

## REVISIÓN

# Lipoproteínas modificadas como marcadores de riesgo cardiovascular en la diabetes mellitus

José Luis Sánchez-Quesada<sup>a,\*</sup> y Antonio Pérez<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Bioquímica Cardiovascular, Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau, Barcelona, España

<sup>b</sup> Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

<sup>c</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, España

Recibido el 17 de septiembre de 2012; aceptado el 19 de diciembre de 2012

Disponible en Internet el 29 de marzo de 2013

### PALABRAS CLAVE

Diabetes mellitus;  
Arteriosclerosis;  
Lipoproteínas  
modificadas;  
Riesgo  
cardiovascular;  
Biomarcadores

**Resumen** La prevención de la alta incidencia de enfermedad cardiovascular en la diabetes es uno de los retos de la endocrinología. La validación de nuevos biomarcadores que puedan contribuir a una mejor evaluación del riesgo cardiovascular y ayuden a implementar estrategias terapéuticas es una de las aproximaciones prometedoras en la investigación dirigida a la prevención y a la reducción del riesgo cardiovascular. La modificación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es un elemento clave en el desarrollo de la lesión arteriosclerótica. Varias características fisiopatológicas de la diabetes contribuyen decisivamente a que la LDL de estos pacientes tenga unos índices de modificación más elevados que la de la población sana. La dislipidemia diabética, la hiperglicemia y el estrés oxidativo favorecen de manera sinérgica la aparición de procesos de lipoperoxidación, glicosilación y glicoxidación que van a generar lipoproteínas modificadas que estimulan el desarrollo de la arteriosclerosis. Este artículo revisa el papel de los diferentes tipos de LDL modificada en el desarrollo de la arteriosclerosis en la diabetes, así como en la posibilidad de utilizar su cuantificación en la predicción del riesgo cardiovascular.

© 2012 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### KEYWORDS

Diabetes mellitus;  
Atherosclerosis;  
Modified lipoproteins;  
Cardiovascular risk;  
Biomarkers

### Modified lipoproteins as biomarkers of cardiovascular risk in diabetes mellitus

**Abstract** Prevention of high incidence of cardiovascular disease in diabetes is one of the challenges of endocrinology. Validation of new biomarkers that may contribute to a better assessment of cardiovascular risk and help implement treatment strategies is one of the promising approaches in research on prevention and reduction of cardiovascular risk. Modification of low density lipoprotein (LDL) is a key element in development of atherosclerotic lesions. Several pathophysiological characteristics of diabetes are crucial for the LDL of these patients to have higher modification rates as compared to the healthy population. Diabetic dyslipidemia, hyperglycemia, and oxidative stress synergistically promote the occurrence of lipoperoxidation, glycosylation and glycooxidation processes, which will generate modified lipoproteins that

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jsanchezq@santpau.cat](mailto:jsanchezq@santpau.cat) (J.L. Sánchez-Quesada).

stimulate development of atherosclerosis. This article reviews the role of different types of modified LDL in development of atherosclerosis in diabetes, as well as the possibility of using its quantification in cardiovascular risk prediction.

© 2012 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

La enfermedad cardiovascular derivada de procesos arterioscleróticos es la primera causa de muerte en los pacientes con diabetes mellitus. Esta enfermedad presenta una serie de características que contribuyen al aumento del riesgo cardiovascular (RCV) a través de mecanismos independientes. De una manera general, pueden distinguirse 3 fenómenos que tienen un papel relevante en el desarrollo de la arteriosclerosis en los pacientes con diabetes: 1) la dislipemia diabética; 2) la glicosilación no enzimática de proteínas; y 3) el estrés oxidativo<sup>1,2</sup>. Estos procesos son, en principio, independientes, aunque, como se intenta explicar a lo largo de la presente revisión, son fenómenos estrechamente interconectados (fig. 1). La consecuencia de la elevada incidencia de estos procesos en la diabetes es que las lipoproteínas, principalmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL), de estos pacientes son modificadas, perdiendo su funcionalidad y sus características nativas<sup>3</sup>. Estas LDL modificadas son determinantes en el desarrollo acelerado de la arteriosclerosis que sufren los individuos con diabetes. La implicación directa de la LDL modificada en la evolución de la lesión ateromatosa sugiere que su cuantificación en la circulación plasmática podría ser una herramienta muy útil tanto para la predicción del RCV como para la monitorización de tratamientos dirigidos a disminuir este riesgo<sup>4</sup>.

