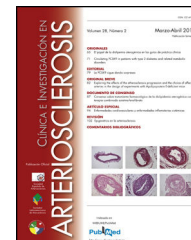




CLÍNICA E INVESTIGACIÓN EN ARTERIOSCLEROSIS

www.elsevier.es/arterio



DOCUMENTO DE CONSENSO

Documento de consenso de un grupo de expertos de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA) sobre el uso clínico de la resonancia magnética nuclear en el estudio del metabolismo lipoproteico (Liposcale)



Xavier Pintó^{a,*}, Luis Masana^{b,*}, Fernando Civeira^c, José Real^d,
Daiana Ibarretxe^b, Beatriz Candas^e, José Puzo^f, José Luis Díaz^g,
Núria Amigó^h, Margarita Estebanⁱ y Pedro Valdivielso^j

^a Unidad de Lípidos y Riesgo Vascular, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona. CiberObn. Universidad de Barcelona, Barcelona, España

^b Unidad de Medicina Vascular y Metabolismo, Hospital Universitario Sant Joan, IISPV. CIBERDEM. Universitat Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España

^c Unidad de Lípidos, Hospital Universitario Miguel Servet, IIS Aragón, CIBERCV, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

^d Servicio Endocrinología, CIBERDEM. Hospital Clínico Universitario de Valencia, Universidad de Valencia, Valencia, España

^e Bioquímica Especial y Biología Molecular, Laboratori Clínic. Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona, España

^f Unidad de Lípidos, Servicio de Análisis y Bioquímica Clínica, Hospital San Jorge de Huesca, Huesca, España

^g Unidad de Lípidos y Riesgo Cardiovascular, Servicio de Medicina Interna, Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, A Coruña, España

^h Biosfer Teslab, IISPV, CIBERDEM, Universidad Rovira i Virgili, Tarragona, España

ⁱ Laboratorio Bioquímica, Hospital Universitario Cruces, Vizcaya, España

^j Unidad de Lípidos, Servicio de Medicina Interna, Hospital Clínico Virgen de la Victoria, Universidad de Málaga, Málaga, España

PALABRAS CLAVE

Riesgo
cardiovascular;
Lipoproteínas;
Partículas
lipoproteicas;
Resonancia
magnética nuclear

Resumen La evaluación y prevención del riesgo cardiovascular (RCV) que persiste en los pacientes con dislipidemia a pesar del tratamiento y de haber alcanzado los objetivos específicos de la concentración plasmática de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) es un reto clínico en la actualidad, y sugiere que los biomarcadores lipídicos convencionales resultan insuficientes para una evaluación precisa del RCV. Más allá de su contenido lipídico, existen otras características propias de las partículas lipoproteicas que determinan su potencial aterogénico y su influencia en el RCV. Sin embargo, dichas características adicionales no pueden ser analizadas por las técnicas utilizadas habitualmente en los laboratorios clínicos. La espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica que permite un análisis detallado de la cantidad, composición y tamaño de las lipoproteínas y proporciona información más detallada del estado del metabolismo lipídico y del RCV en los pacientes dislipémicos. En este artículo un grupo de lipidólogos de la Sociedad Española de Arteriosclerosis revisa la

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: xpinto@bellvitgehospital.cat (X. Pintó), luis.masana@urv.cat (L. Masana).

evidencia existente sobre los mecanismos aterogénicos de las partículas lipoproteicas y describen el fundamento técnico y la interpretación de los perfiles lipoproteicos obtenidos mediante RMN, haciendo especial referencia al test disponible en España (Liposcale®). Asimismo, se definen los principales perfiles de pacientes en los que dicho análisis aportaría una información de mayor interés clínico, los cuales son: *a)* sospecha de discordancia entre las concentraciones de lípidos y el número de partículas, situación frecuente en la diabetes, la obesidad, el síndrome metabólico y la hipertrigliceridemia; *b)* enfermedad cardiovascular aterotrombótica (ECVA) precoz o recurrente sin factores de RCV que la justifiquen; *c)* trastornos lipídicos infrecuentes o complejos como las concentraciones extremas de c-HDL, y *d)* situaciones clínicas en las que las técnicas analíticas clásicas no pueden aplicarse, como los valores de c-LDL muy bajos.

© 2020 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Arteriosclerosis. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Cardiovascular risk;
Lipoproteins;
Lipoprotein particles

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®)

Abstract The assessment and prevention of cardiovascular risk (CVR) that persists in patients with dyslipidaemia despite treatment and achievement of goals specific to the plasma concentration of cholesterol linked to low density (c-LDL) is a clinical challenge today, and suggests that conventional lipid biomarkers are insufficient for an accurate assessment of CVR.

Apart from their lipid content, there are other lipid particle characteristics. The results of this study show that there are a number of lipoprotein compounds that determine atherogenic potential and its influence on the CVR. However, such additional characteristics cannot be analysed by the techniques commonly used in clinical laboratories. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is a technique that allows a detailed analysis to be made of the amount, composition, and size of lipoproteins, as well as providing more information about the detailed status of lipid metabolism and CVR in dyslipidaemia patients.

In this article a group of lipidologists from the Spanish Society of Arteriosclerosis review the existing evidence on the atherogenic mechanisms of particles and describe the technical basis and interpretation of the profiles lipoproteins obtained by MRI, with special reference to the test available in Spain (Liposcale®). Likewise, the main patient profiles are defined as such that an analysis would provide information of greater clinical interest. These include: *a)* Suspected mismatch between lipid concentrations and particles, a common situation in diabetes, obesity, metabolic syndrome; *b)* Early atherothrombotic cardiovascular disease (ECVA) or recurrent without CVR factors to justify it; *c)* Lipid disorders, rare or complex, such as extreme concentrations of c-HDL, and *d)* Clinical situations where classical analytical techniques cannot be applied, such as very low c-LDL values.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Arteriosclerosis. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La enfermedad cardiovascular (ECV) es la principal causa de mortalidad en Europa, donde es responsable de más de 4 millones de muertes anuales. Constituye, asimismo, una importante causa de morbilidad para la población y una enorme carga asistencial y económica para los sistemas sanitarios¹. La prevención, tanto primaria como secundaria, a partir de la evaluación del riesgo cardiovascular (RCV) sigue siendo una estrategia fundamental para reducir el impacto y las consecuencias de la ECV de origen aterotrombótico (ECVA)^{2,3}.

