Cidón, B.; Candás-Estébanez, B.; Gil-Serret, M.; Amigó, N.; Corbella, E.; Rodríguez-Sánchez, M.Á.; Padró-Miquel, A.; Brotons, C.; Hernández-Mijares, A.; Calmarza, P.; et al. Physicochemical Properties of Lipoproteins Assessed by Nuclear Magnetic Resonance as a Predictor of Premature Cardiovascular Disease. PRESARV-SEA Study. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1379. <https://doi.org/10.3390/jcm10071379>

Academic Editor: Vanessa Bianconi

Received: 22 February 2021

Accepted: 26 March 2021

Published: 29 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Bioquímica Especial y Biología Molecular, Laboratori Clínic, Hospital Universitario de Bellvitge, 08907 L'Hospitalet de LL., Spain; barbara.fernandez@bellvitgehospital.cat (B.F.-C.); BCandas@scias.com (B.C.-E.); apadro@bellvitgehospital.cat (A.P.-M.)
- ² Clinical Laboratory, SCIAS-Hospital de Barcelona, 08034 Barcelona, Spain
- ³ Biosfer Teslab, 43204 Reus, Spain; mgil@biosferteslab.com (M.G.-S.); namigo@biosferteslab.com (N.A.)
- ⁴ CIBERDEM, Universidad Rovira i Virgili, 43002 Tarragona, Spain
- ⁵ Unidad de Lípidos y Riesgo Vascular, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, 08907 Barcelona, Spain; emilic@bellvitgehospital.cat (E.C.); mrodriguezsa@bellvitgehospital.cat (M.Á.R.-S.); xcorbella@bellvitgehospital.cat (X.C.)
- ⁶ Centro de Investigación Biomédica en Red, Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición CIBEROBN, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
- ⁷ EAP Sardenyà, Instituto de Investigaciones Biomédicas Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain; cbrotons@eapsardenya.cat
- ⁸ Hospital Universitario Dr. Peset, 46017 Valencia, Spain; hernandez_antmij@gva.es
- ⁹ Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Miguel Servet, CIBERCV IIS Aragón, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain; mpcalmarza@salud.aragon.es (P.C.); estijarauta@gmail.com (E.J.)
- ¹⁰ Hospital General San Pedro, 26006 Logroño, Spain; abrea@riojasalud.es
- ¹¹ Hospital de Terrassa (Consorci Sanitari de Terrassa), 08227 Terrassa, Spain; MMauri@CST.CAT
- ¹² Departamento de Especialidades Médicas y Salud Pública, Unidad de Medicina Interna, Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Universidad Rey Juan Carlos, 28922 Alcorcón, Spain; CGuijarro@FHAlcorcon.es
- ¹³ Hospital de Figueres (Fundació Salut Empordà), 17600 Figueres, Spain; avila@salutemporda.cat
- ¹⁴ Hospital Universitario Virgen de la Victoria, IBIMA, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain; valdivielso@uma.es
- ¹⁵ Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universitat Internacional de Catalunya, 08017 Barcelona, Spain
- ¹⁶ Department of Medicine, Campus Bellvitge, Universidad de Barcelona, 08907 L'Hospitalet de LL., Spain
- * Correspondence: xpinto@bellvitgehospital.cat
- † These authors contributed equally.
- ‡ Principal investigator of PRESARV-SEA group.

Abstract: Some lipoprotein disorders related to the residual risk of premature cardiovascular disease (PCVD) are not detected by the conventional lipid profile. In this case-control study, the predictive power of PCVD of serum sdLDL-C, measured using a lipoprotein precipitation method, and of the physicochemical properties of serum lipoproteins, analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) techniques, were evaluated. We studied a group of patients with a first PCVD event ($n = 125$) and a group of control subjects ($n = 190$). Conventional lipid profile, the size and number of Very Low Density Lipoproteins (VLDL), Low Density Lipoproteins (LDL), High Density Lipoproteins (HDL) particles, and the number of particles of their subclasses (large, medium, and small) were measured. Compared to controls, PCVD patients had lower concentrations of all LDL particles, and smaller and larger diameter of LDL and HDL particles, respectively. PCVD patients also showed higher concentrations of small dense LDL-cholesterol (sdLDL), and triglycerides (Tg) in LDL and HDL particles (HDL-Tg), and higher concentrations of large VLDL particles. Multivariate logistic regression showed that sdLDL-C, HDL-Tg, and large concentrations of LDL particles were the most powerful predictors of PCVD. A strong relationship was observed between increased HDL-Tg

concentrations and PCVD. This study demonstrates that beyond the conventional lipid profile, PCVD patients have other atherogenic lipoprotein alterations that are detected by magnetic resonance imaging (MRI) analysis.

Keywords: NMR analysis of lipoproteins; lipid profile; premature cardiovascular disease; residual cardiovascular risk; small dense LDL; lipoprotein particle number; lipoprotein precipitation

1. Introduction

Premature cardiovascular disease (PCVD) remains an important public health issue and dyslipidemia is the most common risk factor of this condition [1]. Patients with premature cardiovascular disease (PCVD) have non-conventional risk factors, both lipid and non-lipid [2,3], which entail a residual cardiovascular risk that is usually not detected or adequately controlled [4,5]. The Progression of Early Subclinical Atherosclerosis (PESA) study demonstrated that subclinical atherosclerosis is present in individuals without traditional cardiovascular risk factors (CVRFs) and with Low Density Lipoprotein cholesterol (LDL-C) at levels currently considered normal [6]. Furthermore, in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) study a lower cut-off value for LDL-C (70 mg/dL) was proposed with which some individuals still present subclinical atherosclerosis [7]. Consequently, new biomarkers to estimate residual cardiovascular risk must be considered. Among them are different alterations in the number, structure, and function of plasma lipoproteins. Extended studies of lipid metabolism have shown that individuals with an excess of low-density lipoprotein (LDL) particles have a higher cardiovascular risk, even when total cholesterol and LDL-cholesterol (LDL-C) levels are within the reference range, and this risk is higher in those with a predominance of smaller and denser LDL particles, compared to subjects with a predominance of larger and buoyant LDL particles [5–8]. Currently, total serum cholesterol concentrations, cholesterol in LDL particles, cholesterol in high-density lipoprotein (HDL) particles, and total serum triglycerides (Tg) constitute the conventional lipid profile, but this profile does not allow the detection of other lipid metabolism disorders that may predispose to PCVD [6,9]. For this reason, it is of interest to determine the role of other lipoprotein characteristics beyond cholesterol content, such as the cholesterol concentration of small dense LDL (sdLDL), which are not measured in automated clinical laboratories [10,11].

To date, the reference method for the study of lipoproteins requires a centrifugation stage, which is not usually available because of its cost and lengthy time of analysis. However, other methods have recently been developed to separate sdLDL and quantify its cholesterol content. Hirano and collaborators developed a method that provides interchangeable results with ultracentrifugation and can be easily adapted to clinical laboratories [12].

Lipoproteins and their apolipoproteins may undergo alterations that affect their structure, functionality, composition, and plasma concentrations and favor their accumulation in the arterial wall, triggering greater inflammatory and immune response and promoting atherosclerosis and its complications [6,9,10]. It has been observed that among these lipoprotein alterations, the diameter and number of particles measured by nuclear magnetic resonance (NMR) are the most relevant for the prediction of cardiovascular risk [6,13].

In the present case-control study we explored the power of the physicochemical properties of lipoproteins to predict PCVD to evaluate the residual cardiovascular risk beyond c-LDL. Our hypothesis is that the advanced lipid profile may be a new reliable biomarker of residual cardiovascular risk in patients already treated with lipid-lowering drugs and in whom LDL-C has reduced. The final purpose of this study was to demonstrate that lipoprotein size and its composition can be a better predictor of PCVD than LDL-C in patients on statin therapy who have already achieved the LDL-C goal.

2. Materials and Methods

2.1. Population

In this study a group of 125 patients who had had PCVD as the first cardiovascular event between 1 January 2014 to 31 December 2016 were included. Patients of both sexes less than 50 years of age were recruited from lipid and vascular risk units affiliated with the Spanish Arteriosclerosis Society. The study protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital de Bellvitge, and all the patients signed the informed consent. PCVD was defined as a first episode of one of the following cardiovascular events: Angina pectoris with signs of coronary obstruction documented by angiography, acute myocardial infarction, stroke, transitory ischemic attack with at least one luminal stenosis $\geq 50\%$ in the carotid or subclavian arteries and revascularization of any arterial territory due to atherosclerosis. All premature cardiovascular events were confirmed with objective data or a complementary test.

Patients with poor general health conditioning a short life expectancy, intellectual impairment, kidney or liver failure, and other causes of secondary dyslipidemia were excluded.

Control subjects were selected from apparently healthy workers from a car factory paired by age and sex.

The characteristics of the two groups are described in Table 1.

Table 1. Clinical data of patients and control subjects.

Variables (Units)	Control Group <i>n</i> = 190	PCVD Group <i>n</i> = 125
Age (years)	47 (3.7)	46.5 (4.4)
Male (%)	150 (78.9%)	99 (79.2%)
Coronary artery disease	-	79 (63.2%)
Stroke or TIA	-	46 (36.8%) ^a
BMI (kg/m ²)	26.7(3.6)	29 (4.98) ^a
Diabetes mellitus	3 (1.6%)	16 (12.8%) ^a
Hypertension	22 (11.6%)	48 (38.4%)
Smoking	59 (31%)	32 (25.6%)
Lipid-lowering drugs	20 (10.5%)	116 (92.8%) ^a
Anti-platelet drugs	3 (1.6%)	118 (94.4%) ^a
Cholesterol (mg/dL)	207.4 (33.3)	155.3 (40.8) ^a
HDL-Cholesterol (mg/dL)	56.8 (12.4)	44.5 (14.8) ^a
Triglycerides (mg/dL)	121.1 (98.6)	140.6 (99.6)
LDL-C (mg/dL)	144.38 (12.5)	96.49 (7.9) ^a

Data are expressed as mean (standard deviation) or case number (percentage). PCVD: Premature cardiovascular disease; TIA: Transitory ischemic attack; SBP: Systolic blood pressure; HDL-Cholesterol: High-density lipoprotein cholesterol, LDL-C: Low density lipoprotein-cholesterol. (^a) indicates differences between groups with $p < 0.05$.

2.2. Variables Included

Lipid variables from the conventional lipid profile were evaluated, including plasma cholesterol concentrations, Tg, LDL-C, and HDL-C. Extended lipid profile biomarkers were: sdLDL-C, very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C), VLDL-Tg, VLDL particle number (VLDL-P) including small (sVLDL-P), medium (mVLDL-P), and large (lVLDL-P), VLDL diameter (VLDL-Z), intermediate density lipoprotein cholesterol (IDL-C), IDL-Tg, LDL-Tg, LDL particle number (LDL-P) including small (sLDL-P), medium (mLDL-P), and large (lLDL-P), LDL diameter (LDL-Z), HDL-Tg, HDL particle number (HDL-P) including small (sHDL-P), medium (mHDL-P), and large (lHDL-P), and HDL diameter (HDL-Z).

2.3. Sample Collection

PCVD group samples: Venous blood samples were withdrawn after a 12-h overnight fast. All serum samples were collected in tubes without anticoagulant and with separating gel. Serum samples were conserved at -80°C until analysis.

Control group samples: Venous blood samples were withdrawn after a 12-h overnight fast. Plasma was collected in tubes containing the anticoagulant EDTA-K3 (BD, Vacutainer, NJ, US) and were centrifuged immediately for 15 min at 1500 g and at 4 °C. The plasma was immediately separated and stored at −80 °C until biochemical and NMR analysis.

2.4. Methods

2.4.1. Lipoprotein Precipitation Techniques

sdLDL-C concentrations were obtained using a specific lipoprotein precipitation method previously described by our group and adapted for use in routine clinical laboratories. G centrifugation force and cooling samples temperature were modified in order to improve lipoprotein precipitation with a density <1.044 g/mL in hypertriglyceridemic samples [14].

2.4.2. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Analysis

Before ¹H-NMR analysis, 200 µL of serum were diluted with 50 µL deuterated water and 300 µL of 50 mM phosphate buffer solution (PBS) at pH 7.4. ¹H-NMR spectra were recorded at 310 K on a Bruker Avance III 600 spectrometer (Bruker BioSciences Española S.A., Rivas Vaciamadrid, Madrid, Spain) operating at a proton frequency of 600.20 MHz (14.1 T) as previously reported [15].

The Liposcale[®] test was used to obtain the whole lipoprotein profile including lipid concentrations, Tg and cholesterol, size and particle number of three VLDL, LDL, and HDL, as well as the particle number of nine subclasses (large, medium, and small VLDL, LDL, and HDL). Particle concentrations and diameter were obtained from the measured amplitudes of the methyl group NMR signals that differ among the lipoprotein subclasses [15].

2.5. Statistical Analysis

Descriptive analysis of the advanced lipoprotein panel of the two groups was performed. Results are shown as medians and 25th and 75th percentiles and comparative analyses of the variable medians between groups were performed using the Mann–Whitney U test.

The statistical approach consisted in different steps:

First, a logistic univariate regression analysis was carried out to explain the contribution between each variable and the development of PCVD. The results of each variable and its *p*-value are shown in Table S1.

Secondly, Spearman correlation rho were calculated for variables with *p* < 0.05 in the univariate analysis that were significantly related to PCVD.

Among the pairs of variables presenting rho > 0.5, the variable with the lowest significance in the univariate analysis was not considered for the final model.

The model selected is the one which presents the highest goodness-of-fit evaluated with the most significant Hosmer–Leshow index (HL) and the highest diagnostic accuracy calculated by receiver operating curve (ROC) analysis. The *p*-value and pseudo-R² de Nagelkerke of the model were estimated and odds ratios (OR) of each variable included in the model were calculated.