## Dislipidemia diabética

Un fenómeno frecuentemente asociado a la diabetes de tipo 2 es la presencia del síndrome metabólico (SM) definido por obesidad abdominal, insulinoresistencia, hipertensión y existencia de un perfil lipídico anormal<sup>5</sup>. Aunque los 4 factores están asociados al desarrollo precoz de la arteriosclerosis, es probablemente el perfil lipídico anómalo el que se relaciona más directamente con la aterogénesis. Este perfil lipídico, conocido como dislipidemia diabética o aterogénica, se caracteriza por hipertrigliceridemia, colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) disminuido, concentración aumentada de apolipoproteína B (apoB)<sup>6</sup> y aumento de la lipemia posprandial<sup>7,8</sup>.

La apoB es el principal componente proteico de las lipoproteínas aterogénicas, LDL y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Sin embargo, la concentración de colesterol de LDL suele ser normal. Dado que el 80-90% de la apoB está asociada a la LDL, esta observación puede resultar paradójica. Esta peculiaridad se explica por la abundancia de partículas de LDL de pequeño tamaño (small, dense LDL, sdLDL), con menor contenido relativo de colesterol y mayor de apoB, y que se generan debido a una metabolización defectuosa de la VLDL<sup>9</sup>. En consecuencia, aunque en muchas ocasiones la concentración plasmática de colesterol total en los pacientes con diabetes es normal, su perfil

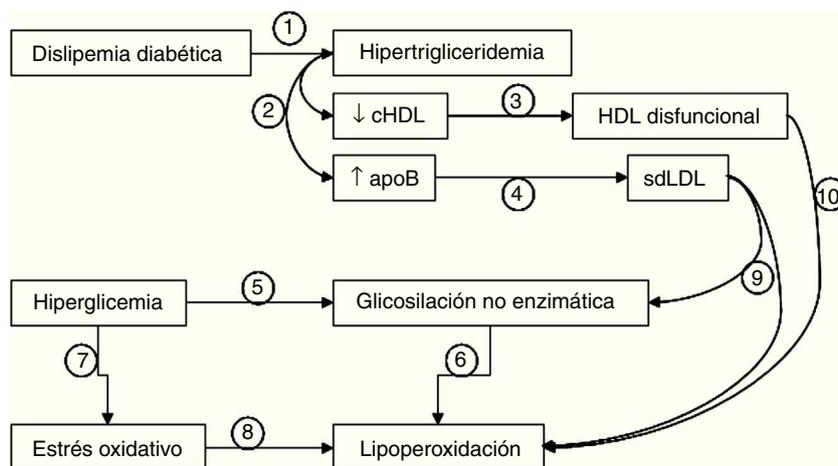
lipídico dista mucho de lo que se puede considerar como un perfil ateroprotector. Esto hace que, a pesar de que el tratamiento farmacológico de las dislipidemias es eficiente desde el punto de vista cuantitativo<sup>10</sup>, la incidencia de eventos cardiovasculares sigue siendo muy elevada en la población diabética.

En esta situación de dislipidemia diabética hay importantes alteraciones cualitativas en la HDL y la LDL. En primer lugar, hay que tener en cuenta el efecto sobre el papel antiaterogénico de la HDL que es determinante en el transporte reverso del colesterol y tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes que protegen a la LDL de la oxidación<sup>11</sup>. La concentración de la HDL no solo está disminuida en los pacientes con diabetes, sino que además es parcialmente disfuncional, con menor capacidad para estimular el transporte reverso del colesterol y menor capacidad antioxidante y antiinflamatoria<sup>12</sup>. De esta manera, la disfuncionalidad de la HDL favorece la formación de la LDL oxidada (oxLDL).