La dislipidemia, una alteración cuantitativa o cualitativa de las lipoproteínas plasmáticas, y entre ellas el aumento de la concentración de colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), es primordial en la evaluación del riesgo de enfermedad aterosclerótica y constituye un factor modificable y fundamental de las estrategias de prevención en las últimas décadas^{2,3}. Sin embargo, a pesar de los avances logrados, se observan episodios de ECVA en pacientes que no se clasifican de riesgo alto con las escalas de evaluación actuales e incluso en sujetos cuya concentración plasmática de c-LDL se encuentra dentro de los objetivos marcados por las guías. Dichos episodios conforman el denominado riesgo residual, es decir, el que persiste

a pesar de la consecución de los objetivos de concentración de c-LDL y de los factores de RCV convencionales^{4,5}. Ello sugiere que concurren otras alteraciones lipídicas y de otra índole que influyen en el RCV. En este sentido, y con referencia al metabolismo lipídico, se ha demostrado que la dislipidemia aterogénica (DA), definida como el desequilibrio entre lipoproteínas aterogénicas que contienen apoB ricas en triglicéridos y lipoproteínas antiaterogénicas que contienen apoA1, el incremento del colesterol remanente y las alteraciones cualitativas de las partículas LDL se relacionan con el riesgo residual⁵⁻⁷. Estas alteraciones pueden incrementar el riesgo de eventos CV hasta un 71%, incluso en pacientes tratados con fármacos y concentración plasmática de c-LDL en el objetivo⁸.

Por tanto, existen otras magnitudes relacionadas con el metabolismo lipídico involucradas en la aterogénesis y que van más allá de la concentración plasmática de colesterol, tanto del total como del c-LDL y del colesterol asociado al conjunto de lipoproteínas aterogénicas (colesterol-no HDL [c-no HDL]). Así, las características de las propias partículas lipoproteicas definen su potencial aterogénico⁹. Además, en el plano asistencial, es frecuente encontrar pacientes en quienes los biomarcadores lipídicos convencionales son insuficientes o que presentan limitaciones para su determinación, pudiendo ser infraestimado su RCV¹⁰.

Conocer el número, el tamaño y la composición de las lipoproteínas completa la información sobre el metabolismo lipídico y permite una evaluación más completa de la situación clínica de los pacientes. El estudio de las partículas lipoproteicas mediante resonancia magnética nuclear (RMN) permite esta evaluación metabólica. En esta revisión se ha considerado el análisis avanzado de lipoproteínas mediante el Liposcale®, desarrollado en España, que acerca esta técnica a la práctica clínica. Se basa en el análisis de una muestra de suero o de plasma mediante RMN bidimensional de difusión que permite ir un paso más allá en el estudio de lipoproteínas por RMN, ya que en un mismo análisis se puede obtener la concentración y composición lipídica de las lipoproteínas por un lado y el tamaño de las partículas por otro. La RMN bidimensional de difusión se basa en el estudio de la movilidad de las partículas dentro de un fluido (suero o plasma) que está asociada al tamaño de las mismas, lo que permite considerarla como una nueva generación en el contexto de esta metodología. Dicha técnica permite medir directamente la cantidad, el tamaño y la composición de las fracciones y subfracciones lipoproteicas¹¹.

El objetivo de este artículo es establecer una serie de recomendaciones para su uso en la práctica clínica a partir de la revisión de la evidencia científica actual sobre el uso del análisis avanzado de lipoproteínas Liposcale®.

Partículas lipoproteicas, más allá de la concentración de colesterol

Interacción con la pared arterial y mecanismos aterogénicos

Las lipoproteínas son partículas esféricas cuyo núcleo se compone principalmente de lípidos no polares (ésteres de colesterol y triacilglicerol) y cuya superficie está formada por una monocapa de lípidos polares (fosfolípidos y

colesterol libre) y proteínas (apoproteínas). Son las encargadas de transportar el colesterol y los triglicéridos hasta los tejidos¹². La diferente proporción entre lípidos y proteínas de las lipoproteínas condiciona su distinta densidad y permite clasificarlas en quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Existe una relación inversa entre densidad y tamaño de las partículas lipoproteicas. Así las primeras son las de mayor tamaño y menor densidad y las últimas las de menor tamaño y mayor densidad¹². A su vez, las diferentes clases de lipoproteínas pueden dividirse en subclases, ya que ni el tamaño ni la densidad de las lipoproteínas son realmente valores discretos (fig. 1).

Estas diferencias en el número, tamaño y composición de las lipoproteínas son relevantes en el proceso ateroscлерótico e influyen en su aterogenicidad^{9,13} (p. ej., partículas LDL pequeñas y densas en la diabetes mellitus y el síndrome metabólico^{14,15}) y en el RCV asociado^{16,17}.

La aterogénesis es un proceso de progresiva y compleja interacción entre las células y moléculas circulantes, la pared vascular y las modificaciones en las características del flujo sanguíneo que dan lugar a la formación de depósitos lipídicos en la íntima arterial y a la activación de la respuesta inflamatoria. Las lipoproteínas desempeñan un papel principal en este proceso¹⁸.

La pared arterial intacta puede ser atravesada libremente por las partículas LDL y otras lipoproteínas asociadas con la apoB (IDL, VLDL) cuyo diámetro sea inferior a 70 nm, pudiendo interactuar con los proteoglicanos de la pared y siendo susceptibles de quedar retenidos en la matriz extracelular^{9,19}. De acuerdo con el modelo de retención y respuesta, una vez atravesada la barrera endotelial, puede producirse, en sitios susceptibles, una retención selectiva de las LDL, particularmente de las de pequeño tamaño, debido a su capacidad de unión a los proteoglicanos de la matriz extracelular de la íntima, lo que constituye el evento primario del proceso aterogénico y desencadena una serie de modificaciones en las lipoproteínas y de respuestas locales, incluyendo alteraciones del endotelio con aumento de permeabilidad a las partículas LDL, reclutamiento de monocitos que facilitarán la formación de células espumosas y cambios inflamatorios que resultan a su vez en más retención y progresión de la placa de ateroma^{9,20-22}.