In addition, ROC analysis was performed. The area under the curve (AUC), and the sensitivity and specificity of the model were estimated in order to establish the efficiency of the model for PCVD prediction. Contributions of each variable to the risk of presenting a premature ischemic event were evaluated taking into account the OR results obtained in the logistic regression. The ROC analysis was also cross validated to avoid the risk of over-fitting and to increase the predictive capacity using the Venetian blinds method.

Stata[®] 14 software (StataCorp LLC, College Station, TX, USA) was used to carry out the statistical analyses.

3. Results

Table 2 shows the advanced lipoprotein data of the two groups. Patients with PCVD presented lower concentrations of large, medium, and small sized LDL particles compared to controls. In the PCVD group, the LDL particle diameter was smaller and sdLDL-C and LDL-Tg concentrations were higher. Large-VLDL particles concentration was also higher in patients with PCVD. HDL-Tg concentrations were higher and had a larger diameter in PCVD patients compared to controls. Only variables showing significant differences between groups were evaluated for inclusion in the multivariate logistic regression model. After that the collinearity study was carried out. The variables excluded were those that correlated with HDL-Tg ($p = 1.35 \times 10^{-25}$) as follows: IHLDL-P ($p = 3.25 \times 10^{-11}$) rho = 0.471; mHDL-P ($p = 2.95 \times 10^{-7}$) rho = 0.537; sHDL-P ($p = 0.001$) rho = 0.157; HDL-Z ($p = 1.30 \times 10^{-10}$) rho = 0.199; IVLDL-P (0.001) rho = 0.654; LDL-P ($p = 7.31 \times 10^{-13}$) rho = 0.385; mLDL-P ($p = 2.41 \times 10^{-13}$) rho = 0.485; sLDL-P ($p = 1.30 \times 10^{-8}$) rho = 0.272; LDL-Z ($p = 1.02 \times 10^{-9}$) rho = 0.267; LDL-C ($p = 2.90 \times 10^{-13}$) rho = 0.469.

Variables that were candidates for the final model were: sdLDL-C, ILDL-P, HDL-Tg, VLDL-Z, LDL-Tg. According to the highest goodness-of-fit and the highest diagnostic accuracy calculated by a ROC curve analysis, the model selected included sdLDL-C, ILDL-P, HDL-Tg.

Table 2. Comparison between the advanced lipoprotein panels of the two groups.

Variables (Units)	Control Group (n = 190)	PCVD Group (n = 125)	p Value
Very Low Density Lipoprotein			
Cholesterol (mg/dL)	12.27 (6.90–21.16)	14.21 (8.44–19.94)	0.173
Triglycerides (mg/dL)	56.72 (33.74–82.68)	61.15 (43.67–92.71)	0.06
Total particles (nmol/L)	41.22 (23.86–62.63)	41.57 (30.93–64.28)	0.143
Large particles (nmol/L)	0.85 (0.53–1.29)	1.27 (0.94–1.76)	<0.0001
Medium particles (nmol/L)	4.57 (3.05–6.39)	5.04 (3.21–8.13)	0.245
Small particles (nmol/L)	36.00 (20.21–54.55)	35.11 (27.05–55.86)	0.138
Diameter (nm)	42.13 (42.01–42.25)	42.28 (42.14–42.43)	<0.0001
Intermediate Density Lipoprotein			
Cholesterol (mg/dL)	8.16 (5.53–11.05)	9.07 (7.22–11.43)	0.074
Triglycerides (mg/dL)	10.05 (7.91–12.96)	9.81 (8.27–11.60)	0.683
Low Density Lipoprotein			
Cholesterol (mg/dL)	144.38 (134.08–169.37)	96.49 (83.14–112.22)	<0.0001
Triglycerides (mg/dL)	19.27 (11.61–23.86)	12.07 (9.66–15.01)	<0.0001
Total particles (nmol/L)	1457.93 (1312.05–1648.66)	994.78 (880.20–1144.72)	<0.0001
Large particles (nmol/L)	221.12 (186.67–238.65)	158.76 (139.20–175.46)	<0.0001
Medium particles (nmol/L)	519.99 (422.60–605.56)	246.81 (187.99–308.80)	<0.0001
Small particles (nmol/L)	724.35 (642.38–861.24)	587.73 (532.41–671.76)	<0.0001
Cholesterol small particles (mmol/L)	320.00 (180.15–460.06)	420.38 (265.28–704.79)	<0.0001
Diameter (nm)	21.16 (20.99–21.33)	20.91 (20.78–21.06)	<0.0001
High Density Lipoprotein			
Cholesterol (mg/dL)	48.86 (38.76–57.78)	45.47(39.92–51.72)	0.101
Triglycerides (mg/dL)	7.88 (6.07–9.85)	14.61(11.41–17.52)	<0.0001
Total particles (µmol/L)	24.78 (20.18–28.12)	24.18 (21.05–27.86)	0.855
Large particles (µmol/L)	0.23 (0.19–0.27)	0.26 (0.24–0.30)	<0.0001
Medium particles (µmol/L)	6.80 (5.66–8.69)	9.02 (7.93–10.43)	<0.0001
Small particles (µmol/L)	16.83 (13.93–19.34)	14.98 (12.08–17.57)	0.003
Diameter (µmol/L)	8.21 (8.17–8.25)	8.30 (8.24–8.34)	<0.0001

Data are expressed as medians (interquartile interval).

After discarding covariances, the most powerful biomarkers that could contribute to predicting PCVD were sdLDL-C, HDL-Tg, and ILDL-P. Table 3 shows the results of the multivariate logistic regression analysis and the ORs of the model. Logistic regression was statistically significant with a $p < 0.001$ and a pseudo- R^2 of Nagelkerke = 0.73.

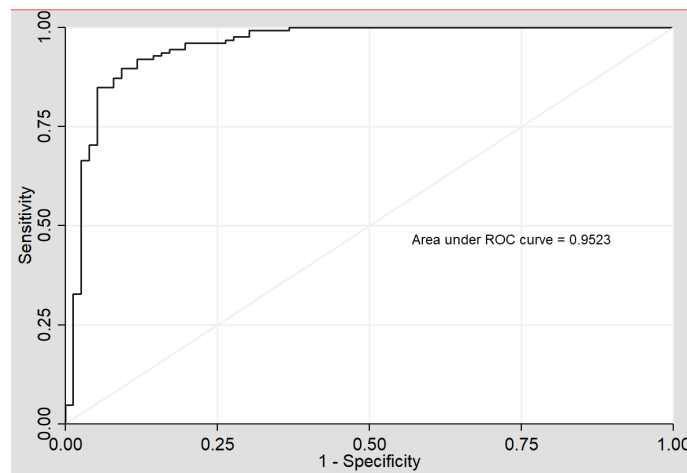
Table 3. Results of the multivariate logistic regression analysis.

Variables (Units)	OR	[CI 95%]	<i>p</i> Value	R ²
Constant	27.367	1.650 to 453.845	0.021	0.730
sdLDL-C (mmol/L)	1.002	1.000 to 1.003	0.030	
HDL-Tg (mg/dL)	1.622	1.296 to 1.764	<0.0001	
ILDL-P (nmol/L)	0.956	0.941 to 0.967	<0.0001	

OR (odds ratio); [CI 95%] (95% confidence interval); R² (pseudo-R² of Nagelkerke), sdLDL-C (small dense LDL-cholesterol); HDL-Tg (HDL-triglyceride); ILDL-P (large LDL particle number).

The ORs of each variable indicate the risk of presenting a premature ischemic event caused by this variable. All variables included in the logistic regression contributed significantly to the risk of PCVD with a *p* < 0.05. A strong relationship was observed between the increase in HDL-Tg concentrations and PCVD.

The diagnostic accuracy of the model to predict PCVD was estimated using ROC analysis (Figure 1). The AUC obtained and its 95% confidence interval (CI) was 0.95 (0.92–0.99). The sensitivity was 94.7% and the specificity was 80.3%. The ROC analysis was cross-validated to avoid the risk of over-fitting and to increase the predictive capacity using the Venetian blinds method. The AUC remained unaltered (<1%) after the cross-validation process.

**Figure 1.** Model 1 ROC (receiver operating curve) analysis (sdLDL-C, HDL-Tg, ILDL-P). AUC (area under the curve).

4. Discussion

There is a need to characterize the residual risk of PCVD patients without dyslipidemia in the conventional lipid profile [16,17]. Several studies have shown that obtaining the lipoprotein profile by NMR in these patients could help to predict the risk of cardiovascular disease [18–20]. Although the independence of NMR lipid variables versus traditional lipid profile has not been demonstrated, there are some studies that support the superiority of advanced lipid profile in estimating cardiovascular risk [21–23]. In this prospective observational study, we evaluated the contribution of advanced lipid profile parameters in a multivariate logistic regression model for PCVD prediction. NMR study of the lipoprotein profile (Liposcale[®] test) consists in the mathematical deconvolution of the various resonance signals given by the methyl groups of the lipoprotein lipid nucleus [16]. The Liposcale[®] test analyzes the average diameter, cholesterol and Tg content, and concentrations of the number of VLDL, LDL, and HDL lipoproteins, and the content of Tg and cholesterol of IDL particles and the concentration of the number of VLDL, LDL, and HDL lipoprotein subclasses (large, medium, and small).

We found significant differences between groups in the different subclasses of lipoproteins, including their diameter and composition. LDL-P and LDL-C were significantly lower in PCVD patients than in control subjects which may be the consequence of a higher use and intensity of lipid-lowering treatments in PCVD patients. However, it should be noted that neither of these two variables were included in the predictive model.

Particle diameter is one of the main lipoprotein characteristics that influences atherogenicity. It has been observed that smaller LDL and VLDL are more atherogenic because they are more easily retained in the endothelium [24,25]. However, the exception to this are large buoyant VLDL (IVLDL-P) which are more atherogenic since their metabolism generates sdLDL particles that are more atherogenic than large buoyant LDL particles which are formed from small VLDL particles. In the present study, PCVD patients had higher concentrations of IVLDL-P and sdLDL particles, and sdLDL-C than control subjects.

It is well known that cholesterol contained in small LDL particles is more atherogenic, since it is directly related to the thickening of the intima media [9,19] and to a higher risk of cardiovascular disease. However, there is also evidence that in some patients with coronary disease large LDL particles predominate compared to other LDL subclasses. In addition, it has been observed that large LDL is an independent determinant of carotid intima media thickness (cIMT) in healthy men, and in the MESA study [6] both large LDL and small LDL particle numbers correlated with cIMT.

In the multivariate logistic regression model of the present study only three biomarkers were significantly associated with PCVD: sdLDL-C, HDL-Tg, and large LDL-P. These variables explained 72% of PCVD risk. The role of HDL-Tg in this model is especially relevant because an increase of 1 mg/dL in serum HDL-Tg was associated with an increase in PCVD risk of 62%. On the other hand, an increase of 1 mmol/L in the number of large LDL particles was associated with a decrease of 4.4% in PCVD risk, whereas the effect of sdLDL-C on PCVD risk, although significant, was small. This model presented a high AUC with good sensitivity suggesting that it could be used for PCVD risk screening, especially in subjects with first-degree relatives with cardiovascular disease who have low LDL concentrations, or in patients with cardiovascular disease that is not explained by traditional biomarkers and in whom additional residual risk must be considered. These data agree with those from other studies and support the contention that NMR lipoprofile biomarkers are stronger predictors of PCVD [26] and subclinical atherosclerosis [27] than other conventional risk factors such as LDL-C concentrations.

The role of HDL-Tg as a predictor of PCVD risk may be explained by the decrease in the antiatherogenic properties of HDL that has been observed as these particles become enriched in Tg [28,29].

On the other hand, the value of HDL particle diameter as a predictive factor of CVD is controversial. Some studies demonstrate that HDL-P and SHDL-P are inversely related to CVD [30,31] and to all-cause as well as cardiovascular mortality in CAD patients [32]. In our study patients in the PCVD group had a higher number of large HDL particles and a smaller number of small HDL particles than the control group.

The number of LDL particles can also be estimated quantifying plasma Apo B concentrations, since every LDL particle contains only one Apo B molecule. Some studies have shown that Apo B is a more powerful marker of cardiovascular disease risk than LDL-c and non HDL-C [33]. In addition, in other studies the increased atherogenic effect of small LDL particles has not been observed, and the number of both total LDL and HDL particles has been described as a better predictor of cardiovascular risk. In fact, it has been reported that a percentage greater than 65% of the interindividual differences in cardiovascular risk is due to the number of lipoprotein particles and not to the diameter [34].

The discordance between LDL-C and advanced lipid profile data is mainly observed in individuals at risk of cardiovascular disease presenting high Tg concentrations, type 2 diabetes mellitus or metabolic syndrome (MS) [35]. MS patients present the highest prevalence of Tg, sdLDL particles, and large HDL particles.

The results of this study show that beyond the conventional lipid profile, the NMR advanced lipid profile can detect other lipoprotein alterations related to the residual risk of PCVD. Some clinical guidelines recommend the measurement of LDL-P concentrations in the follow-up of patients with MS [36] and type 2 diabetes mellitus [37]. Some expert panels and international guidelines propose to guide lipid-lowering therapy based on LDL-P concentrations instead of LDL-C concentrations, establishing a discriminant value of LDL-P <1000 nmol/L [38].

As we have hypothesized, PCVD individuals that were on statin therapy, and whose LDL-C values were lower than those of control subjects, had a higher concentration of sdLDL-C. These results support the relevance of LDL cholesterol composition and size on PCVD progression and its potential as a new biomarker for residual cardiovascular risk.