Por otra parte, la sdLDL es más aterogénica que la LDL con un tamaño y una densidad normal debido a una serie de características distintivas. Por un aparte, tiene menor afinidad por el receptor de la LDL, lo que implica una menor tasa de aclaramiento plasmático y un mayor tiempo de permanencia en la circulación. Además, la sdLDL atraviesa la barrera endotelial con mayor facilidad que la LDL nativa ya que este es un proceso dependiente principalmente del tamaño de la partícula de lipoproteína. También se une con mayor afinidad a los proteoglicanos que constituyen la pared arterial, favoreciendo la retención subendotelial de lipoproteínas. Además, la sdLDL tiene mayor susceptibilidad a ser modificada por mecanismos oxidativos y de glicación no enzimática<sup>13</sup>. Esto último relaciona la dislipidemia diabética con los otros 2 procesos implicados en el aumento del RCV anteriormente mencionados, como son la glicosilación no enzimática y el estrés oxidativo.

## Glicosilación no enzimática

El estado continuo de la hiperglicemia tiene como consecuencia que aumentan los procesos de glicosilación no enzimática de las diferentes macromoléculas. Esto afecta de una manera muy relevante la funcionalidad de las proteínas. Este proceso se da cuando la glucosa reacciona con los aminoácidos con grupos amino (principalmente lisina y arginina), formando una base de Schiff y, posteriormente, un compuesto estable denominado producto de Amadori<sup>14</sup>. Son muy numerosas las proteínas que pueden ver afectada su funcionalidad por esta modificación. Aunque lógicamente las proteínas más afectadas por la glicosilación no enzimática son las proteínas estructurales con una vida media larga, las lipoproteínas también pueden ser glicosiladas durante su tiempo de permanencia en la circulación<sup>15</sup>. No obstante, la idea más aceptada es que este proceso estaría potenciado en



**Figura 1** Interacciones entre dislipidemia diabética, hiperglicemia y estrés oxidativo. La dislipidemia diabética se caracteriza por hipertrigliceridemia (1) que tiene como consecuencia una disminución del colesterol de la HDL y un aumento de la concentración de apoB (2). La HDL de estos pacientes no solo está disminuida cuantitativamente, sino que es parcialmente disfuncional (3) y la concentración elevada de apoB es acompañada por la presencia de partículas de LDL pequeñas y densas (sdLDL). Por otra parte, la hiperglicemia favorece la glicosilación no enzimática de proteínas (5), un proceso que estimula la aparición de fenómenos lipoperoxidativos (6). La hiperglicemia también aumenta el estrés oxidativo celular (7), potenciando la lipoperoxidación (8). Al aumento de la glicosilación no enzimática y la lipoperoxidación también contribuyen de manera decisiva el hecho de que las partículas de LDL sean pequeñas y densas (9) (más oxidables y glicosilables) y que la HDL sea parcialmente disfuncional (10) (menor potencial antioxidante).

las LDL retenidas en la pared arterial durante un periodo de tiempo superior. Esta modificación afecta su funcionalidad y un ejemplo de ello es que la LDL glicada pierde afinidad por el receptor de la LDL<sup>16</sup>. La sdLDL, frecuente en pacientes con diabetes, es más susceptible a los procesos de glicosilación no enzimática que la LDL de tamaño normal<sup>17</sup>, lo que confiere una mayor relevancia a esta modificación en los pacientes con dislipidemia diabética. La glicosilación no enzimática, a su vez, induce la formación de radicales libres de oxígeno con la consecuente estimulación de procesos oxidativos, fenómeno que se conoce como glicoxidación<sup>18</sup>. Este proceso genera una reordenación de los enlaces moleculares y da lugar a la formación de productos avanzados de glicación (advanced glycation end-products [AGE])<sup>18</sup>. Este es un grupo heterogéneo de compuestos que altera seriamente y de manera irreversible la función de las proteínas. Todos estos procesos ocurren *in vivo*, lo que ha hecho posible la detección de la LDL glicosilada (gLdL) y la LDL modificada con AGE (AGE-LDL) en la circulación plasmática<sup>19</sup>. La AGE-LDL, tanto generada *in vitro* como aislada de la circulación plasmática, tiene propiedades inflamatorias e induce apoptosis en las células de la pared vascular<sup>20-22</sup>, procesos ambos implicados en el desarrollo de la arteriosclerosis.