La concentración y el tamaño de las partículas circulantes y la permeabilidad de la pared arterial son factores que condicionan el influjo transendotelial de las lipoproteínas, de modo que la elevada concentración de partículas y un diámetro reducido favorecen el paso hacia la íntima, aumentando su potencial aterogénico^{9,20}. Además, el potencial de retención de las LDL está condicionado por la afinidad de estas por los proteoglicanos, en la cual influye la composición lipídica y proteica de las lipoproteínas²².

En cuanto a las lipoproteínas IDL y VLDL ricas en triglicéridos altamente heterogéneas en tamaño, densidad y composición, también existe una relación inversa entre su tamaño y la capacidad de atravesar el endotelio vascular²³. Las VLDL remanentes generadas tras la acción enzimática de la lipoproteína lipasa (LPL) son más pequeñas y enriquecidas en colesterol. Las partículas de menor diámetro pueden penetrar en la pared arterial y ser captadas directamente

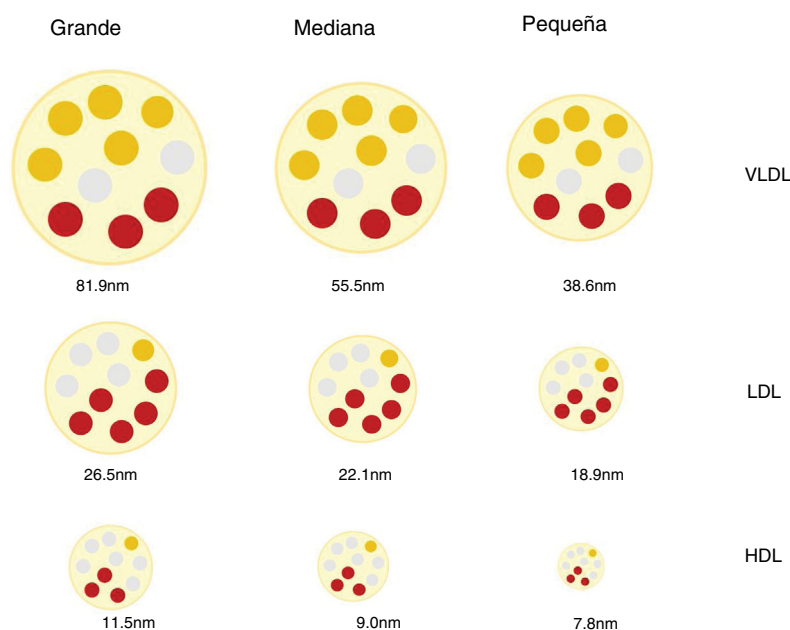


Figura 1 Esquema de las clases y subclases de lipoproteínas.

por los macrófagos, originando células espumosas que quedan atrapadas en la íntima, donde interactúan con otras enzimas y mediadores que contribuyen a la respuesta inflamatoria y a la formación de la placa^{9,24}.

Las HDL no contienen apoB y desempeñan un papel esencial en el transporte del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado, dentro de una heterogénea y compleja función biológica que incluye efectos antiinflamatorios y citoprotectores. La composición de las HDL es un condicionante importante de dichas funciones, y se modifica en situaciones asociadas a inflamación, obesidad o hipertrigliceridemia²⁵. Se ha demostrado que la función de las HDL está alterada en los pacientes con diabetes mellitus, ECVA, enfermedad renal crónica (ERC) o enfermedades autoinmunes y sistémicas, como la sarcoidosis, de modo que la función originalmente protectora de estas lipoproteínas se transformaría hacia un efecto aterogénico como resultado de las modificaciones producidas por la respuesta inflamatoria^{25,26}. Respecto a esto, se ha observado que la correlación inversa existente en individuos sanos entre c-HDL y mortalidad CV es menor en pacientes con enfermedad coronaria estable y desaparece en aquellos con enfermedad inestable²⁵.

Discordancia entre la concentración plasmática de c-LDL y la concentración de partículas LDL

El tamaño de las lipoproteínas LDL es variable y depende del contenido lipídico de su núcleo, lo que a su vez condiciona la densidad de la partícula. Aplicando diversas técnicas de análisis se han identificado diferentes partículas de LDL que se han clasificado de forma arbitraria y práctica en pequeñas, medianas y grandes, y cuya densidad es inversamente proporcional a su tamaño²⁷.

En la cantidad de colesterol de las LDL y en la génesis de las lipoproteínas LDL pequeñas y densas (sdLDL), que

contienen menos colesterol esterificado y no esterificado que las LDL grandes, intervienen diferentes mecanismos, entre los que se incluyen la acción de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) y la lipoproteína lipasa (LPL). En situaciones de alteración metabólica, como el exceso producción de partículas VLDL grandes, las LDL resultantes quedan relativamente deplecionadas de colesterol y enriquecidas en triglicéridos (TG). Posteriormente, estos últimos disminuyen por la acción de la lipasa hepática (LH), lo que reduce el tamaño de las LDL, dando como resultado un aumento de partículas sdLDL^{27,28}. Este mismo mecanismo afecta a las HDL²⁹, lo que explica, en parte, la relación observada entre hipertrigliceridemia, sdLDL y el déficit de c-HDL²⁷. Cabe mencionar que estos mecanismos favorecedores de la producción de sdLDL tienen lugar sobre todo en situaciones metabólicas asociadas a la resistencia a la insulina como las que existen en la DA, la obesidad abdominal, el síndrome metabólico, la enfermedad renal y en los procesos inflamatorios crónicos³⁰.

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 (p-LDL), especialmente en las condiciones antes mencionadas. Así, una cantidad elevada de p-LDL puede asociarse a unas concentraciones de c-LDL normales, lo que significaría que existe un exceso de partículas de pequeño tamaño, cuyo contenido en colesterol es bajo, pero cuyo potencial aterogénico es elevado. Al contrario, una concentración elevada de c-LDL puede coexistir con una cantidad normal de partículas, lo que significaría que estas son predominantemente ricas en colesterol y de mayor tamaño, con menor aterogenicidad relativa³⁰. Estas situaciones sirven de base al concepto de discordancia c-LDL:p-LDL, cuya definición varía dependiendo de los valores de corte elegidos, de la mediana poblacional para cada parámetro o de los valores absolutos de cada uno establecidos como umbral de normalidad³⁰. Diversos estudios han demostrado que las p-LDL muestran

mejor asociación con el riesgo de progresión de aterosclerosis y de episodios de ECVA que el c-LDL y, de hecho, en pacientes que presentan discordancia, el número de p-LDL es mejor indicador del RCV^{16,31,32}. A la inversa, una cantidad baja de p-LDL también ha demostrado ser un indicador más sensible de menor RCV que el c-LDL o el c-no HDL³³.