This study has several limitations. Lp(a) measures were not considered in this study as the control group was recruited in primary care centers where this determination is not available. Lastly, these hypothesis-generating findings warrant further studies as no independent validation has been done.

5. Conclusions

Beyond the conventional lipid profile, PCVD patients have other atherogenic lipoprotein alterations that are not detected by the conventional lipid profile. The study of lipoproteins by NMR may allow the detection of these alterations and a broader understanding of the vascular risk related to dyslipidemias.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm10071379/s1>, Table S1: Univariate analysis.

Author Contributions: Conceptualization, B.F.-C., B.C.-E., C.B., A.H.-M., and X.P.; methodology, B.F.-C., B.C.-E., C.B., A.H.-M., and X.P.; validation, B.C.-E., N.A., E.C., C.B., A.H.-M., and X.P.; formal analysis, B.F.-C., B.C.-E., M.G.-S., N.A., E.C., X.C. and X.P.; investigation, M.Á.R.-S., C.B., A.H.-M., E.J., P.C., A.J.B., M.M., C.G., À.V., and P.V.; resources, A.P.-M., C.B., and X.P.; data curation, B.F.-C., B.C.-E., M.G.-S., N.A., E.C., C.B., and X.P.; writing—original draft preparation, B.F.-C., B.C.-E., M.G.-S., N.A., E.C., and X.P.; writing—review and editing, B.C.-E., E.C., A.P.-M., E.C., C.B., A.H.-M., X.C., and X.P.; visualization, B.F.-C., B.C.-E., N.A., E.C., and X.C.; supervision, X.P.; project administration, B.C.-E., and X.P.; funding acquisition, A.H.-M., and X.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported in part by the Spanish Ministry of Health (Carlos III Health Institute) through the Fondo de Investigación para la Salud (FIS), which is co-funded by the European Regional Development Fund, funded by the following grant codes: PI16/01094 and PI19/01032.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of The Hospital Universitari de Bellvitge (protocol code PR316/13, version 3.7 and approval date: 29 June 2016).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: Assistance provided by the members of the Unitats de Lipids de la SEA who participated in this study is gratefully appreciated. We also thank Merck Sharp & Dohme for funding the data collection and registration through the Spanish Arteriosclerosis Society (SEA). Merck Sharp & Dohme did not participate in the study design, in the collection or analysis of the data, or in the writing of the manuscript.

Conflicts of Interest: Xavier Pintó declares personal fees from Amgen, Astra-Zeneca, Esteve, Ferrer, Merck, Mylan, Sanofi, outside the submitted work. Carlos Guijarro declares personal fees from AMGEN, Sanofi, Daiichi Sankyo, Ferrer Pfizer, Rubió, and MSD, related to lectures and advisory committees. Núria Amigó is stock owner of Biosfer Teslab and has a patent of the lipoprotein profiling described in the present manuscript. Pedro Valdivielso: advisory and lecture from Ferrer, Rubió, Amgen, Sanofi, MSD, Novartis, Amarin, Mylan, Daiichi-Sankyo, outside the submitted work. The other authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Vikulova, D.N.; Grubisic, M.; Zhao, Y.; Lynch, K.; Humphries, K.H.; Pimstone, S.N.; Brunham, L.R. Premature Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Trends in Incidence, Risk Factors, and Sex-Related Differences, 2000 to 2016. *J. Am. Heart Assoc.* **2019**, *8*, e012178. [[CrossRef](#)]
2. Piepoli, M.F.; Hoes, A.W.; Agewall, S.; Albus, C.; Brotons, C.; Catapano, A.L.; Cooney, M.T.; Corrà, U.; Cosyns, B.; Deaton, C.; et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur. Heart J.* **2016**, *37*, 2315–2381.
3. Ambegaonkar, B.; Bash, L.; Chirovsky, D.; Jameson, K.; Grant, S.; Nocea, G.; Pettersson, B.; Sazonov, V. 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*, 656–663. [[CrossRef](#)]
4. Dawber, T.R.; Moore, F.E.; Mann, G.V., II. Coronary Heart Disease in the Framingham Study. *Int. J. Epidemiol.* **2015**, *44*, 1767–1780. [[CrossRef](#)]
5. Sampson, U.K.; Fazio, S.; Linton, M.F. Residual cardiovascular risk despite optimal LDL-cholesterol reduction with statins: The evidence, etiology, and therapeutic challenges. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2012**, *14*, 1–10. [[CrossRef](#)]
6. Fernández-Friera, L.; Fuster, V.; López-Melgar, B.; Oliva, B.; García-Ruiz, J.M.; Mendiguren, J.; Bueno, H.; Pocock, S.; Ibáñez, B.; Fernández-Ortiz, A.; et al. Normal LDL-Cholesterol Levels Are Associated with Subclinical Atherosclerosis in the Absence of Risk Factors. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 2979–2991. [[CrossRef](#)]
7. Al Rifai, M.; Martin, S.S.; McEvoy, J.W.; Nasir, K.; Blankstein, R.; Yeboah, J.; Miedema, M.; Shea, S.J.; Polak, J.F.; Ouyang, P.; et al. The prevalence and correlates of subclinical atherosclerosis among adults with low-density lipoprotein cholesterol <70 mg/dL: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) and Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Atherosclerosis* **2018**, *274*, 61–66. [[CrossRef](#)]
8. Higashioka, M.; Sakata, S.; Honda, T.; Hata, J.; Yoshida, D.; Hirakawa, Y.; Shibata, M.; Goto, K.; Kitazono, T.; Osawa, H.; et al. Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol and the Risk of Coronary Heart Disease in a Japanese Community. *J. Atheroscler. Thromb.* **2020**, *27*, 669–682. [[CrossRef](#)]
9. 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*, 931–939. [[CrossRef](#)]
10. Hoogeveen, R.C.; Gaubatz, J.W.; Sun, W.; Dodge, R.C.; Crosby, J.R.; Jiang, J.; Couper, D.; Virani, S.S.; Kathiresan, S.; Boerwinkle, E.; et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 1069–1077. [[CrossRef](#)]
11. Pintó, X.; Masana, L.; Civeira, F.; Real, J.; Ibarretxe, D.; Candas, B.; Puzo, J.; Díaz, J.L.; Amigó, N.; Esteban, M.; et al. Consensus document of an expert group from the Spanish Society of Arteriosclerosis (SEA) on the clinical use of nuclear magnetic resonance to assess lipoprotein metabolism (Liposcale®). *Clin. Investig. Arterioscler.* **2020**, *32*, 219–229. [[CrossRef](#)]
12. Hirano, T.; Ito, Y.; Saegusa, H.; Yoshino, G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 2193–2201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Otvos, J.; Mora, S.; Shalurova, I.; Greenland, P.; Mackey, R.; Goff, D. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *J. Clin. Lipidol.* **2011**, *5*, 105–113. [[CrossRef](#)]
14. Fernández-Cidón, B.; Padró-Miquel, A.; Alía-Ramos, P.; Castro-Castro, M.J.; Fanlo-Maresma, M.; Dot-Bach, D.; Valero-Politi, J.; Pintó-Sala, X.; Candás-Estébanez, B. Reference values assessment in a Mediterranean population for small dense low-density lipoprotein concentration isolated by an optimized precipitation method. *Vasc. Health Risk Manag.* **2017**, *13*, 201–207. [[CrossRef](#)]
15. Mallol, R.; Amigó, N.; Rodríguez, M.A.; Heras, M.; Vinaixa, M.; Plana, N.; Rock, E.; Ribalta, J.; Yanes, O.; Masana, L.; et al. Liposcale: A novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion ordered 1H NMR spectroscopy. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 737–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Rock, E.; Winkhofer-Roob, B.M.; Ribalta, J.; Scotter, M.; Vasson, M.P.; Brtko, J.; Brigelius-Flohe, R.; Bronner, A.; Azais-Braesco, V. Vitamin A, vitamin E and carotenoid status and metabolism during ageing: Functional and nutritional consequences (VITAGE Project). *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2001**, *11*, 70–73. [[PubMed](#)]
17. Fernández-Ortiz, A.; Jimenez-Borreguero, L.J.; Penalvo, J.L.; Ordovás, J.M.; Mocoroa, A.; Fernández-Friera, L.; Laclaustra, M.; García, L.; Molina, J.; Mendiguren, J.M.; et al. The Progression and Early detection of Subclinical Atherosclerosis (PESA) study: Rationale and design. *Am. Heart J.* **2013**, *166*, 990–998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Baigent, C.; Keech, A.; Kearney, P.M.; Blackwell, L.; Buck, G.; Pollicino, C.; Kirby, A.; Sourjina, T.; Peto, R.; Collins, R.; et al. Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: Prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* **2005**, *366*, 1267–1278. [[CrossRef](#)]
19. Shiffman, D.; Louie, J.Z.; Caul, M.P.; Nilsson, P.M.; Devlin, J.J.; Melander, O. LDL subfractions are associated with incident cardiovascular disease in the Malmo Prevention Project Study. *Atherosclerosis* **2017**, *263*, 287–292. [[CrossRef](#)]
20. Cromwell, W.C.; Otvos, J.D.; Keyes, M.J.; Pencina, M.J.; Sullivan, L.; Vasan, R.S.; Wilson, P.W.; D'Agostino, R.B. LDL Particle Number and Risk of Future Cardiovascular Disease in the Framingham Offspring Study—Implications for LDL Management. *J. Clin. Lipidol.* **2007**, *1*, 583–592. [[CrossRef](#)]

21. Aday, A.W.; Lawler, P.R.; Cook, N.R.; Ridker, P.M.; Mora, S.; Pradhan, A.D. Lipoprotein Particle Profiles, Standard Lipids, and Peripheral Artery Disease Incidence. *Circulation* **2018**, *138*, 2330–2341. [[CrossRef](#)]
22. Urbina, E.M.; McCoy, C.E.; Gao, Z.; Khoury, P.R.; Shah, A.S.; Dolan, L.M.; Kimball, T.R. Lipoprotein particle number and size predict vascular structure and function better than traditional lipids in adolescents and young adults. *J. Clin. Lipidol.* **2017**, *11*, 1023–1031. [[CrossRef](#)]
23. Shah, A.S.; Davidson, W.S.; Gao, Z.; Dolan, L.M.; Kimball, T.R.; Urbina, E.M. Superiority of lipoprotein particle number to detect associations with arterial thickness and stiffness in obese youth with and without prediabetes. *J. Clin. Lipidol.* **2016**, *10*, 610–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kathiresan, S.; Otvos, J.D.; Sullivan, L.M.; Keyes, M.J.; Schaefer, E.J.; Wilson, P.W.; D'Agostino, R.B.; Vasan, R.S.; Robins, S.J. Increased small low-density lipoprotein particle number: A prominent feature of the metabolic syndrome in the Framingham Heart Study. *Circulation* **2006**, *113*, 20–29. [[CrossRef](#)]
25. Holmes, M.V.; Millwood, I.Y.; Kartsonaki, C.; Hill, M.R.; Bennett, D.A.; Boxall, R.; Guo, Y.; Xu, X.; Bian, Z.; Hu, R.; et al. Lipids, Lipoproteins, and Metabolites and Risk of Myocardial Infarction and Stroke. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *71*, 620–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ip, S.; Lichtenstein, A.H.; Chung, M.; Lau, J.; Balk, E.M. Systematic review: Association of low-density lipoprotein subfractions with cardiovascular outcomes. *Ann. Intern. Med.* **2009**, *150*, 474–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Mora, S.; Buring, J.E.; Ridker, P.M. Discordance of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol with alternative LDL-related measures and future coronary events. *Circulation* **2014**, *129*, 553–561. [[CrossRef](#)]
28. Mudd, J.O.; Borlaug, B.A.; Johnston, P.V.; Kral, B.G.; Rouf, R.; Blumenthal, R.S.; Kwiterovich, P.O., Jr. Beyond low density lipoprotein cholesterol: Defining the role of low-density lipoprotein heterogeneity in coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *50*, 1735–1741. [[CrossRef](#)]
29. Kontush, A.; Chantepie, S.; Chapman, M.J. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23*, 1881–1888. [[CrossRef](#)]
30. Albers, J.J.; Slee, A.; Fleg, J.L.; O'Brien, K.D.; Marcovina, S.M. Relationship of baseline HDL subclasses, small dense LDL and LDL triglyceride to cardiovascular events in the AIM-HIGH clinical trial. *Atherosclerosis* **2016**, *251*, 454–459. [[CrossRef](#)]
31. Fernández-Castillejo, S.; Pedret, A.; Catalán, Ú.; Valls, R.M.; Farràs, M.; Rubió, L.; Castañer, O.; Macià, A.; Fitó, M.; Motilva, M.J.; et al. Virgin Olive Oil Phenolic Compounds Modulate the HDL Lipidome in Hypercholesterolaemic Subjects: A Lipidomic Analysis of the VOHF Study. *Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, e2001192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Duparc, T.; Ruidavets, J.B.; Genoux, A.; Ingueneau, C.; Najib, S.; Ferrières, J.; Perret, B.; Martinez, L.O. Serum level of HDL particles are independently associated with long-term prognosis in patients with coronary artery disease: The GENES study. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 8138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sniderman, A.D.; Thanassoulis, G.; Glavinovic, T.; Navar, A.M.; Pencina, M.; Catapano, A.; Ference, B.A. Apolipoprotein B Particles and Cardiovascular Disease: A Narrative Review. *JAMA Cardiol.* **2019**, *4*, 1287–1295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kim, D.S.; Li, Y.K.; Bell, G.A.; Burt, A.A.; Vaisar, T.; Hutchins, P.M.; Furlong, C.E.; Otvos, J.D.; Polak, J.F.; Arnan, M.K.; et al. Concentration of Smaller High-Density Lipoprotein Particle (HDL-P) Is Inversely Correlated with Carotid Intima Media Thickening After Confounder Adjustment: The Multi Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *J. Am. Heart Assoc.* **2016**, *5*, e002977. [[CrossRef](#)]
35. Würtz, P.; Raiko, J.R.; Magnussen, C.G.; Soininen, P.; Kangas, A.J.; Tynkkynen, T.; Thomson, R.; Laatikainen, R.; Savolainen, M.J.; Laurikka, J.; et al. High-throughput quantification of circulating metabolites improves prediction of subclinical atherosclerosis. *Eur. Heart J.* **2012**, *33*, 2307–2316. [[CrossRef](#)]
36. Rosenson, R.S.; Davidson, M.H.; Pourfarzib, R. Underappreciated opportunities for low-density lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk. *Atherosclerosis* **2010**, *213*, 1–7. [[CrossRef](#)]
37. Garber, A.J.; Abrahamson, M.J.; Barzilay, J.I.; Blonde, L.; Bloomgarden, Z.T.; Bush, M.A.; Dagogo-Jack, S.; DeFronzo, R.A.; Einhorn, D.; Fonseca, V.A.; et al. Consensus statement by the american association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology on the comprehensive type 2 diabetes management algorithm—2016 executive summary. *Endocr. Pract.* **2016**, *22*, 84–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Cole, T.G.; Contois, J.H.; Csako, G.; McConnell, J.P.; Remaley, A.T.; Devaraj, S.; Hoefner, D.M.; Mallory, T.; Sethi, A.A.; Warnick, G.R. Association of apolipoprotein B and nuclear magnetic resonance spectroscopy-derived LDL particle number with outcomes in 25 clinical studies: Assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clin. Chem.* **2013**, *59*, 752–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Cuarto estudio: Impacto de la dieta mediterránea y la intervención en el estilo de vida en el perfil lipídico avanzado en pacientes con síndrome metabólico. Resultados del estudio PREDIMED-PLUS