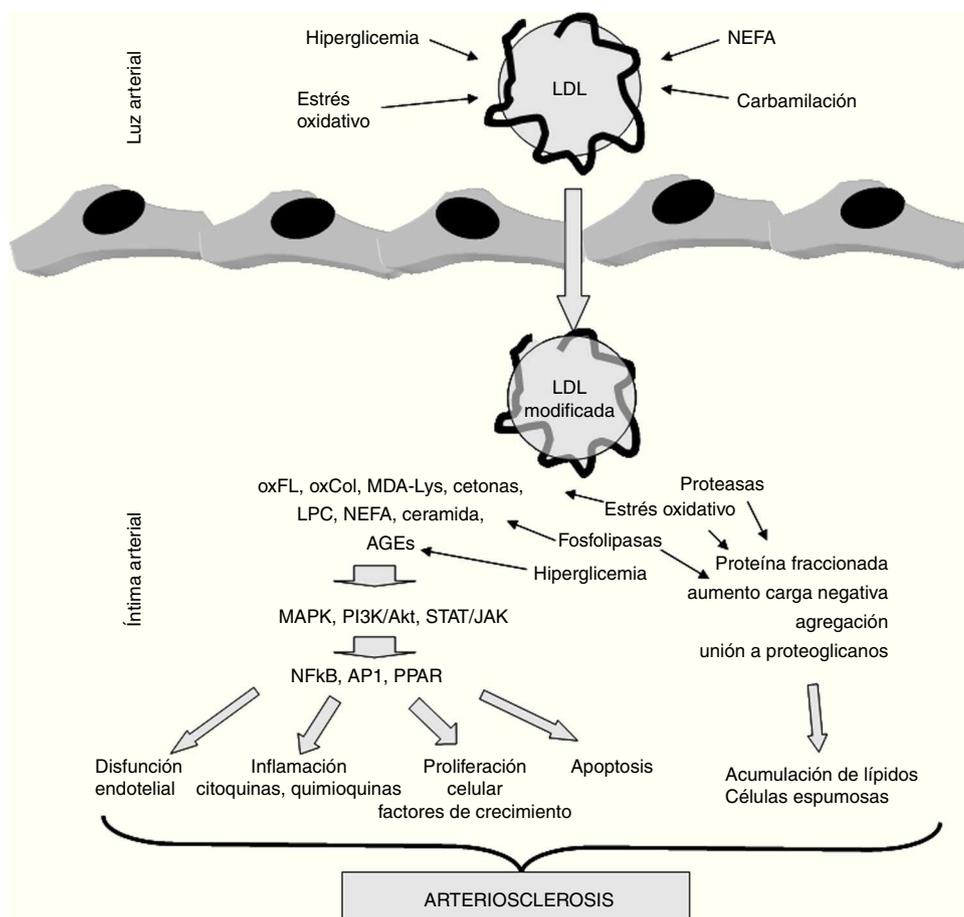
La relativamente corta vida media de la LDL en circulación (2,5-3,5 d) siempre ha sido un argumento en contra de que la glicosilación no enzimática afecte «*in vivo*» de manera significativa a la LDL durante la circulación plasmática ya que, en ausencia de agentes reductores, generalmente son necesarios 6-7 d para que la glucosa modifique proteínas de forma significativa<sup>23</sup>. Por ello, se ha asumido implícitamente que la formación de la gLdL y, sobre todo, de la AGE-LDL ocurriría principalmente en la LDL que ha quedado retenida en la pared arterial durante un periodo superior a su tiempo de vida plasmática<sup>23</sup>. De esta manera, se supone que la gLdL y la AGE-LDL detectadas en la circulación plasmática

se habrían formado en zonas lesionadas de la pared arterial y su presencia en la sangre sería un reflejo del desarrollo de lesiones arterioscleróticas.