La consecuencia más importante que se deriva de la discordancia entre la concentración de c-LDL y la cantidad de p-LDL es que puede implicar infra- o sobreestimaciones del RCV de un paciente^{16,30,31}. Dado que toda la estrategia terapéutica de las dislipidemias tiene como objetivo la prevención de la ECVA y el tratamiento de cada paciente se basa en su nivel de RCV, una valoración imprecisa o insuficiente del grado de RCV debido a esta discordancia es de gran importancia práctica. De hecho, se conoce que en la monitorización del tratamiento con estatinas el objetivo del c-LDL resulta a menudo insuficiente a los efectos del control del RCV, habiéndose demostrado que la monitorización terapéutica basada en el número de partículas de LDL permite una mejor valoración del riesgo residual¹⁰.

Importancia pronóstica del número, el tamaño y la composición de las lipoproteínas en las enfermedades cardiovasculares

Como se ha expuesto previamente y de acuerdo con los factores que influyen y condicionan la aterogénesis, el potencial aterogénico de las lipoproteínas ricas en colesterol varía, siendo mayor en las LDL pequeñas y densas. Además, las lipoproteínas ricas en triglicéridos y sus partículas residuales derivadas, también se consideran aterogénicas, dado que pueden atravesar el endotelio y alcanzar la pared arterial^{20,23}. El valor pronóstico del tamaño, número y composición de las lipoproteínas se ha evaluado en múltiples estudios clínicos^{17,31,33,34}.

Un estudio realizado en la cohorte de Framingham mostró que la baja concentración de p-LDL (por debajo del percentil 25) era un indicador más sensible de menor riesgo de ECVA que una concentración equivalente de c-LDL y de c-no-HDL³³. También se ha observado que las concentraciones plasmáticas de colesterol transportado por sdLDL tienen una fuerte correlación con un perfil lipídico aterogénico y se asocian significativamente con la enfermedad coronaria incidente, incluso en individuos con bajo RCV según su concentración de c-LDL³⁴. Resultados similares se obtuvieron en otro amplio estudio realizado por el grupo de Samia Mora, en el que se observó que un número elevado de p-LDL era un mejor predictor de enfermedad coronaria entre mujeres con baja concentración plasmática de c-LDL respecto a la concentración de c-LDL³¹. Asimismo, en mujeres con una concentración elevada de c-LDL, la presencia de una baja concentración de p-LDL fue un mejor predictor de RCV³¹. Incluso el tratamiento basado en la concentración de p-LDL ha mostrado mejores resultados en cuanto a incidencia de ECVA que el basado en las concentraciones de c-LDL¹⁷.

Estudios recientes han corroborado que las partículas LDL de menor tamaño son un factor independiente de RCV³⁵ y que el tamaño de las partículas dentro del espectro VLDL-LDL también se relaciona con el riesgo residual en los pacientes tratados con estatinas³⁶. La proporción de las subfracciones de partículas LDL de mayor y menor tamaño

también se relaciona con el RCV, de modo que una menor proporción de subfracciones grandes y mayor de subfracciones pequeñas se ha asociado con un incremento del RCV. Incluso el cambio de patrón de composición, con aumento de la cantidad relativa de partículas pequeñas y disminución de la de partículas grandes, se asocia con un aumento del RCV³⁷. En resumen, la cantidad y el tamaño de las partículas han demostrado una relación más robusta con la enfermedad vascular que los biomarcadores lipídicos tradicionales (c-LDL, c-HDL, TG)³⁸.

Por otra parte, el colesterol asociado a partículas remanentes de quilomicrones y VLDL, que se define como el colesterol transportado por las partículas lipoproteicas que no son HDL ni LDL, ha sido identificado como un factor predictor de enfermedad coronaria independiente de la concentración de c-HDL y c-LDL^{39,40}, con un incremento del riesgo de 2,8 veces por cada 39 mg/dl de aumento³⁹, y como factor predictor de mortalidad por cualquier causa⁴¹. A la inversa, la baja concentración de colesterol remanente se asocia con una disminución del riesgo de enfermedad isquémica⁴². Sin embargo, y a pesar de su importancia pronóstica, la concentración de colesterol remanente no puede obtenerse de forma fiable con las técnicas de laboratorio de determinación más habituales, lo que sí permiten las técnicas de RMN²⁴.

A la luz de lo anterior y dado que la aterogenicidad del colesterol y de los TG depende de las lipoproteínas en las que están contenidos, la determinación del número, el tamaño y la composición de estas partículas puede proporcionar información de alto valor para una evaluación más precisa del RCV en la práctica clínica.

Métodos disponibles en la práctica clínica actual para el estudio del perfil lipídico y de las lipoproteínas plasmáticas

A) Perfil lipídico estándar

El perfil lipídico estándar se realiza mediante análisis bioquímico a partir de una muestra de suero midiéndose la concentración de colesterol, triglicéridos, y colesterol de las lipoproteínas -HDL.

La concentración de c-LDL se estima en la práctica habitual de forma indirecta, mediante la fórmula de Friedewald ($c\text{-LDL} = CT - c\text{-HDL} - TG/5$ [o $TG/2,21$ en SI])⁴³. Este método no está exento de limitaciones derivadas de los propios principios de los que parte, ya que el resultado de la fórmula también incluye el colesterol de las IDL y de la lipoproteína (a) [Lp(a)]. La fórmula asume que existe una proporción de colesterol vs. TG constante en las partículas VLDL y desprecia tanto los quilomicrones como un posible exceso de partículas remanentes. En la práctica, ello significa que la fórmula infraestima el c-LDL conforme los TG aumentan, de modo que a partir de una concentración de TG de 200 mg/dl el resultado de la concentración de c-LDL calculado comienza a infraestimarse. Según las publicaciones más relevantes, la fórmula no debe aplicarse cuando la concentración de triglicéridos es superior a 400 mg/dl, en los que se ha comprobado que existe un error total superior al permisible tras compararlo con el método de referencia. Además, en pacientes con concentraciones plasmáticas de c-LDL inferiores a 70 mg/dl podría obtenerse un valor

calculado de c-LDL inferior a cero^{44,45}. Sin embargo, la mayoría de estudios y los valores de referencia en diversas poblaciones se han realizado con esta fórmula, aplicándola cuando es posible teniendo en cuenta sus limitaciones.