4.1 Introducción

El tratamiento con estatinas dirigido a reducir la concentración de C-LDL ha demostrado ser efectivo en la disminución de la morbimortalidad asociada a la ECV (11). Actualmente los nuevos fármacos inhibidores de la proteína PCSK9 han conseguido disminuir aún más la concentración de C-LDL (135) y las guías europeas de 2019 han disminuido el valor objetivo de C-LDL hasta 55 mg/dL en los pacientes de muy alto RCV (1). Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos dirigidos a disminuir la concentración de C-LDL, las ECV siguen siendo la primera causa de mortalidad (33,34). Por tanto, con el objetivo de profundizar en el estudio del RCV, en los últimos años ha aumentado el interés en estudiar cómo influyen las lipoproteínas y sus subfracciones en el riesgo cardiovascular residual. Aunque se ha avanzado mucho y se han publicado estudios en los que se proponen nuevos biomarcadores como las C-sdLDL, LDL-P, VLDL-P y Tg-HDL (42,129,132,93), todavía se desconocen las estrategias terapéuticas más adecuadas para disminuir su concentración.

Los estudios publicados hasta el momento, se han centrado en estudiar el efecto del tratamiento farmacológico en el perfil lipídico avanzado. En algunos trabajos se ha demostrado como las estatinas consiguen disminuir la concentración de LDL-P (68) pero no son efectivas para la disminución de VLDL-P y sus subfracciones (132). Sin embargo, se desconoce cuál es el efecto de la dieta o el ejercicio sobre estos biomarcadores. Considerando que el cambio de estilo de vida y la adopción de hábitos saludables es siempre la primera línea de tratamiento en pacientes con SM es de vital importancia conocer cuál es su efecto en las diferentes lipoproteínas y sus subclases.

El estudio PREDIMED ya demostró como la dieta mediterránea tradicional (MedDiet), mejoraba el perfil lipídico clásico y disminuía la mortalidad asociada a la ECV (106). A pesar de los notables resultados presentados en este trabajo se han realizado pocos estudios sobre el efecto de la dieta en la salud cardiovascular, principalmente debido a la dificultad que supone su diseño y ejecución. Recientemente se ha llevado a cabo en España el estudio PREDIMED-PLUS. Un ensayo clínico randomizado que evalúa el efecto sobre las ECV de una intervención intensiva dirigida a la pérdida de peso mediante MedDiet hipocalórica, actividad física y terapia conductual (erMedDiet+PA) frente a la MedDiet tradicional y los cuidados sanitarios convencionales.

4.2 Objetivos

Este estudio tiene dos objetivos:

- Evaluar el efecto de la MedDiet sobre el perfil lipídico avanzado;
- Determinar el efecto de erMedDiet+PA sobre las variables antropométricas en el perfil lipídico clásico y avanzado y analizar si existen diferencias con respecto a la MedDiet tradicional y a la atención sanitaria habitual.

4.3 Material y métodos

4.3.1 Población

Se incluyeron en el estudio, hombres de 55 a 75 años y mujeres de 60 a 75 años, sin antecedentes de ECV, con un IMC superior o igual a 27 kg/m² e inferior a 40 kg/m², y que cumplían al menos 3 de los 5 criterios de SM. Los participantes fueron reclutados y asignados al azar, en una proporción de 1:1, al grupo de intervención o al grupo de control. En este estudio se incluyeron los pacientes visitados en el Hospital Universitari de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat). A los pacientes del grupo de intervención se les recomendó er-MedDiet+PA y recibieron apoyo conductual personal. Al grupo control se les prescribió MedDiet tradicional y recibieron atención sanitaria convencional. En cada visita se completó un cuestionario de 17 ítems para valorar la adherencia a la MedDiet y el cuestionario RAPA-a y RAPA-29 para evaluar el cumplimiento de una actividad física regular. También se registraron los datos de las variables antropométricas y se analizó la bioquímica convencional y el perfil lipídico clásico y avanzado en cada seguimiento.

4.3.2 Determinación C-sdLDL

Se tomaron muestras de sangre durante la visita inicial y luego cada seis meses durante un año. Las muestras se recogieron en tubos que contenían gel separador pero que no contenían coagulante (Vacuette ref: 456069). Los tubos se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos. El suero se separó inmediatamente. Se separaron dos alícuotas de cada muestra. Las alícuotas se almacenaron a -80 °C hasta que se analizaron. El tiempo para su análisis no superó los 10 días.

Las partículas sdLDL se aislaron mediante el método de precipitación modificado en nuestro laboratorio [136]. Se añadieron 300 µL del reactivo de precipitación (150 U/ml de heparina-Na⁺, nº de catálogo H3393; Sigma-Aldrich; MgCl₂ 90 mM) a 300 µL de muestra. Luego, las mezclas se incubaron a 37 °C durante 10 minutos, se enfriaron a 0 °C durante 15 min y se centrifugaron a 21913 × g (14000 rpm) durante 15 minutos a 4 °C (catálogo de centrífugas nº 6K15; Sigma-

Aldrich). Las lipoproteínas cuya densidad es inferior a 1.044 g/mL forman un precipitado amarillo en el fondo del tubo. El sobrenadante contiene partículas de HDL y sdLDL cuya densidad es superior a 1.044 g/mL e inferior a 1.063 g/mL. En el sobrenadante se midió la concentración de C-HDL y de colesterol total utilizando el analizador Cobas 8000 (Roche® Diagnostics). Dado que el sobrenadante solo contenía el colesterol contenido en las HDL y las sdLDL, la concentración de C-sdLDL se estimó restando el C-HDL de la concentración total de colesterol.

4.3.3 Perfil lipídico avanzado mediante RMN

Se diluyeron 200 µL de suero con 50 µL de agua deuterada y 300 µL de solución tampón de fosfato (PBS) 50 mM a pH 7.4. Los espectros de ¹H-NMR se registraron a 310 K en un espectrómetro Bruker Avance III 600 (Bruker BioSciences, Madrid, España) que operaba a una frecuencia de protones de 600.20 MHz (14.1 T) [97]. Los perfiles de lipoproteínas completos se determinaron mediante la prueba Liposcale®. Estos perfiles incluían: 1) concentración de triglicéridos y colesterol; 2) el diámetro y la concentración del número de partículas VLDL, LDL y HDL; y 3) y la concentración de las partículas de las subfracciones grandes, medianas y pequeñas de las VLDL, LDL y HDL.

4.3.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables clínicas, demográficas y los perfiles lipídicos. Las variables categóricas se presentaron como número de casos y porcentajes. Las variables continuas se presentaron como media y desviación estándar (SD). La normalidad de las variables se evaluó con gráficos QQ-Plot y las distribuciones de datos no gaussianas se transformaron logarítmicamente.

Se utilizó un modelo lineal mixto con clústeres de pacientes para evaluar las diferencias en las variables lipídicas y antropométricas entre el grupo control, el grupo intervención y los seguimientos a los 6 y 12 meses. También se evaluó la interacción entre los grupos de estudio y el tiempo. Los modelos mixtos se ajustaron por sexo, edad, administración de tratamientos hipolipemiantes y tabaquismo.

Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia bilateral de 0.05 y con el programa estadístico R. versión 3.6.1.

4.4 Resultados y discusión

Para conseguir estos objetivos se realizó un estudio prospectivo sobre una subcohorte de pacientes incluidos en el estudio PREDIMED-PLUS. Se seleccionaron 202 pacientes del nodo del Hospital de Bellvitge que fueron asignados aleatoriamente al grupo control, con MedDiet (n=95) y al grupo intervención, con er-MedDiet+PA (n=107).

Como resultado de la randomización no se detectaron sesgos en la selección de los pacientes y por tanto no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo intervención ni en variables antropométricas, perfil lipídico clásico o avanzado. Concretamente es importante destacar que los resultados de todas las magnitudes del perfil lipídico clásico cumplen los objetivos terapéuticos establecidos por la NCEP (10) a excepción de la concentración de Tg que supera el valor de 1.70 mmol/L. El análisis descriptivo en la visita basal de las variables antropométricas y el perfil lipídico clásico se recoge en la tabla 4.

Tabla 4. Análisis descriptivo de variables antropométricas, demográficas y del perfil lipídico clásico

	Total n=202	Control MedDiet n=95	Intervención ER-MedDiet + PA n=107
Edad (años)	64.5 (4.58)	64.2 (4.82)	64.8 (4.37)
Sexo (%)			
Hombres	103 (51.0%)	49 (51.6%)	54 (50.5%)
Mujeres	99 (49.0%)	46 (48.4%)	53 (49.5%)
Fumadores (%)			
Si	27 (13.4%)	12 (12.6%)	15 (14.0%)
Exfumadores (0-1 años)	3 (1.49%)	2 (2.11%)	1 (0.93%)
Exfumadores (0-5 años)	9 (4.46%)	3 (3.16%)	6 (5.61%)
Exfumadores (>5 años)	72 (35.6%)	37 (38.9%)	35 (32.7%)
No	91 (45.0%)	41 (43.2%)	50 (46.7%)
Tratamiento hipolipemiente (%)	118 (73.8%)	55 (71.4%)	63 (75.9%)
Peso (Kg)	85.3 (12.6)	85.4 (12.4)	85.3 (12.9)
Cintura (cm)	107 (9.30)	107 (9.17)	107 (9.46)
Cadera (cm)	107 (7.79)	107 (7.24)	108 (8.27)
IMC (Kg/m ²)	32.0 (2.88)	31.9 (2.65)	32.0 (3.09)
C-LDL (mmol/L)	3.02 (0.87)	3.04 (0.90)	3.00 (0.85)
C-HDL (mmol/L)	1.24 (0.37)	1.24 (0.39)	1.25 (0.35)
Tg (mmol/L)	2.00 (0.49)	1.81 (0.52)	2.22 (0.47)
C-No HDL (mmol/L)	3.64 (1.11)	3.81 (0.94)	3.49 (1.23)

Tabla 4. Análisis descriptivo de variables antropométricas, demográficas y del perfil lipídico clásico. IMC (Índice de Masa Corporal). C-LDL (Colesterol LDL); C-HDL (Colesterol HDL); Tg (Triglicéridos); C-No HDL (Colesterol No-HDL). Los resultados se muestran como media y desviación estándar y porcentajes.

En cuanto al perfil lipídico avanzado se puede observar como la concentración de C-sdLDL supera el límite superior del valor de referencia publicado. Por otro lado, es importante destacar como

la subfracción predominante de las lipoproteínas LDL y HDL es la más pequeña, representando sLDL el 61,2% y sHDL el 67,7%. Estos resultados concuerdan con las alteraciones lipídicas relacionadas con el SM y que subyacen al inicio de la enfermedad aterosclerótica (68). Para evaluar el efecto de la MedDiet tradicional y del programa er-MedDiet+PA en las variables lipídicas y antropométricas, se realizaron modelos lineales mixtos con clústeres de pacientes. Para determinar las diferencias entre el grupo control e intervención se evaluó la interacción entre los grupos de estudio y el tiempo y se ajustaron los modelos por sexo, edad, tratamientos hipolipemiantes y tabaquismo.

En lo que concierne a las variables antropométricas se confirma la pérdida de peso y reducción del perímetro abdominal que se observó en el estudio PREDIMED con resultados significativos a los 6 meses y al año. Los nuevos resultados que aporta este estudio es que se detectaron diferencias significativas entre el grupo MedDiet y el grupo er-MedDiet+PA. El programa de intervención intensiva demostró ser más efectivo, con una predicción a los 6 meses de pérdida de peso de 3.93 Kg, y una reducción de 2.94 cm y de 1.76 cm con respecto al grupo MedDiet y atención sanitaria convencional. Estos resultados son significativos y mantienen su significación a los 12 meses. Por tanto, podemos concluir que para alcanzar objetivos de pérdida de peso es muy importante restringir la ingesta calórica y realizar de forma habitual ejercicio físico.