Otro tipo de modificación relacionado con la hiperglicemia pero que no implica directamente a la glucosa es la modificación mediante metilgloxal (MG) u otros compuestos similares<sup>24</sup>. Diferentes investigadores han estudiado el efecto de metabolitos de la glucosa del tipo dicarbonilo con un elevado poder reductor, de los que el más importante es el MG. Este metabolito es capaz de reaccionar rápidamente con residuos de arginina. Especialmente importantes son los estudios de Thornalley et al. que han demostrado la existencia en la sangre de la LDL modificada con MG (MG-LDL) y han observado que su concentración está aumentada en pacientes con diabetes y disminuye tras el tratamiento con metformina<sup>25</sup>. La LDL modificada mínimamente con MG presenta una serie de características aterogénicas que incluyen un menor tamaño, una mayor susceptibilidad a la agregación y una mayor afinidad para la unión a los proteoglicanos de la pared arterial<sup>26</sup>. La modificación de arginina con MG da lugar a un compuesto heterocíclico (hidroimidazolona) que forma parte de la familia heterogénea de los compuestos AGE, por lo que la MG-LDL es una forma específica del grupo de AGE-LDL. Sin embargo, lo relevante de la MG-LDL, dentro del conjunto de AGE-LDL, es que, dada la elevada reactividad del MG, podría formarse perfectamente durante la circulación plasmática de la LDL.

## Estrés oxidativo

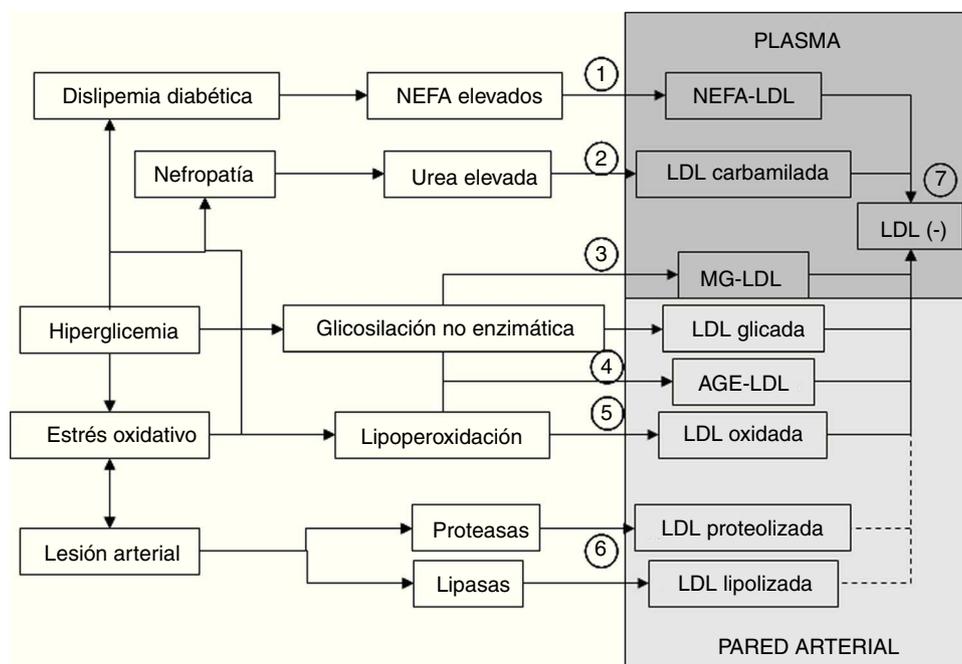
La modificación de las proteínas mediante glicosilación y la posterior formación de AGE no es el único mecanismo mediante el cual el estrés oxidativo interviene en el desarrollo de la arteriosclerosis en los pacientes con diabetes.