También existen métodos que miden directamente el c-LDL en la muestra de suero sin separación previa, aunque tienen algunas limitaciones, entre las que se encuentra la concentración elevada de triglicéridos y la discrepancia entre los resultados obtenidos con reactivos de diferentes fabricantes.

Una alternativa al c-LDL calculado es obtener el colesterol perteneciente a las lipoproteínas excluyendo el colesterol de las HDL, comúnmente denominado colesterol no-HDL. Se calcula restando de la concentración de colesterol la del colesterol obtenido de las HDL. Es un cálculo que refleja la concentración de colesterol transportado por todas las partículas aterogénicas^{24,44}. Su valor como factor predictor de RCV ha sido establecido en diferentes estudios^{36,46-48} y se considera un indicador de riesgo residual dado que incluye el colesterol de las partículas remanentes^{24,44}. El c-no HDL ha sido incluido como objetivo terapéutico en múltiples guías clínicas^{2,3,49,50}, aunque debe tenerse en cuenta que las situaciones de hipertrigliceridemia también pueden afectar a la precisión de los métodos de medición del c-HDL necesario para su cálculo.

Cabe considerar que el perfil lipídico básico aporta información de la concentración de colesterol total y no-HDL, y de las lipoproteínas HDL, LDL y de los triglicéridos totales, pero no de otros aspectos como el número de partículas, su composición o el tamaño de las mismas, que son características relacionadas con su distinto potencial aterogénico.

B) Apo B y apo A1

La medición de la concentración de masa de apoB-100 se considera actualmente una posible alternativa al cálculo del c-no HDL. Su análisis se realiza por métodos inmunoturbidimétricos que no requieren la situación de ayuno y que son trazables a un patrón de calibración (OMS/IFCC SP3-07)⁴⁴. Por cada lipoproteína VLDL inicialmente secretada por el hígado solo hay una molécula de apoB, que además permanece en la lipoproteína a lo largo de toda su vida metabólica, de modo que la concentración de apoB se considera una medida directa del número total de partículas lipoproteicas aterogénicas. Las últimas guías sobre el manejo de la dislipidemia publicadas por las Sociedades Europeas de Cardiología y de Aterosclerosis³ establecen que este marcador es importante para evaluar el metabolismo lipídico. En situación de normotrigliceridemia, la concentración de masa de apoB se corresponde en su mayoría con la contenida en las LDL, debido a su mayor vida media (días) comparada con las VLDL (horas)²⁴. Su valor como factor predictor de RCV ha sido demostrado y es superior al del c-LDL⁴⁴. Una de las limitaciones de la medición de apoB es el haber no constituido un objetivo terapéutico en los ensayos clínicos⁴⁴. Sin embargo, varias guías de práctica clínica recomiendan su determinación y establecen objetivos terapéuticos secundarios a los del c-LDL. Hay que tener en cuenta que si bien se asocia al número de partículas aterogénicas, no aporta información sobre el tipo de partícula, su tamaño, ni sobre la distribución de las lipoproteínas en las que se encuentra^{24,51}. En otras

palabras, una molécula de apoB señala tanto la presencia de una VLDL grande como de una sdLDL.

La concentración de masa de apoA1 también se analiza por inmunoturbidimetría y los métodos actuales poseen calibradores trazables a estándares internacionales OMS/IFCC SP1-01 sin necesidad de obtener la muestra en ayunas. El índice ApoB:ApoA1 puede usarse para la valoración de la DA y el RCV^{6,44}. Algunos estudios han demostrado que el aumento de apoA1, pero no el de c-HDL, se asocia a una reducción del RCV en pacientes tratados con estatinas⁵². A diferencia de lo que sucede con la apoB, cada partícula de HDL puede contener de 1 a 5 moléculas de apoA1, por lo que su medición no puede considerarse equivalente a la cantidad de lipoproteínas HDL. Además, la medición de apoA1 tampoco refleja la funcionalidad de las lipoproteínas HDL.

C) Estudio de las partículas lipoproteicas

Existen diversas técnicas analíticas que permiten la separación y caracterización de las partículas lipoproteicas.

La ultracentrifugación con gradiente de densidad es la técnica de referencia para la separación y cuantificación de las lipoproteínas plasmáticas. Esencialmente, se crea un gradiente discontinuo de densidad durante la centrifugación que permite que las lipoproteínas se vayan separando y acumulando en capas de acuerdo a sus densidades, pudiendo determinarse la concentración de los distintos lípidos de cada una de ellas. Sin embargo, su principal limitación es que es muy laboriosa y consume mucho tiempo de análisis, 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^{53,54}.

Diversas técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida de alta resolución en gel (GP-HPLC) permiten la separación de las lipoproteínas basándose en el diámetro de las partículas, ya que las de pequeño tamaño presentan tiempos de elución más prolongados que las grandes. Con esta técnica se pueden fraccionar las lipoproteínas según su tamaño, pero requiere combinación con métodos enzimáticos para la cuantificación de los lípidos, son técnicas laboriosas y dependientes del operador⁵⁵.

Los métodos electroforéticos permiten la separación y análisis de las lipoproteínas basándose en su tamaño. Permiten una aproximación al tamaño de las partículas LDL, HDL, VLDL y sus subclases, pero requiere la preparación *ad hoc* de los geles y existe una falta de intercambiabilidad de resultados entre laboratorios al no existir patrones internacionales^{54,56}, lo que supone un claro inconveniente para su uso clínico.

El análisis de la movilidad iónica (*ion mobility*) se basa en el principio de que las lipoproteínas se comportan de forma diferente según el tamaño cuando son transportadas por un flujo laminar de aire sometido a un campo eléctrico. Estas diferencias de movilidad electroforética de las partículas lipoproteicas en fase gaseosa permiten determinar su tamaño y cuantificación por subfracciones^{57,58}. Esta técnica requiere de un pretratamiento de la muestra complejo que introduce una elevada variabilidad de resultados entre laboratorios, además de requerir una importante infraestructura técnica, haciéndola poco apta para su uso clínico.