Por otro lado, la respuesta a la MedDiet obtenida a través del perfil lipídico clásico se ha manifestado con una disminución de Tg y un incremento de C-HDL a los 6 meses y una reducción de C-LDL y de C-No HDL a los 12 meses. Al evaluar la interacción entre los dos grupos de estudio y corregir por variables de control se detecta que existen diferencias significativas entre la concentración de C-HDL y de Tg a los 12 meses. En el grupo er-MedDiet+PA, el modelo predice una disminución de Tg de 0.15 mmol/L y un incremento de C-HDL de 0,1 mmol/L con respecto al grupo MedDiet. Estos resultados no se replican para las concentraciones de C-LDL y C-No HDL, demostrando que estas variables no se ven tan influenciadas por el balance calórico resultado de la dieta y el ejercicio, pero si por los efectos beneficiosos de la MedDiet tradicional. Estos resultados son similares a los publicados en otros estudios que han demostrado un aumento de la concentración de C-LDL tras sesiones de ejercicio intensas o tras el seguimiento de un régimen hipocalórico. (137-139).

Por tanto, la restricción calórica y el ejercicio han demostrado ser efectivos en mejorar 2 de los tres componentes de la triada lipídica, C-HDL y Tg. Incluso al corregir por el tratamiento hipolipemiante, ambas continúan siendo significativas, enfatizando la necesidad de insistir en la adopción de hábitos de vida saludables en pacientes con SM, independientemente del

tratamiento farmacológico. Esta tendencia no se observa en la concentración de C-LDL y C-No HDL. Aunque la MedDiet ha demostrado disminuir su concentración, al corregir por tratamiento hipolipemiante estos resultados pierden su significación.

Con respecto al perfil lipídico avanzado la MedDiet ha demostrado ser efectiva en disminuir la concentración de C-sdLDL, C-IDL y Tg-HDL e incrementar la de LDL-P. Estos resultados se muestran en la tabla 5. A pesar que no se haya predicho una disminución de LDL-P es evidente que la composición de las lipoproteínas LDL ha mejorado. La MedDiet promueve la formación de partículas LDL más grandes y ligeras y por tanto con una menor capacidad para infiltrarse en el endotelio vascular. Como consecuencia el colesterol contenido en las partículas sdLDL que es uno de los mayores promotores de la formación de la placa de ateroma (42) disminuye 0.13 mmol/L a los 12 meses. Estos resultados demuestran que la MedDiet tradicional fomenta la formación de las partículas LDL menos aterogénicas. Por otro lado, aunque se predice una disminución del número de partículas HDL-P, su composición es mejor observándose una disminución de 0.14 mg/dL en su contenido en Tg. Estos resultados son importantes ya que las partículas HDL con un mayor contenido en Tg son las precursoras de las sHDL-P más inestables y fácilmente degradables que se asocian con una mayor inestabilidad de la placa de ateroma (75). Por otro lado, también otros estudios han demostrado la relación entre Tg-HDL y los componentes del SM además de relacionarse con la presencia de placas en la carótida (92). Por último, se detecta una disminución significativa de C-IDL de 2.72 mg/dL y una tendencia a la significación en la disminución de las lipoproteínas remanentes ($p=0.057$). Estos resultados están en la línea de la disminución de Tg observada en el perfil lipídico clásico.

En relación al programa er-MedDiet+PA los resultados se recogen en la tabla 5. El hecho más destacable es el cambio en la distribución del colesterol contenido en las LDL. Se observa una clara disminución de C-sdLDL y de C-sdLDL/C-LDL a los 6 meses y C-sdLDL/C-LDL (%) mantiene su significación a los 12 meses, incluso tras corregir por variables control como el tratamiento hipolipemiante. Estos resultados coinciden con los obtenidos al evaluar el efecto de la MedDiet. A pesar de que de nuevo no se detecta una disminución de LDL-P, estos resultados remarcan los beneficios de la restricción calórica y el ejercicio en la composición de las partículas LDL. Mientras que C-LDL y LDL-P no se ven influenciados por la intervención intensiva si lo hace la concentración de C-sdLDL (Figura 9). Estos resultados están en la línea de los estudios previos presentados en este trabajo, mostrando que para controlar la subfracción más aterogénica de las LDL las estatinas puede que no sean suficientes. También se detecta una mejora de las variables más relacionadas con el metabolismo de los Tg. Se predice una disminución significativa de los Tg contenidos en las VLDL y de la concentración de Lp(a) (Figura 9). Estos

componentes eran los promotores de las alteraciones lipídicas conocidas como la triada lipídica, produciendo partículas LDL más aterogénicas y partículas HDL más lábiles (73). Por tanto, se detecta una tendencia a la significación en la reducción de Tg-HDL ($p=0.078$) aunque no se hayan detectado diferencias significativas en HDL-Z y IHDL.

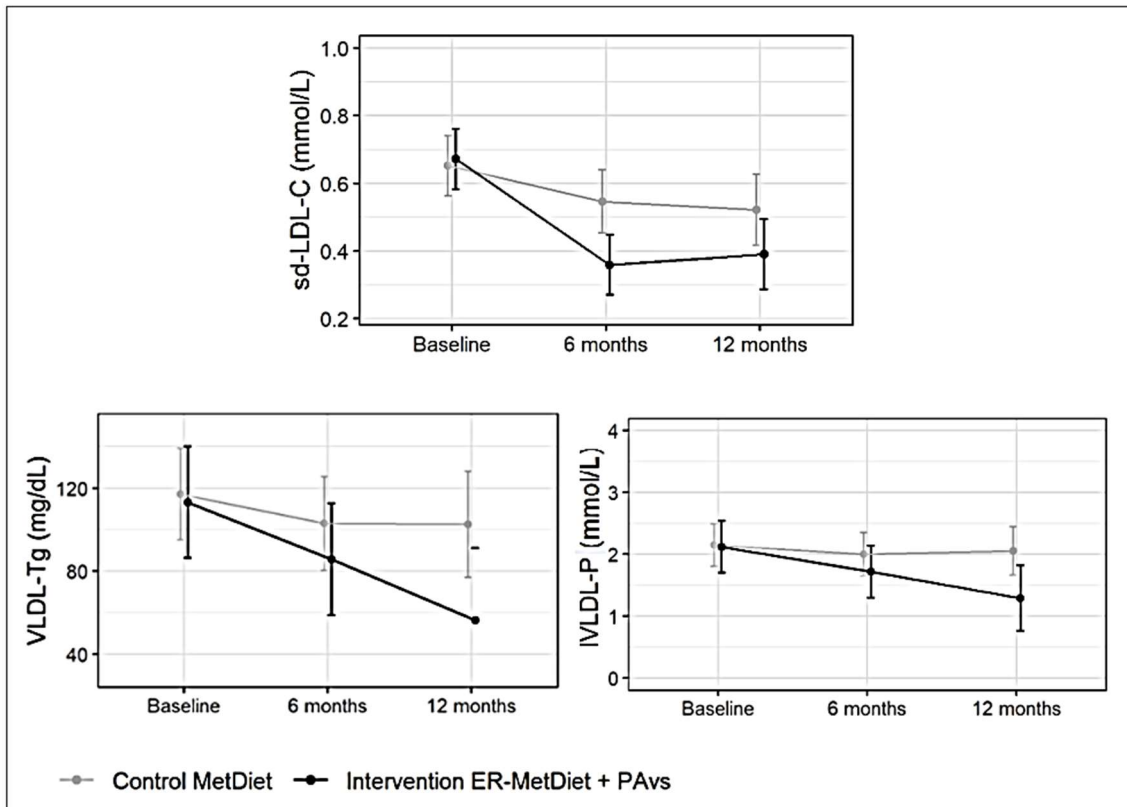


Figura 9. Efecto de la MedDiet y ER-MedDiet+PAV en la concentración de C-sdLDL, IVLDL-P y Tg-VLDL. sd-LDL-C (Colesterol en las partículas LDL pequeñas y densas); VLDL-Tg (Triglicéridos en las partículas VLDL); IVLDL-P (Número de partículas LDL grandes); Baseline (Visita basal); 6 months (Seguimiento a los 6 meses); 12 months (Seguimiento a los 12 meses).

Estos resultados demuestran la efectividad de la MedDiet y de la er-MedDiet+PA en mejorar los componentes del perfil lipídico avanzado que se asocian a la triada lipídica y por tanto al riesgo cardiovascular residual. De esta manera, se podría explicar como individuos que han alcanzado el objetivo terapéutico de C-LDL siguen presentando un riesgo de sufrir eventos isquémicos (34). Por tanto, combinar el tratamiento con estatinas que es efectivo en disminuir el C-LDL, con la MedDiet hipocalórica y el ejercicio que mejoran la composición de las LDL, puede mejorar el efecto preventivo derivado de la disminución de la concentración total de C-LDL.

Tabla 5. Efecto de la MedDiet y ER-MedDiet-PA en las variables lipídicas y antropométricas durante los seguimientos a los 6 y 12 meses.

	6 meses		12 meses		Intervención ER-MedDiet (*)		Intervención ER-MedDiet (*)	
	Coefficiente [IC 95%]	p	Coefficiente [IC 95%]	p	Coefficiente [IC 95%]	p	Coefficiente [IC 95%]	p
Peso (Kg)	-1.66[-2.35;-0.97]	<0.01	-1.69[-2.38;-1]	<0.01	-3.93[-4.89;-2.97]	<0.01	-3.89[-4.85;-2.92]	<0.01
Cintura (cm)	-1.95[-2.99;-0.91]	<0.01	-2.21[-3.26;-1.15]	<0.01	-2.94[-4.4;-1.48]	<0.01	-2.16[-3.64;-0.68]	<0.01
Cadera (cm)	-0.97[-1.9;-0.03]	0.043	-0.61[-1.56;0.34]	0.208	-1.76[-3.07;-0.45]	<0.01	-2.22[-3.55;-0.89]	<0.01
C-LDL(mmol/L)	-0.1[-0.26;0.06]	0.212	-0.26[-0.42;-0.1]	<0.01	0.04[-0.18;0.26]	0.727	0.23[0.01;0.45]	0.044
C-HDL (mmol/L)	0.04[0;0.09]	0.047	0.02[-0.03;0.06]	0.446	0.04[-0.02;0.1]	0.233	0.1[0.04;0.17]	<0.01
LOG(Tg (mmol/L))	-0.16[-0.25;-0.08]	<0.01	-0.06[-0.15;0.03]	0.176	-0.06[-0.18;0.07]	0.385	-0.15[-0.28;-0.02]	0.021
C-No HDL (mmol/L)	-0.1[-0.33;0.13]	0.385	-0.37[-0.62;-0.11]	<0.01	0.08[-0.25;0.4]	0.65	0.54[0.17;0.91]	<0.01
C-IDL (mg/dL)	-2.28[-4.66;0.09]	0.06	-2.72[-5.43;-0.01]	0.049	-0.78[-4.29;2.72]	0.661	-1.97[-6.43;2.49]	0.386
C-sdLDL (mmol/L)	-0.11[-0.23;0.02]	0.091	-0.13[-0.26;0]	0.049	-0.21[-0.38;-0.04]	0.016	-0.15[-0.33;0.03]	0.108
sd-C-LDL/C-LDL(%)	-0.07[-3.52;3.38]	0.969	-0.85[-4.64;2.94]	0.661	-9.23[-14.11;-4.34]	<0.01	-5.62[-11.28;0.03]	0.051
C-VLDL (mg/dL)	-4.98[-10.55;0.6]	0.08	-4.11[-10.51;2.29]	0.208	-3.32[-11.58;4.94]	0.431	-10.38[-21.02;0.26]	0.056
VTg-LDL (mg/dL)	-14.14[-35.32;7.04]	0.191	-14.5[-38.78;9.79]	0.242	-13.36[-44.71;17.99]	0.404	-42.33[-82.56;-2.1]	0.039
IVLDL-P (nmol/L)	-0.15[-0.45;0.16]	0.336	-0.1[-0.45;0.25]	0.588	-0.25[-0.7;0.2]	0.276	-0.73[-1.32;-0.15]	0.014
Tg-HDL (mg/dL)	-4.19[-8.2;-0.19]	0.04	-0.96[-5.46;3.54]	0.676	-1.48[-7.32;4.36]	0.62	-6.56[-13.87;0.74]	0.078
HDL-P (µmol/L)	-2.67[-5.3;-0.05]	0.046	-0.17[-3.15;2.8]	0.909	2.45[-1.41;6.31]	0.214	-0.81[-5.66;4.04]	0.744
VLDL+C-IDLC (mg/dL)	-7.26[-14.73;0.21]	0.057	-6.87[-15.44;1.69]	0.116	-4.17[-15.23;6.89]	0.46	-12.19[-26.38;1.99]	0.092

Tabla 5. Efecto de la MedDiet y ER-MedDiet-PA en las variables lipídicas y antropométricas durante los seguimientos a los 6 y 12 meses. Los resultados significativos se muestran en negrita. C-LDL (Colesterol LDL); C-HDL (Colesterol HDL); Tg (Triglicéridos); C-No HDL (Colesterol No HDL); C-IDL (Colesterol IDL); C-sdLDL (Colesterol LDL pequeñas y densas); ILDL-P (Número de partículas LDL grandes); C-VLDL (Colesterol VLDL); VTg-LDL (Triglicéridos en las VLDL); IVLDL-P (Número de partículas VLDL grandes); Tg-HDL (Triglicéridos en las HDL); HDL-P (Número de partículas HDL); VLDL+C-IDLC (Lipoproteínas Remanentes); 12M (12 meses); [IC95%] (Intervalo de confianza 95%). (*) Resultados ajustados por grupo tiempo, interacción grupo tiempo, sexo, edad, tratamiento hipolipemiante y tabaquismo.