**Figura 2** Papel de la modificación de la LDL en el desarrollo de la arteriosclerosis. La LDL puede ser modificada mediante diferentes mecanismos durante su permanencia en la circulación (hiperglicemia, estrés oxidativo, carbamilación, sobrecarga con NEFA) o una vez ha quedado atrapada en la pared arterial (hiperglicemia, estrés oxidativo, lipólisis, proteólisis, agregación). El resultado de estas modificaciones es que se generan compuestos, principalmente lipídicos (fosfolípidos oxidados, colesterol oxidado, cetonas, lisofosfatidilcolina, NEFA, ceramida), aunque también derivados de la apoB (aductos MDA-Lys, AGE) que tienen un potencial inflamatorio, apoptótico y proliferativo. Estos compuestos activan vías de señalización mediadas por kinasas (MAPK, PI3K/Akt, TAT/JAK) que a su vez estimulan la translocación y/o activación de factores de transcripción (NFκB, AP1, PPAR-γ) que producen una disfunción endotelial, estimulan la secreción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento y mediadores de apoptosis. Por otra parte, otras modificaciones fragmentan la apoB, incrementan la carga negativa, favorecen la agregación y aumentan su unión a los proteoglicanos que constituyen la pared arterial. Esto tiene como consecuencia que se estimula la acumulación subendotelial de la LDL y la formación de células espumosas característica de la lesión ateromatosa.

De hecho, un aumento del estrés oxidativo sistémico es una característica de la diabetes<sup>1</sup>. Probablemente, la principal causa es que como consecuencia de la hiperglicemia hay un aumento en la actividad mitocondrial que favorece la producción de especies reactivas del oxígeno (radical oxygen species [ROS])<sup>27</sup>. Esto hace que sea muy frecuente detectar una alteración en los parámetros que cuantifican el estrés oxidativo en el plasma de estos individuos. El estrés oxidativo tiene un papel especialmente importante en el espacio subendotelial de la pared arterial, un microambiente rodeado de células metabólicamente activas (células endoteliales, células musculares lisas, macrófagos) que generan ROS y que carece de las abundantes defensas antioxidantes del plasma sanguíneo. La modificación oxidativa puede afectar a todas las macromoléculas pero las lipoproteínas, y concretamente la LDL, son muy sensibles al ataque oxidativo de las ROS<sup>28</sup>. Estos radicales

oxidan principalmente los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos situados en la superficie de la lipoproteína, un proceso conocido como lipoperoxidación. Tres décadas de investigaciones, iniciadas con las investigaciones pioneras de Steinberg et al. a principios de los años 80, han mostrado que la modificación oxidativa de la LDL es un evento clave en el desarrollo de la arteriosclerosis<sup>28-30</sup>. A diferencia de la LDL nativa, no modificada, que no presenta propiedades potencialmente aterogénicas, la oxLDL tiene la capacidad de promover y/o intervenir en prácticamente todos los eventos que se producen durante la evolución de la lesión arteriosclerótica. Así, la oxLDL es capaz de inducir la acumulación masiva intracelular de ésteres de colesterol por parte de los macrófagos, induciendo la formación de células espumosas, probablemente la característica anatomopatológica más típica de la lesión arteriosclerótica<sup>31</sup>. Esto es debido a la pérdida de afinidad



**Figura 3** Mecanismos de formación de la LDL modificada. La LDL puede ser modificada en el plasma o en la pared arterial por diferentes mecanismos. La concentración plasmática elevada de NEFA característica de la dislipidemia diabética favorece la sobrecarga con NEFA de la LDL (1). En caso de nefropatía e hiperuremia se ve estimulada la carbamilación de la LDL (2). Otro proceso que puede darse en la circulación plasmática es la modificación con metilglioxal (MG) (3). Más difícil es que en el plasma se modifique significativamente la LDL por glicosilación no enzimática, por lo que es más probable que la formación de la LDL glicada y de la AGE-LDL se produzca en la pared arterial (4). De igual manera, aunque la modificación oxidativa se podría producir en el plasma, también es más probable que ocurra más extensamente en la pared arterial (5). La modificación mediada por lipasas y proteasas también ha de ocurrir preferentemente en la pared arterial (6). Una característica común a todas estas modificaciones es un aumento de la carga eléctrica negativa de la partícula de LDL, lo que se ve reflejado en la formación de la LDL electronegativa (LDL(-)), una forma modificada de la LDL que se puede asilar de la circulación plasmática (7). La LDL(-) estaría formada, al menos, por NEFA-LDL, LDL carbamilada, MG-LDL, LDL glicada, AGE-LDL y LDL oxidada y quizás también por la LDL lipolizada y/o proteolizada cuyo origen sería la pared arterial.