En cualquier caso, y aparte de las limitaciones intrínsecas de cada técnica, respecto a los biomarcadores medidos y

Los estudios de validación de Liposcale® han demostrado superioridad frente a Lipoprofile® en cuanto a la correlación entre el número de partículas lipoproteicas y la concentración de apoproteínas en las subfracciones aisladas por ultracentrifugación. Asimismo, se ha demostrado su excelente correlación con datos sobre el tamaño de partículas circulantes determinados por microscopía electrónica¹¹.

Figura 2 Ejemplo del informe obtenido con Liposcale®.

Valores lipoproteicos y silueta lipídica

El análisis de Liposcale® produce más de 25 variables relacionadas con las partículas lipoproteicas:

- concentración de partículas de las lipoproteínas VLDL, LDL y HDL y de sus respectivas subclases (grandes, medianas y pequeñas);
- tamaño (diámetro) medio de las lipoproteínas VLDL, LDL y HDL;
- concentración de colesterol y triglicéridos de las clases principales de lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL y HDL).

El amplio número de datos, si bien subraya el enorme potencial de la técnica, dificulta su uso clínico, que requiere simplicidad interpretativa, por ello se ha diseñado una representación gráfica de los principales resultados que de

forma sencilla informa sobre la situación del perfil lipoproteico del paciente con respecto al perfil de referencia que mostramos en la [figura 2](#). La silueta naranja representa la situación del paciente con respecto a los valores de una población general de 6.000 individuos (círculo negro). La silueta del individuo delimita un área menor cuando las variables presentan valores asociados a mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (valores por encima del percentil 70 en VLDL-C, VLDL-TG, VLDL-P, LDL-C, LDL-TG, S-LDL-P, HDL-TG o por debajo del percentil 30 en LDL-Ø, HDL-Ø, HDL-C y M-HDL-P); y un área mayor en caso contrario. En caso de que las variables contribuyan a disminuir claramente el área de la región delimitada por la curva, aparecen en rojo; en caso contrario aparecen en verde. Si el valor resulta similar al percentil 70 o 30, según la clasificación de las variables mencionadas anteriormente, se representa en amarillo.

Tabla 1 Pacientes en los que el test avanzado de lipoproteínas (Liposcale®) puede ser de mayor utilidad clínica

Situaciones en las que Liposcale® aporta un mayor valor añadido	Indicaciones específicas	Comentario
Estudio de dislipidemia en situaciones con una base patogénica asociada a insulinoresistencia: diabetes, obesidad abdominal, síndrome metabólico	• Pacientes con riesgo cardiovascular alto o muy alto en los que existe una discrepancia entre las concentraciones de c-no HDL o apo B y las de c-LDL • Pacientes con hiperlipemias mixtas con valores intermedios de c-LDL o c-no HDL (< 190 mg/dl o < 220 mg/dl respectivamente), pero con apo B elevada > 150 mg/dl	Estos pacientes suelen presentar incremento de partículas ricas en triglicéridos y dislipidemia aterógena, lo que determina una discordancia entre los valores lipídicos y el número y tamaño de las partículas lipoproteicas La discordancia entre los parámetros lipídicos clásicos puede ser caracterizada mediante el estudio con RMN
Estudio de pacientes con enfermedad cardiovascular ateromatosa a pesar de no tener factores de riesgo clínicamente significativos	• Pacientes con eventos precoces o ECV recurrente a pesar de no presentar una hipercolesterolemia manifiesta (c-LDL < 100 mg/dl)	En estos pacientes en los que no se detectan grandes alteraciones de los factores de riesgo tradicionales se pueden observar alteraciones en el número o composición de las lipoproteínas
Trastornos lipídicos menos frecuentes:	• Pacientes en prevención secundaria con c-HDL elevado • Hiperlipemias mixtas primarias severas con c-no HDL > 300 mg/dl • Sospecha de hiperlipoproteínemia tipo III • c-HDL < 30 mg/dl de causa primaria en ausencia de hipertrigliceridemia grave • Otras: la sitosterolemia, la glicerolemia y el déficit de lipasa ácida lisosomal	Las dislipidemias minoritarias presentan patrones de distribución lipídica específicos que pueden ser identificados por RMN y ello nos puede permitir orientar su diagnóstico
Estudio de situaciones clínicas en las que las técnicas analíticas clásicas no pueden aplicarse de una forma fiable	• Concentraciones de c-LDL muy bajas (< 30 mg/dl) en pacientes que siguen tratamientos hipolipemiantes intensivos, inh PCSK9, etc.) • Hipertrigliceridemias graves	Las concentraciones de c-LDL no pueden determinarse mediante la fórmula de Friedewald cuando sus concentraciones son muy bajas o en las hipertrigliceridemias La RMN permite una estimación exacta de las partículas lipoproteicas y su contenido lipídico, así como de la presencia de quilomicrones en plasma

El test Liposcale® caracteriza los perfiles de lipoproteínas plasmáticas y detecta las alteraciones que predisponen a la ECVA, lo que permite una actuación clínica preventiva^{37,60-62} más allá de los valores del colesterol aterogénico (c-LDL o c-no HDL) o de los triglicéridos totales.

Indicaciones del estudio del perfil lipoproteico completo con RMN

Es un hecho notorio que la ECVA sigue apareciendo en pacientes que mantienen unas concentraciones de c-LDL dentro de los objetivos. Ello es debido a que existe el denominado riesgo residual⁵, en el que la DA tiene un papel principal⁵⁻⁷.

La DA es frecuente en los pacientes con diabetes mellitus, obesidad, síndrome metabólico, enfermedad renal crónica, hiperlipemia familiar combinada y síndrome del ovario poliquístico, entre otras patologías, todas ellas asociadas a un mayor RCV⁶. En estos pacientes, la medición de las concentraciones de c-LDL se considera insuficiente para evaluar el RCV relacionado con las alteraciones del metabolismo lipídico y, por ello, se recomienda la determinación de biomarcadores adicionales, como el c-no HDL o la apo B^{6,44}. Sin embargo, como ya se ha comentado, las concentraciones de c-no HDL se ven directamente influidas por la concentración de TG hasta el punto de que la correlación entre el c-LDL y el c-no HDL disminuye conforme aumentan los TG⁶³, con lo que no nos informa del tipo de lipoproteínas presentes. La apoB es un biomarcador que de forma directa da información sobre el número de partículas lipoproteicas, sin embargo, no distingue el tipo de partículas aterógenas ni sus tamaños.