4.4 Conclusiones

En este estudio se ha demostrado que la MedDiet y el programa er-MedDiet+PA son eficaces en mejorar el fenotipo lipoproteico característico de los pacientes con SM. En primer lugar, la MedDiet mejora los componentes de la triada lipídica, disminuyendo la concentración de Tg y C-sdLDL e incrementando la de C-HDL.

Los pacientes del programa er-MedDiet+PA han conseguido una mayor pérdida de peso y disminución del perímetro abdominal, cintura y cadera con respecto a la MedDiet. En este grupo se ha observado una mejora significativa en la composición de las lipoproteínas LDL y VLDL, con una disminución de C-sdLDL y de IVLDL-P.

1. El método de precipitación que se ha optimizado para la separación de las partículas sdLDL y posterior cuantificación del colesterol contenido en las mismas es un método económico y viable, de fácil incorporación en los laboratorios clínicos.
2. Se han obtenido unos valores de referencia para la concentración de colesterol contenido en las partículas sdLDL mediante este método y se ha validado su utilidad clínica en distintas poblaciones de interés.
3. El aumento de C-sdLDL está relacionado con un aumento del número de partículas y una disminución del diámetro de las LDL. Por tanto, las partículas LDL más pequeñas tienen un mayor contenido de colesterol aumentando su capacidad aterogénica.
4. La determinación de C-sdLDL puede ser una alternativa a la resonancia magnética nuclear para la estimación del riesgo cardiovascular residual cuando la determinación del C-LDL no es suficiente para la prevención de eventos isquémicos.
5. Las variables que tienen un mayor efecto sobre la concentración de C-sdLDL son la concentración plasmática de triglicéridos, los ácidos grasos libres y el índice de masa corporal.
6. Los cambios en las concentraciones de C-LDL observados durante el tratamiento hipolipemiante no son indicativos de los cambios en las concentraciones de C-sdLDL.
7. El perfil lipídico avanzado ha mostrado ser superior en la predicción de eventos isquémicos prematuros y del RCV frente al perfil lipídico clásico que infraestima el riesgo cardiovascular residual. La concentración plasmática de Tg-HDL, C-sdLDL y ILDL-P son buenos predictores de los eventos isquémicos prematuros y del RCVR en una población que ha alcanzado objetivos terapéuticos de C-LDL.
8. La MedDiet es eficaz para controlar el RCVR asociado a la triada lipídica que presentan los individuos con SM, ya que, disminuye la concentración plasmática de Tg y C-sdLDL y aumenta la de C-HDL.
9. El programa er-MedDiet+PA es más eficaz que la MedDiet en mejorar las características antropométricas y, de forma independiente a posibles variables confusoras, la composición de las lipoproteínas LDL y VLDL. En particular; en los modelos ajustados por variables de control se muestra una disminución en las concentraciones plasmáticas de C-sdLDL y de IVLDL-P en el grupo intervención con respecto al grupo control.

1. Authors/Task Force Members; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG); ESC National Cardiac Societies 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2019; 290:140-205.
2. Santos-Ferreira C, Baptista R, Oliveira-Santos M, Moura JP, Gonçalves L A 10- and 15-year performance analysis of ESC/EAS and ACC/AHA cardiovascular risk scores in a Southern European cohort. *BMC Cardiovasc Disorder*. 2020 19; 20(1):301.
3. Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology; European Association of Echocardiography; European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions; European Heart Rhythm Association; Heart Failure Association; European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation; European Atherosclerosis Society; International Society of Behavioral Medicine; European Stroke Organization; European Society of Hypertension; European Association for the Study of Diabetes; European Society of General Practice/Family Medicine; International Diabetes Federation Europe; European Heart Network. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *Eur J Prev Cardiol*. 2012; 19(4):585-667.
4. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, Himmelfarb CD, Khera A, Lloyd-Jones D, McEvoy JW, Michos ED, Miedema MD, Muñoz D, Smith SC Jr, Virani SS, Williams KA Sr, Yeboah J, Ziaeian B. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019 10; 140(11): e596-e646
5. Davidson WS, Cooke AL, Swertfeger DK, Shah AS. The Difference Between High Density Lipoprotein Subfractions and Subspecies: An Evolving Model in Cardiovascular Disease and Diabetes. *Curr Atheroscler Rep*. 2021 27; 23(6):23.
6. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017; 38:2459-72.
7. Flores-Guerrero JL, Gruppen EG, Connelly MA, Shalaurova I, Otvos JD, Garcia E, Bakker SJL, Dullaart RPF. A Newly Developed Diabetes Risk Index, Based on Lipoprotein Subfractions and

Branched Chain Amino Acids, is Associated with Incident Type 2 Diabetes Mellitus in the PREVEND Cohort. *J Clin Med.* 2020 27; 9(9):2781.

8. Zhou P, Liu J, Wang L, Feng W, Cao Z, Wang P, Liu G, Sun C, Shen Y, Wang L, Xu J, Meng P, Li Z, Xu WY, Lan X. Association of Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol with Stroke Risk, Severity and Prognosis. *J Atheroscler Thromb.* 2020 1; 27(12):1310-1324.

9. Joshi R, Wannamethee SG, Engmann J, Gaunt T, Lawlor DA, Price J, Papacosta O, Shah T, Tillin T, Chaturvedi N, Kivimaki M, Kuh D, Kumari M, Hughes AD, Casas JP, Humphries S, Hingorani AD, Schmidt AF. Triglyceride-containing lipoprotein sub-fractions and risk of coronary heart disease and stroke: A prospective analysis in 11,560 adults. *Eur J Prev Cardiol.* 2020; 27(15):1617-1626

10. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) *JAMA.* 2001; 285(19):2486–97.

11. Gordon DJ. Cholesterol lowering reduces mortality: the statins. Grundy SM, ed. Cholesterol-lowering therapy: evaluation of clinical trial evidence. New York: Marcel Dekker Inc., 2000:299-311.

12. Shioi A, Ikari Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. *J Atheroscler Thromb.* 2018 1; 25(4):294-303.

13. Ye X, Kong W, Zafar MI, Chen LL. Serum triglycerides as a risk factor for cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Cardiovasc Diabetol.* 2019 15; 18(1):48.

14. Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, Bailey CJ, Ceriello A, Delgado V, Federici M, Filippatos G, Grobbee DE, Hansen TB, Huikuri HV, Johansson I, Jüni P, Lettino M, Marx N, Mellbin LG, Östergren CJ, Rocca B, Roffi M, Sattar N, Seferović PM, Sousa-Uva M, Valensi P, Wheeler DC; ESC Scientific Document Group. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J.* 2020 7; 41(2):255-323.

15. Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Gao P, Pennells L, Kaptoge S, Caslake M, Thompson A, Butterworth AS, Sarwar N, Wormser D, Saleheen D, Ballantyne CM, Psaty BM, Sundstrom J, Ridker PM, Nagel D, Gillum RF, Ford I, Ducimetiere P, Kiechl S, Koenig W, Dullaart RP, Assmann G, D'Agostino RB Sr, Dagenais GR, Cooper JA, Kromhout D, Onat A, Tipping RW, Gomez-de-la-Camara A, Rosengren A, Sutherland SE, Gallacher J, Fowkes FG, Casiglia E, Hofman

A, Salomaa V, Barrett-Connor E, Clarke R, Brunner E, Jukema JW, Simons LA, Sandhu M, Wareham NJ, Khaw KT, Kauhanen J, Salonen JT, Howard WJ, Nordestgaard BG, Wood AM, Thompson SG, Boekholdt SM, Sattar N, Packard C, Gudnason V, Danesh J. Lipid-related markers and cardiovascular disease prediction. *JAMA* 2012; 307:2499-2506.

16. Eberly LE, Stamler J, Neaton JD. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Relation of triglyceride levels, fasting and nonfasting, to fatal and nonfatal coronary heart disease. *Arch Intern Med.* 2003; 163:1077-83.

17. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 1998; 81:18B-25B.

18. Nakajima K, Tanaka A. Atherogenic postprandial remnant lipoproteins; VLDL remnants as a causal factor in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2018; 478:200-215.

19. Lincoff AM, Nicholls SJ, Riesmeyer JS, Barter PJ, Brewer HB, Fox KAA, et al. Evacetrapib and cardiovascular outcomes in high-risk vascular disease. *N Engl J Med.* 2017; 376:1933-42.

20. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Boren J, Catapano AL, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Nordestgaard BG, Ray KK, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J* 2011; 32:1345–1361.

21. Valensi P, Avignon A, Sultan A, Chanu B, Nguyen MT, Cosson E. Atherogenic dyslipidemia and risk of silent coronary artery disease in asymptomatic patients with type 2 diabetes: A cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2016; 15:104.

22. Fruchart JC, Sacks F, Hermans MP, Assmann G, Brown WV, Ceska R, Chapman MJ, Dodson PM, Fioretto P, Ginsberg HN, Kadowaki T, Lablanche JM, Marx N, Plutzky J, Reiner Z, Rosenson RS, Staels B, Stock JK, Sy R, Wanner C, Zambon A, Zimmet P. The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in patients with dyslipidemia. *Am J Cardiol* 2008; 102: p1K–34K.

23. Voros S, Joshi P, Qian Z, Rinehart S, Vazquez-Figueroa JG, Anderson H, Elashoff M, Murrieta L, Karpalotis D, Kalynych A, Brown C 3rd, Schaefer E, Asztalos B. Apoprotein B, small-dense LDL and impaired HDL remodeling is associated with larger plaque burden and more noncalcified plaque as assessed by coronary CT angiography and intravascular ultrasound with

radiofrequency backscatter: results from the ATLANTA I study. *J Am Heart Assoc.* 2013 19;2(6): e000344.

24. Harari G, Green MS, Magid A, Zelber-Sagi S. Usefulness of Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol as a Predictor of Cardiovascular Disease Mortality in Men in 22-Year Follow-Up. *Am J Cardiol.* 2017 15; 119(8):1193-1198.

25. Biswas S, Ghoshal PK, Mandal SC, Mandal N. Association of low-density lipoprotein particle size and ratio of different lipoproteins and apolipoproteins with coronary heart disease. *J Cardiol.* 2008; 52(2):118-26.

26. Valensi P, Avignon A, Sultan A, Chanu B, Nguyen MT, Cosson E. Atherogenic dyslipidemia and risk of silent coronary artery disease in asymptomatic patients with type 2 diabetes: A cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2016; 15:104.

27. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, Hu FB, Hubbard VS, Jakicic JM, Kushner RF, Loria CM, Millen BE, Nonas CA, Pi-Sunyer FX, Stevens J, Stevens VJ, Wadden TA, Wolfe BM, Yanovski SZ, Jordan HS, Kendall KA, Lux LJ, Mentor-Marcel R, Morgan LC, Trisolini MG, Wnek J, Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK, Smith SC Jr, Tomaselli GF; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; Obesity Society. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation.* 2014 24; 129(25 Suppl 2): S102-38.

28. Glasser SP, Halberg DL, Sands C, Gamboa CM, Muntner P, Safford M. Is pulse pressure an independent risk factor for incident acute coronary heart disease events? The REGARDS study. *Am J Hypertens.* 2014; 27(4):555-6.

29. Pan A, Wang Y, Talaei M, Hu FB. Relation of Smoking With Total Mortality and Cardiovascular Events Among Patients With Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Circulation.* 2015 10; 132(19):1795-80.

30. Gepner AD, Piper ME, Johnson HM, Fiore MC, Baker TB, Stein JH. Effects of smoking and smoking cessation on lipids and lipoproteins: outcomes from a randomized clinical trial. *Am Heart J.* 2011; 161(1):145-51.

31. Salas-Salvadó J, Díaz-López A, Ruiz-Canela M, Basora J, Fitó M, Corella D, Serra-Majem L, Wärnberg J, Romaguera D, Estruch R, Vidal J, Martínez JA, Arós F, Vázquez C, Ros E, Vioque J, López-Miranda J, Bueno-Cavanillas A, Tur JA, Tinahones FJ, Martín V, Lapetra J, Pintó X, Daimiel L, Delgado-Rodríguez M, Matía P, Gómez-Gracia E, Díez-Espino J, Babio N, Castañer O, Sorlí JV, Fiol M, Zulet MÁ, Bulló M, Goday A, Martínez-González MÁ; PREDIMED-Plus investigators. Effect of a Lifestyle Intervention Program With Energy-Restricted Mediterranean Diet and Exercise on Weight Loss and Cardiovascular Risk Factors: One-Year Results of the PREDIMED-Plus Trial. *Diabetes Care*. 2019 May;42(5):777-788.
32. Kahleova H, Salas-Salvadó J, Rahelić D, Kendall CW, Rembert E, Sievenpiper JL. Dietary Patterns and Cardiometabolic Outcomes in Diabetes: A Summary of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients*. 2019 13; 11(9):2209.
33. Fernández-Friera L, Fuster V, López-Melgar B, Oliva B, García-Ruiz JM, Mendiguren J, Bueno H, Pocock S, Ibáñez B, Fernández-Ortiz A, Sanz J. Normal LDL cholesterol Levels Are Associated with Subclinical Atherosclerosis in the Absence of Risk Factors. *J Am Coll Cardiol*. 2017 19; 70(24):2979-2991.
34. Al Rifai M, Martin SS, McEvoy JW, Nasir K, Blankstein R, Yeboah J, Miedema M, Shea SJ, Polak JF, Ouyang P, Blumenthal RS, Bittencourt M, Bensenor I, Santos RD, Duncan BB, Santos IS, Lotufo PA, Blaha MJ. The prevalence and correlates of sub-clinical atherosclerosis among adults with low-density lipoprotein cholesterol <70 mg/dL: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) and Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Atherosclerosis* 2018; 274:61-66.
35. Kones R. Molecular sources of residual cardiovascular risk, clinical signals, and innovative solutions: relationship with subclinical disease, undertreatment, and poor adherence: implications of new evidence upon optimizing cardiovascular patient outcomes. *Vasc Health Risk Manag*. 2013; 9:617-70.
36. Ong KL, McClelland RL, Allison MA, Cushman M, Garg PK, Tsai MY, Rye KA, Tabet F. Lipoprotein (a) and coronary artery calcification: prospective study assessing interactions with other risk factors. *Metabolism*. 2021; 116:154706.
37. Salsoso R, Dalcoquio TF, Furtado RHM, Franci A, Barbosa CJDG, Genestreti PRR, Strunz CMC, Lima V, Baracioli LM, Giugliano RP, Goodman SG, Gurbel PA, Maranhão RC, Nicolau JC. Relation of High Lipoprotein (a) Concentrations to Platelet Reactivity in Individuals with and Without Coronary Artery Disease. *Adv Ther*. 2020; 37(11):4568-4584.