Si bien Liposcale® ofrece una información de utilidad clínica, sobre el número, composición y tamaño de las partículas lipoproteicas, su coste, que es superior al de los parámetros estándar, obliga a definir los grupos de pacientes en los que tiene una mayor utilidad clínica para contribuir a la toma de decisiones diagnósticas y terapéuticas.

En la [tabla 1](#) se muestran los grupos de pacientes en los que el test avanzado de lipoproteínas (Liposcale®) puede ser de mayor utilidad clínica.

Por último, cabe destacar que el estudio del perfil lipídico mediante RMN puede ser de gran utilidad en las situaciones de riesgo cardiovascular o de dislipidemia mal definidas mediante los estudios clínicos y de laboratorio convencionales. En estas situaciones, los datos aportados por la RMN permiten definir con mayor precisión las alteraciones de la estructura y composición de las lipoproteínas y el RCV asociado.

Conclusiones

La espectrometría de RMN 2D en la que se basa Liposcale® permite un análisis directo del metabolismo lipídico más allá de los parámetros clínicos habituales, ya que permite diferenciar propiedades de las distintas lipoproteínas en sus respectivas subfracciones, y caracterizarlas en cuanto a composición y tamaño, y cuantificar el número de cada una de estas partículas. De esta información más completa y detallada de las alteraciones del metabolismo lipoproteico y del RCV asociado se pueden beneficiar especialmente

ciertos perfiles de pacientes, entre los que se incluyen los que presentan: a) sospecha de discordancia entre las concentraciones de lípidos y el número de partículas, como por ejemplo en casos de diabetes, obesidad, síndrome metabólico e hipertrigliceridemia; b) ECVA precoz o recurrente sin factores de RCV que la justifiquen; c) trastornos lipídicos infrecuentes o complejos, como las concentraciones extremas de c-HDL, y d) situaciones clínicas en las que las técnicas analíticas clásicas no pueden aplicarse, como los valores de c-LDL muy bajos.

Financiación

Agradecemos a Laboratorios Rubió la financiación de la reunión en la que se inició el debate que ha dado origen a este artículo así como la labor de la redactora médica. Laboratorios Rubió no han influido en el contenido del manuscrito y los autores han realizado su labor científica con total independencia.

Conflicto de intereses

XP, LM, FC, JR, DI, JP, JLD y PV: han recibido honorarios por conferencias y/o trabajos de asesoría de diversos laboratorios farmacéuticos involucrados en terapias hipolipemiantes. NA y LM son accionistas de la *spin-off* de la Universidad Rovira i Virgili: BiosferTeslab; CB y EM no presentan ningún conflicto de interés.

Bibliografía

1. Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe-epidemiological update 2015. *Eur Heart J*. 2015;36:2696-705.
2. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, 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;37:2315-81.
3. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020;41:111-8.
4. Ferrari R, Aguiar C, Alegria E, Bonadonna RC, Cosentino F, Elisaf M, et al. Current practice in identifying and treating cardiovascular risk, with a focus on residual risk associated with atherogenic dyslipidaemia. *Eur Heart J Suppl*. 2016;18:C2-12.
5. Fruchart J-C, 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.
6. Grupo de trabajo de Dislipemia Aterogénica de la Sociedad Española de Arteriosclerosis y Grupo Europeo de Expertos. Recomendaciones prácticas para el manejo del riesgo cardiovascular asociado a la dislipemia aterogénica, con especial atención al riesgo residual. Adaptación española de un Consenso Europeo de Expertos. *Clin Investig Arterioscler*. 2017;29:168-77.
7. Fruchart J-C, Sacks F, Hermans MP, Assmann G, Brown WV, Ceska R, et al. The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action

- to reduce residual vascular risk in patients with dyslipidemia. *Am J Cardiol.* 2008;102:1K–34K.
8. Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, Crouse JR, Leiter LA, et al., ACCORD Study Group. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2010;362:1563–74.
 9. Borén J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27:473–83.
 10. 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.
 11. Mallol R, Amigó N, Rodríguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, et al. Liposcale: a novel advanced lipoprotein test based on 2D diffusion-ordered ¹H NMR spectroscopy. *J Lipid Res.* 2015;56:737–46.
 12. Salter AM, Brindley DN. The biochemistry of lipoproteins. *J Inher Metab Dis.* 1988;11 Suppl. 1:4–17.
 13. Morita S. Metabolism and modification of apolipoprotein B-containing lipoproteins involved in dyslipidemia and atherosclerosis. *Biol Pharm Bull.* 2016;39:1–24.
 14. Chan DC, Barrett PHR, Watts GF. The metabolic and pharmacologic bases for treating atherogenic dyslipidaemia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28:369–85.
 15. Soran H, Schofield JD, Adam S, Durrington PN. Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27:313–22.
 16. Otvos JD, Mora S, Shalauova I, Greenland P, Mackey RH, Goff DC. Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and particle number. *J Clin Lipidol.* 2011;5:105–13.
 17. Toth PP, Grabner M, Puneekar RS, Quimbo RA, Cziráky MJ, Jacobson TA. Cardiovascular risk in patients achieving low-density lipoprotein cholesterol and particle targets. *Atherosclerosis.* 2014;235:585–91.
 18. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WG, Linton EF, Song WL, et al. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al. (eds). *Endotext*. MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA), 2000 [consultado 29 Ago 2019]. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343489/>
 19. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation.* 2007;116:1832–44.
 20. Nordestgaard BG, Nielsen LB. Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 1994;5:252–7.
 21. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:551–61.
 22. Sniderman AD, Thanassoulis G, Glavinovic T, Navar AM, Pencina M, Catapano A, et al. Apolipoprotein B particles and cardiovascular disease: a narrative review. *JAMA Cardiol.* 2019;4:1287–95.
 23. Carmena R, Duriez P, Fruchart J-C. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:III2–7.
 24. Langlois MR, Chapman MJ, Cobbaert C, Mora S, Remaley AT, Ros E, et al. Quantifying atherogenic lipoproteins: current and future challenges in the era of personalized medicine and very low concentrations of LDL cholesterol. A Consensus Statement from EAS and EFLM. *Clin Chem.* 2018;64:1006–33.
 25. März W, Kleber ME, Scharnagl H, Speer T, Zewinger S, Ritsch A, et al. HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. *Clin Res Cardiol.* 2017;106:663–75.
 26. Salazar A, Maña J, Fiol C, Hurtado I, Argimon JM, Pujol R, et al. Influence of serum amyloid A on the decrease of high density lipoprotein-cholesterol in active sarcoidosis. *Atherosclerosis.* 2000;152:497–502.
 27. Sacks FM, Campos H. Clinical review 163: Cardiovascular endocrinology: Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: a reappraisal. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4525–32.
 28. Chowanicec Z, Skoczynska A. Plasma lipid transfer proteins: The role of PLTP and CETP in atherogenesis. *Adv Clin Exp Med.* 2018;27:429–36.
 29. Santamarina-Fojo S, González-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1750–4.
 30. Cantey EP, Wilkins JT. Discordance between lipoprotein particle number and cholesterol content: an update. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2018;25:130–6.
 31. Mora S, Buring JE, Ridker PM. Discordance of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol with alternative LDL-related measures and future coronary events. *Circulation.* 2014;129:553–61.
 32. Tehrani DM, Zhao Y, Blaha MJ, Mora S, Mackey RH, Michos ED, et al. 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;117:1921–7.
 33. Cromwell WC, Otvos JD, Keyes MJ, Pencina MJ, Sullivan L, Vasan RS, et al. LDL particle number and risk of future cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study - implications for LDL management. *J Clin Lipidol.* 2007;1:583–92.
 34. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, Dodge RC, Crosby JR, Jiang J, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1069–77.
 35. 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;263:287–92.
 36. Mora S, Caulfield MP, Wohlgemuth J, Chen Z, Superko HR, Rowland CM, et al. Atherogenic lipoprotein subfractions determined by ion mobility and first cardiovascular events after random allocation to high-intensity statin or placebo: The justification for the use of statins in prevention: An intervention trial evaluating rosuvastatin (JUPITER) trial. *Circulation.* 2015;132:2220–9.
 37. Pichler G, Amigo N, Tellez-Plaza M, Pardo-Cea MA, Dominguez-Lucas A, Marrachelli VG, et al. LDL particle size and composition and incident cardiovascular disease in a South-European population: The Ortega-Liposcale Follow-up Study. *Int J Cardiol.* 2018;264:172–8.
 38. Urbina EM, McCoy CE, Gao Z, Khoury PR, Shah AS, Dolan LM, et al. Lipoprotein particle number and size predict vascular structure and function better than traditional lipids in adolescents and young adults. *J Clin Lipidol.* 2017;11:1023–31.
 39. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:427–36.
 40. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, West AS, Grande P, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2013;34:1826–33.
 41. Varbo A, Freiberg JJ, Nordestgaard BG. Extreme nonfasting remnant cholesterol vs extreme LDL cholesterol as contributors to cardiovascular disease and all-cause mortality in 90000 individuals from the general population. *Clin Chem.* 2015;61:533–43.
 42. Wulff AB, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. APOC3 loss-of-function mutations, remnant cholesterol low-density lipoprotein cholesterol, and cardiovascular risk: mediation- and meta-analyses of 137 895 individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:660–8.

43. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499–502.
44. 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.
45. Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clin Chem.* 2002;48:236–54.
46. Ridker PM, Rifai N, Cook NR, Bradwin G, Buring JE. Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B100, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women. *JAMA.* 2005;294:326–33.
47. Boekholdt SM, Arsenault BJ, Mora S, Pedersen TR, LaRosa JC, Nestel PJ, et al. Association of LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, and apolipoprotein B levels with risk of cardiovascular events among patients treated with statins: a meta-analysis. *JAMA.* 2012;307:1302–9.
48. Holmes MV, Millwood IY, Kartsonaki C, Hill MR, Bennett DA, Boxall R, et al. Lipids lipoproteins, and metabolites and risk of myocardial infarction and stroke. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71:620–32.
49. Anderson TJ, Grégoire J, Pearson GJ, Barry AR, Couture P, Dawes M, et al. 2016 Canadian cardiovascular society guidelines for the management of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult. *Can J Cardiol.* 2016;32:1263–82.
50. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology guidelines for management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease - executive summary. *Endocr Pract.* 2017;23:479–97.
51. Cole TG, Contois JH, Csako G, McConnell JP, Remaley AT, et al., AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. 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;59:752–70.
52. Boekholdt SM, Arsenault BJ, Hovingh GK, Mora S, Pedersen TR, Larosa JC, et al. Levels and changes of HDL cholesterol and apolipoprotein A-I in relation to risk of cardiovascular events among statin-treated patients: a meta-analysis. *Circulation.* 2013;128:1504–12.
53. Redgrave TG, Roberts DC, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem.* 1975;65:42–9.
54. Mora S. Advanced lipoprotein testing and subfractionation are not (yet) ready for routine clinical use. *Circulation.* 2009;119:2396–404.
55. Toshima G, Iwama Y, Kimura F, Matsumoto Y, Miura M, Takahashi J, et al. LipoSEARCH: Analytical GP-HPLC method for lipoprotein profiling and its applications. 2013.
56. Warnick GR, McNamara JR, Boggess CN, Clendenen F, Williams PT, Landolt CC. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of lipoprotein subclasses. *Clin Lab Med.* 2006;26:803–46.
57. Caulfield MP, Li S, Lee G, Blanche PJ, Salameh WA, Benner WH, et al. Direct determination of lipoprotein particle sizes and concentrations by ion mobility analysis. *Clin Chem.* 2008;54:1307–16.
58. Caulfield MP, Li S, Lee G, Blanche PA, Salameh WA, Benner WH, et al. In Reply. *Clin Chem.* 2008;54:2088–9.
59. Johnson CS. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog Nucl Mag Res Sp.* 1999;34:203–56.
60. Mackey RH, Greenland P, Goff DC, 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;60:508–16.
61. Würtz P, Raiko JR, Magnussen CG, Soininen P, Kangas AJ, Tynkkynen T, et al. High-throughput quantification of circulating metabolites improves prediction of subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2012;33:2307–16.
62. Mora S, Glynn RJ, Ridker PM. High-density lipoprotein cholesterol, size, particle number, and residual vascular risk after potent statin therapy. *Circulation.* 2013;128:1189–97.
63. Masana L, Ibarretxe D, Heras M, Cabré A, Ferré R, Merino J, et al. Substituting non-HDL cholesterol with LDL as a guide for lipid-lowering therapy increases the number of patients with indication for therapy. *Atherosclerosis.* 2013;226:471–5.