38. Li C, Chen Q, Zhang M, Liu Y, Chu Y, Meng F, Wang J, Tang J, Luo J, Niu X, Wei M. The correlation between lipoprotein(a) and coronary atherosclerotic lesion is stronger than C-LDL, when C-LDL is less than 104 mg/dL. *BMC Cardiovasc Disord*. 2021 19; 21(1):41.
39. Wu MF, Xu KZ, Guo YG, Yu J, Wu Y, Lin LM. Lipoprotein(a) and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Current Understanding and Future Perspectives. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2019; 33(6):739-74.
40. 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.
41. Shoji T, Hatsuda S, Tsuchikura S, Shinohara K, Kimoto E, Koyama H, et al. Small dense low-density lipoprotein cholesterol concentration and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009; 202(2):582–8.
42. Ikezaki H, Furusyo N, Yokota Y, Ai M, Asztalos BF, Murata M, Hayashi J, Schaefer EJ. Small Dense Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Carotid Intimal Medial Thickness Progression. *J Atheroscler Thromb*. 2020 1; 27(10):1108-1122.
43. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017; 38:2459-72.
44. Haim M, Tanne D, Goldbourt U, Doolman R, Boyko V, Brunner D, Sela BA, Behar S. Serum homocysteine and long-term risk of myocardial infarction and sudden death in patients with coronary heart disease. *Cardiology*. 2007; 107(1):52-6.
45. Amaral FM, Miranda-Vilela AL, Lordelo GS, Ribeiro IF, Daldegan MB, Grisolia CK. Interactions among methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and cystathionine beta-synthase (CBS) polymorphisms. A cross-sectional study: multiple heterozygosis as a risk factor for higher homocysteine levels and vaso-occlusive episodes. *Genet Mol Res*. 2017 23; 16(1).
46. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocysteine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation* 1999; 99:178-82.

47. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Yannakoulia M, Chrysohoou C, Stefanadis C. The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The ATTICA study. *Atherosclerosis*. 2005; 183(2):308-15.
48. Marrugat J, D'Agostino R, Sullivan L, Elosua R, Wilson P, Ordovas J, et al. An adaptation of the Framingham coronary heart disease risk function to European Mediterranean areas. *J Epidemiol Community Health*. 2003; 57(8):634-8.
49. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer D, et al, SCORE Project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE Project. *Eur Heart J*. 2003; 24:987-1003.
50. Marrugat J, D'Agostino R, Sullivan L, Elosua R, Wilson P, Ordovas J, et al. An adaptation of the Framingham coronary heart disease risk function to European Mediterranean areas. *J Epidemiol Community Health*. 2003; 57(8):634-8.
51. Buitrago F, Cañón L, Díaz N, Cruces E, Bravo B, Pérez I. Comparación entre la tabla del SCORE y la función Framingham-REGICOR en la estimación del riesgo cardiovascular en una población urbana seguida durante 10 años. *Med Clin (Barc)*. 2006; 127(10):368-73.
52. Ramos R, Solanas P, Subirana I, Vila J. Cartas al editor. *Med Clin (Barc)*. 2007, 128(12):477-9.
53. Ray KK, Kastelein JJP, Boekholdt SM, Nicholls SJ, Khaw KT, Ballantyne CM, et al. The ACC/AHA 2013 guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults: the good the bad and the uncertain: A comparison with ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias 2011. *Eur Heart J*. 2014; 35:9608.
54. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis*. 2011; 217 Suppl 1: S1-44.8.
55. Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, McIntyre AD, Ban MR, Martins RA, et al. An increased burden of common and rare lipid associated risk alleles contributes to the phenotypic spectrum of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31:1916-26.
56. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard NG, Kuivenhoven JA, Averna M, et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: Implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014; 2:655-66.

57. Vodnala D, Rubenfire M, Brook RD. Secondary causes of dyslipidemia. *Am J Cardiol.* 2012; 110:823-825.
58. Mallika V, Goswami B, Rajappa M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: A clinic biochemical perspective. Vol. 58, *Angiology* 2007; 513-22.
59. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomized trials of statins. *Lancet.* 2005; 366:1267-78.
60. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated remnant cholesterol causes both low-grade inflammation and ischemic heart disease, whereas elevated low-density lipoprotein cholesterol causes ischemic heart disease without inflammation. *Circulation.* 2013; 128:1298-309.
61. Wang L, Gill R, Pedersen TL, Higgins LJ, Newman JW, Rutledge JC. Triglyceride-rich lipoprotein Lipolysis releases neutral and oxidized FFAs that induce endothelial cell inflammation. *J Lipid Res.* 2009; 50:204-13.
62. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S Epidemiology of atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res.* 2016 19; 118(4):535-46.
63. López-Melgar B, Fernández-Friera L, Oliva B, García-Ruiz JM, Sánchez-Cabo F, Bueno H, Mendiguren JM, Lara-Pezzi E, Andrés V, Ibáñez B, Fernández-Ortiz A, Sanz J, Fuster V. Short-Term Progression of Multiterritorial Subclinical Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2020 14; 75(14):1617-1627.
64. Aboyans V, Ricco JB, Bartelink MEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, Collet JP, Czerny M, De Carlo M, Debus S, Espinola-Klein C, Kahan T, Kownator S, Mazzolai L, Naylor AR, Roffi M, Röther J, Sprynger M, Tendera M, Tepe G, Venermo M, Vlachopoulos C, Desormais I. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO)The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). ESC Scientific Document Group. *Eur Heart J.* 2018 1; 39(9):763-816.

65. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kottke TE, Giles WH, Capewell S. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N Engl J Med*. 2007 Jun 7; 356(23):2388-98.
66. Kearney PM, Blackwell PM, Collins R, Keech A, Simes J, Peto R, et al., Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy of cholesterol lowering therapy in 18686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: A meta-analysis. *Lancet*. 2008; 371:117-25.
67. Fruchart JC, Davignon J, Hermans MP, Al-Rubeaan K, Amarenco P, Assmann G, et al. Residual macrovascular risk in 2013: what have we learned? *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13:26.
68. Brunzell JD, Davidson M, Furberg CD, Goldberg RB, Howard BV, Stein JH, et al. Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: Consensus statement from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. *Diabetes Care*. 2008; 31:811-22.
69. Fernández-Quintela A, Churruga I, Portillo MP. The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr* 2007; 10 (10A): 1126-1131.
70. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6 (10): 772-783.
71. Manco M, Calvani M, Mingrone G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Obes Metab*. 2004; 6 (6): 402-413.
72. Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107 (2): 119- 125.
73. Frayn KN. Insulin resistance, impaired postprandial lipid metabolism and abdominal obesity. A deadly triad. *Med Princ Pract*. 2002; 11 Suppl 2:31-40.
74. Shin HK, Kim YK, Kim KY, Lee JH, Hong KW. Remnant lipoprotein particles induce apoptosis in endothelial cells by NAD(P)H oxidase-mediated production of superoxide and cytokines via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor- 1 activation: Prevention by cilostazol. *Circulation*. 2004; 109:1022-8.
75. Wang X, Liu X, Xie Z, Tian J, Huang X, Zhang R, Chen S, Hou J, Yu B. Small HDL subclass is associated with coronary plaque stability: An optical coherence tomography study in patients with coronary artery disease. *J Clin Lipidol*. 2019; 13(2):326-334.e2.

76. Otvos JD, Mora S, Shalaurova I, Greenland P, Mackey RH, Goff Jr DC. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *J Clin Lipidol* 2011; 5:105–13.
77. O. Melander, D. Shiffman, M.P. Caulfield, et al. Low-density lipoprotein particle number is associated with cardiovascular events among those not classified into statin benefit groups, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015 Jun 16;65(23):2571-3.
78. Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Fitzgerald A, Conroy R, Sans S, Menotti A, De Backer G, Jousilahti P, Keil U, Thomsen T, Whincup P, Graham I; SCORE Investigators. How much does HDL cholesterol add to risk estimation? A report from the SCORE Investigators. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2009; 16(3):304-14.
79. Garber AJ, Abrahamson MJ, Barzilay JI, et al. American association of clinical endocrinologists' comprehensive diabetes management algorithm 2013 consensus statement. *Endocr Pract* 2013; 19(Suppl. 1):1e48.
80. Jesús Millán Núñez-Cortés 1, Juan Pedro-Botet Montoya, Xavier Pintó Salas, Antonio Hernández Mijares, Vincent J Carey, Michel P Hermans, Frank M Sacks, Jean-Charles Fruchart. The REALIST (REsidual risk, Lpids and Standard Therapies) study: an analysis of residual risk attributable to lipid profile in acute coronary syndrome. *Endocrinol Nutr.* 2011;58 (1):38-47.
81. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Münster study. *Am J Cardiol.* 1992; 70:733-7.
82. Ferrari R, Aguiar C, Alegria E, Bonadonna RC, Cosentino F, Elisaf M, Farnier M, Ferrières J, Filardi PP, Hancu N, Kayikcioglu M, Mello E Silva A, Millan J, Reiner Ž, Tokgozoglu L, Valensi P, Viigimaa M, Vrablik M, Zambon A, Zamorano JL, Catapano AL. Current practice in identifying and treating cardiovascular risk, with a focus on residual risk associated with atherogenic dyslipidaemia. *Eur Heart J Suppl.* 2016 12; 18(Suppl C):C2-C12.
83. Reyes-Soffer G, Ngai CI, Lovato L, Karmally W, Ramakrishnan R, Holleran S, et al. Effect of combination therapy with fenofibrate and simvastatin on postprandial lipemia in the ACCORD Lipid Trial. *Diabetes Care.* 2013; 36:422-8.
84. Rosenson RS, Underberg JA. Systematic review: Evaluating the effect of lipid-lowering therapy on lipoprotein and lipid values. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013; 27:465-79.

85. Edwards SH, Kimberly MM, Pyatt SD, Stribling SL, Dobbin KD, Myers GL. Proposed serum cholesterol reference measurement procedure by gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Clin Chem.* 2011; 57:614-22.27.
86. Edwards SH, Stribling SL, Pyatt SD, Kimberly MM. Reference measurement procedure for total glycerides by isotope dilution GC-MS. *Clin Chem.* 2012; 58:768-76.29.
87. Okamoto Y, Tanaka S, Nakano H. Direct measurement of HDL cholesterol is preferable to precipitation method. *Clin Chem.*1995; 41:1784.30.
88. Catapano AL, Graham I, de Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, et al. 2016 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J.* 2016; 37:2999-3058.
89. Toth PP, Grabner M, Punekar RS, Quimbo RA, Cziraky MJ, Jacobson TA. Cardiovascular risk in patients achieving low-density lipoprotein cholesterol and particle targets. *Atherosclerosis.* 2014; 235(2):585-91.
90. Albers JJ, Slee A, Fleg JL, O'Brien KD, Marcovina SM Relationship of baseline HDL subclasses, small dense LDL and LDL triglyceride to cardiovascular events in the AIM-HIGH clinical trial. *Atherosclerosis.* 2016; 251:454-459.
91. Duparc T, Ruidavets JB, Genoux A, Ingueneau C, Najib S, Ferrières J, Perret B, Martinez LO. Serum level of HDL particles are independently associated with long-term prognosis in patients with coronary artery disease: The GENES study. *Sci Rep.* 2020 18; 10(1):8138.
92. Girona J, Amigó N, Ibarretxe D, Plana N, Rodríguez-Borjabad C, Heras M, Ferré R, Gil M, Correig X, Masana L HDL Triglycerides: A New Marker of Metabolic and Cardiovascular Risk. *Int J Mol Sci.* 2019 27; 20(13):315.
93. Xu RX, Li S, Li XL, Zhang Y, Guo YL, Zhu CG, Wu NQ, Qing P, Sun J, Dong Q, Li JJ. High-density lipoprotein subfractions in relation with the severity of coronary artery disease: A Gensini score assessment. *J Clin Lipidol.* 2015; 9(1):26-34.
94. Grundy SM. Atherogenic dyslipidemia: lipoprotein abnormalities and implications for therapy. *Am J Cardiol.* 1995; 75(6):45B–52B.
95. Hirano T, Ito Y, Saegusa H, Yoshino G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J Lipid Res.* 2003; 44(11):2193–2201.

96. Matyus SP, Braun PJ, Wolak-Dinsmore J, et al. NMR measurement of LDL particle number using the Vantera Clinical Analyzer. *Clin Biochem*. 2014; 47(16–17):203-210.
97. Mallol R, Amigó N, Rodríguez MA, et al. Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered ¹H NMR spectroscopy. *J Lipid Res*. 2015; 56(3):737-746.
98. Berry JD, Liu K, Folsom AR, et al. Prevalence and progression of subclinical atherosclerosis in younger adults with low short-term but high lifetime estimated risk for cardiovascular disease: the coronary artery risk development in young adults' study and multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation* 2009; 119:382–9.
99. Failed II, Soto MM. Changes in health-related quality of life 3 months after an acute coronary syndrome. *BMC Public Health* 2006; 6:18.
100. Krittanawong C, Liu Y, Mahtta D, Narasimhan B, Wang Z, Jneid H, Tamis-Holland JE, Mahboob A, Baber U, Mehran R, Wilson Tang WH, Ballantyne CM, Virani SS. Non-traditional risk factors and the risk of myocardial infarction in the young in the US population-based cohort. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2020 23; 30:100634.
101. Quispe R, Hendrani AD, Baradaran-Noveiry B, Martin SS, Brown E, Kulkarni KR, Banach M, Toth PP, Brinton EA, Jones SR, Joshi PH. Characterization of lipoprotein profiles in patients with hypertriglyceridemic Fredrickson-Levy and Lees dyslipidemia phenotypes: The Very Large Database of Lipids Studies 6 and 7. *Arch Med Sci*. 2019; 15(5):1195-1202.
102. Fernández-Cidón B, Candás-Estébanez B, Gil-Serret M, Amigó N, Corbella E, Rodríguez-Sánchez MÁ, Padró-Miquel A, Brotons C, Hernández-Mijares A, Calmarza P, Jarauta E, Brea AJ, Mauri M, Guijarro C, Vila À, Valdivielso P, Corbella X, Pintó X. Physicochemical Properties of Lipoproteins Assessed by Nuclear Magnetic Resonance as a Predictor of Premature Cardiovascular Disease. PRESARV-SEA Study. *J Clin Med*. 2021 29; 10(7):1379.
103. Mora S, Szklo M, Otvos JD, Greenland P, Psaty BM, Goff DC Jr, O'Leary DH, Saad MF, Tsai MY, Sharrett AR. LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*. 2007; 192(1):211-7.
104. Kahleova H, Salas-Salvadó J, Rahelić D, Kendall CW, Rembert E, Sievenpiper JL Dietary Patterns and Cardiometabolic Outcomes in Diabetes: A Summary of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients*. 2019 13; 11(9):2209.

105. Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77:1146-55.
106. Ramón Estruch, Emilio Ros, Jordi Salas-Salvadó, Maria-Isabel Covas, Dolores Corella, Fernando Arós, Enrique Gómez-Gracia, Valentina Ruiz-Gutiérrez, Miquel Fiol, José Lapetra, Rosa Maria Lamuela-Raventos, Lluís Serra-Majem, Xavier Pintó, Josep Basora, Miguel Angel Muñoz, José V. Sorlí, José Alfredo Martínez, and Miguel Angel Martínez-González, for the PREDIMED Study Investigators. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N Engl J Med* 2013; 368:1279-1290.
107. Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Ros E, de Caterina R, Badimon L, Covas MI, et al. Olive oil and health: Summary of the II International Conference on Olive Oil and Health Consensus Report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010; 20:284-94.
108. Hu T, Jacobs DR, Bazzano LA, Bertoni AG, Steffen LM. Low-carbohydrate diets and prevalence, incidence and progression of coronary artery calcium in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Br J Nutr.* 2019; 11:1-8.
109. Chiavaroli L, Vigiouk E, Nishi SK, Blanco Mejia S, Rahelić D, Kahleová H, Salas-Salvadó J, Kendall CW, Sievenpiper JL. DASH Dietary Pattern and Cardiometabolic Outcomes: An Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients.* 2019 5; 11(2):338.
110. Rees K, Takeda A, Martin N, Ellis L, Wijesekara D, Vepa A, Das A, Hartley L, Stranges S. Mediterranean-style diet for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 13; 3(3):CD009825.
111. Rodríguez-Martín C, Garcia-Ortiz L, Rodriguez-Sanchez E, Maderuelo-Fernandez C, Lugones-Sanchez A, Martin-Cantera MS, Soriano-Cano JF, Arietaleanizbeaskoa M, Magdalena-Belio JA, Menendez-Suarez C, Gómez-Marcos MA, Recio-Rodriguez JI, Evident Investigators Group OBOTEI. The Relationship of the Atlantic Diet with Cardiovascular Risk Factors and Markers of Arterial Stiffness in Adults without Cardiovascular Disease. *Nutrients.* 2019 29; 11(4):742.
112. Galbete C, Kröger J, Jannasch F, Iqbal K, Schwingshackl L, Schwedhelm C, Weikert C, Boeing H, Schulze MB. Nordic diet, Mediterranean diet, and the risk of chronic diseases: the EPIC-Potsdam study. *BMC Med.* 2018 27; 16(1):99.

113. Sadowska-Krępa E, Gdańska A, Rozpara M, Pilch W, Přidalová M, Bańkowski S. Effect of 12-Week Interventions Involving Nordic Walking Exercise and a Modified Diet on the Anthropometric Parameters and Blood Lipid Profiles in Overweight and Obese Ex-Coal Miners. *Obes Facts*. 2020; 13(2):201-212.
114. Chiavaroli L, Nishi SK, Khan TA, Braunstein CR, Glenn AJ, Mejia SB, Rahelić D, Kahleová H, Salas-Salvadó J, Jenkins DJA, Kendall CWC, Sievenpiper JL. Portfolio Dietary Pattern and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-analysis of Controlled Trials. *Prog Cardiovasc Dis*. 2018; 61(1):43-53.
115. Glenn, A.J.; Vigiuliouk, E.; Seider, M.; Boucher, B.A.; Khan, T.A.; Blanco Mejia, S.; Jenkins, D.J.A.; Kahleová, H.; Rahelić, D.; Salas-Salvadó, J. Relation of Vegetarian Dietary Patterns with Major Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Front. Nutr*. 2019 13; 6:80.
116. Toledo E, Salas-Salvadó J, Donat-Vargas C, Buil-Cosiales P, Estruch R, Ros E, Corella D, Fitó M, Hu FB, Arós F, Gómez-Gracia E, Romaguera D, Ortega-Calvo M, Serra-Majem L, Pintó X, Schröder H, Basora J, Sorlí JV, Bulló M, Serra-Mir M, Martínez-González MA. Mediterranean Diet and Invasive Breast Cancer Risk Among Women at High Cardiovascular Risk in the PREDIMED Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2015; 175(11):1752-1760.
117. Hernáez Á, Sanllorente A, Castañer O, Martínez-González MÁ, Ros E, Pintó X, Estruch R, Salas-Salvadó J, Corella D, Alonso-Gómez ÁM, Serra-Majem L, Fiol M, Lapetra J, Gómez-Gracia E, de la Torre R, Lamuela-Raventós RM, Fitó M. Increased Consumption of Virgin Olive Oil, Nuts, Legumes, Whole Grains, and Fish Promotes HDL Functions in Humans. *Mol Nutr Food Res*. 2019; 63(6): e1800847.
118. Li J, Guasch-Ferré M, Chung W, Ruiz-Canela M, Toledo E, Corella D, Bhupathiraju SN, Tobias DK, Tabung FK, Hu J, Zhao T, Turman C, Feng YA, Clish CB, Mucci L, Eliassen AH, Costenbader KH, Karlson EW, Wolpin BM, Ascherio A, Rimm EB, Manson JE, Qi L, Martínez-González MÁ, Salas-Salvadó J, Hu FB, Liang L. The Mediterranean diet, plasma metabolome, and cardiovascular disease risk. *Eur Heart J*. 2020, 21; 41(28):2645-2656.
119. Salas-Salvadó J, Díaz-López A, Ruiz-Canela M, Basora J, Fitó M, Corella D, Serra-Majem L, Wärnberg J, Romaguera D, Estruch R, Vidal J, Martínez JA, Arós F, Vázquez C, Ros E, Vioque J, López-Miranda J, Bueno-Cavanillas A, Tur JA, Tinahones FJ, Martín V, Lapetra J, Pintó X, Daimiel L, Delgado-Rodríguez M, Matía P, Gómez-Gracia E, Díez-Espino J, Babio N, Castañer O, Sorlí JV, Fiol M, Zulet MÁ, Bulló M, Goday A, Martínez-González MÁ; PREDIMED-Plus investigators. Effect

of a Lifestyle Intervention Program with Energy-Restricted Mediterranean Diet and Exercise on Weight Loss and Cardiovascular Risk Factors: One-Year Results of the PREDIMED-Plus Trial. *Diabetes Care*. 2019; 42(5):777-788.

120. Cavalcante Lda S, da Silva EL. Application of a modified precipitation method for the measurement of small dense LDL Cholesterol (sdLDL-c) in a population in southern Brazil. *Clin Chem Lab Med*. 2012 Mar 3; 50(9):1649-56.

121. Xuesong F, Enshi W, Jianxun H, Lei Z, Xiaoli Z, Hui Y. Comparison of seven different reagents of peroxidase method for small and dense low density lipoprotein cholesterol (C-sdLDL) measurement. *J Clin Lab Anal*. 2021; 35(3): e23660.

122. Ito Y, Fujimura M, Ohta M, Hirano T. Development of a homogeneous assay for measurement of small dense LDL cholesterol. *Clin Chem*. 2011; 57(1):57-65.

123. Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, et al. Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-3rd Ed. CLSI Document C28-A3E. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2008.

124. Tsai MY, Steffen BT, Guan W, McClelland RL, Warnick R, McConnell J, Hoefner DM, Remaley AT. New automated assay of small dense low-density lipoprotein cholesterol identifies risk of coronary heart disease: The Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34(1):196-201.

125. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, Dodge RC, Crosby JR, Jiang J, Couper D, Virani SS, Kathiresan S, Boerwinkle E, Ballantyne CM. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34(5):1069-77.

126. Vasson MP, Farges MC, Goncalves-Mendes N, et al. Does aging affect the immune status? comparative analysis in 300 healthy volunteers from France, Austria and Spain. *Immun Ageing*. 2013; 10(1):38.

127. Tehrani DM, Zhao Y, Blaha MJ, Mora S, Mackey RH, Michos ED, Budoff MJ, Cromwell W, Otvos JD, Rosenblit PD, Wong ND Discordance of Low-Density Lipoprotein and High-Density Lipoprotein Cholesterol Particle Versus Cholesterol Concentration for the Prediction of Cardiovascular Disease in Patients With Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [MESA]). *Am J Cardiol*. 2016 15; 117(12):1921-7.

128. Degoma EM, Davis MD, Dunbar RL, Mohler ER 3rd, Greenland P, French B Discordance between non HDL cholesterol and LDL-particle measurements: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2013; 229(2):517-23.
129. Rashidi B, Hoseini Z, Sahebkar A, Mirzaei H. Anti-Atherosclerotic effects of vitamins D and E in suppression of atherogenesis. *J Cell Physiol*. 2017; 232(11):2968-2976.
130. Nishi K, Itabe H, Uno M, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(10):1649-1654.
131. Vardi M, Levy NS, Levy AP. Vitamin E in the prevention of cardiovascular disease: the importance of proper patient selection. *J Lipid Res*. 2013; 54(9):2307-14.
132. Lawler PR, Akinkuolie AO, Harada P, Glynn RJ, Chasman DI, Ridker PM, Mora S. Residual Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Events in Relation to Reductions in Very-Low-Density Lipoproteins. *J Am Heart Assoc*. 2017 9; 6(12): e007402.
133. Fernández-Castillejo, S.; Pedret, A.; Catalán, Ú.; Valls, R.M.; Farràs, M.; Rubió, L.; Castañer, O.; Macià, A.; Fitó, M.; Motilva, M.J.; et al. Virgin Olive Oil Phenolic Compounds Modulate the HDL Lipidome in Hypercholesterolaemic Subjects: A Lipidomic Analysis of the VOHF Study. *Mol. Nutr. Food Res*. 2021, e2001192.
134. Albers, J.J.; Slee, A.; Fleg, J.L.; O'Brien, K.D.; Marcovina, S.M. Relationship of baseline HDL subclasses, small dense LDL and LDL triglyceride to cardiovascular events in the AIM-HIGH clinical trial. *Atherosclerosis* 2016; 251:454-459.
135. Sabatine MS. PCSK9 inhibitors: clinical evidence and implementation. *Nat Rev Cardiol*. 2019 ; 16(3):155-165.
136. Fernández-Cidón B, Padró-Miquel A, Alía-Ramos P, Castro-Castro MJ, Fanlo-Maresma M, Dot-Bach D, Valero-Politi J, Pintó-Sala X, Candás-Estébanez B. Reference values assessment in a Mediterranean population for small dense low-density lipoprotein concentration isolated by an optimized precipitation method. *Vasc Health Risk Manag*. 2017; 13:201-207.
137. Crouse, S.F.; O'Brien, B.C.; Grandjean, P.W.; Lowe, R.C.; Rohack, J.J.; Green, J.S. Effects of training and a single session of exercise on lipids and apolipoproteins in hypercholesterolemic men. *J. Appl. Physiol*. 1997;83(6):2019-28.

138. Chen JH, Ouyang C, Ding Q, Song J, Cao W, Mao L. A Moderate Low-Carbohydrate Low-Calorie Diet Improves Lipid Profile, Insulin Sensitivity and Adiponectin Expression in Rats. *Nutrients*. 2015 11; 7(6):4724-38.

139. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H, Tangi-Rozental O, Zuk-Ramot R, Sarusi B, Brickner D, Schwartz Z, Sheiner E, Marko R, Katorza E, Thiery J, Fiedler GM, Blüher M, Stumvoll M, Stampfer MJ; Dietary Intervention Randomized Controlled Trial (DIRECT) Group. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med*. 2008 17; 359(3):229-41.