por el receptor de la LDL, que viene acompañada por el aumento de afinidad por receptores «basureros» (scavenger receptors [SR]), cuya expresión no está regulada por el contenido intracelular de colesterol. Además, la oxLDL puede inducir a las diferentes células de la pared arterial a expresar citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento. De esta manera, la oxLDL promueve el proceso inflamatorio crónico y la proliferación celular característicos de la arteriosclerosis<sup>30,32,33</sup>. También es citotóxica y apoptótica, promoviendo la formación del núcleo necrótico que presentan las lesiones ateromatosas avanzadas<sup>34</sup>. La figura 2 muestra los efectos que tiene la modificación, oxidativa o mediante otros mecanismos, sobre la LDL y su implicación en el desarrollo de la arteriosclerosis.

### Otras modificaciones que afectan a la lipoproteína de baja densidad

Numerosas evidencias indican que las LDL pueden ser modificadas por otros mecanismos adicionales a la modificación oxidativa y de los procesos de glicosilación no enzimática. La figura 3 muestra un resumen de los diferentes procesos que pueden generar los distintos tipos de LDL modificada<sup>35</sup>. En las lesiones arterioscleróticas hay una hiperexpresión

de enzimas lipolíticos como la fosfolipasa A2 (PLA2), la esfingomielinasa (SMasa) o la colesterol esterasa (CEasa) y también de diversas proteasas (metaloproteinasas, catepsinas)<sup>36-41</sup>. En consecuencia, se presume que la LDL retenida en la pared arterial es afectada no solo por procesos lipoperoxidativos y glicosilativos, sino también por proteasas y lipasas. Una prueba indirecta de esto es que las lipoproteínas aisladas de la pared arterial muestran una fragmentación de la apoB (constituye el 98-99% de la proteína de la LDL) y un contenido elevado de diversos productos de la degradación enzimática de los lípidos como la lisofosfatidilcolina, la ceramida y el colesterol no esterificado<sup>31,42,43</sup>. Algunos de estos productos podrían generarse también a partir de procesos oxidativos (fragmentación de apoB, lisofosfatidilcolina) pero otros no se explican por estos fenómenos. Además, el hecho de que los productos de oxidación no estén excesivamente elevados en las lesiones arterioscleróticas ha relativizado la contribución de la modificación oxidativa al desarrollo de la lesión arteriosclerótica<sup>44</sup>. A esto ha contribuido también la falta de resultados positivos en grandes ensayos clínicos utilizando diferentes moléculas antioxidantes<sup>45,46</sup>. Actualmente, la percepción general es que, si bien se sigue aceptando que la lipoperoxidación tiene un papel importante en la aterogénesis, otros mecanismos de modificación de la LDL,

como la modificación enzimática mediante lipasas o proteasas, podrían tener un papel, incluso más preponderante que la oxidación, en la generación de la LDL modificada en la pared arterial<sup>44,47</sup>.

Además de los procesos descritos hasta ahora, que ocurren preferentemente en la pared arterial, la LDL también puede modificarse por otros mecanismos en la circulación sanguínea. Recientemente se ha descrito la presencia de la LDL carbamilada en plasma<sup>48,49</sup>. La carbamilación es una modificación química generada por la reacción con la molécula de cianato que se deriva del tiocianato formado a partir de la urea<sup>48</sup>. Se ha observado que esta forma de modificación es especialmente importante en fumadores ya que el humo de tabaco favorece la formación de tiocianato y en pacientes con uremia crónica por insuficiencia renal severa. Esto abre la posibilidad de que la LDL carbamilada esté aumentada en pacientes con diabetes y enfermedad renal. No obstante, esto no ha sido todavía confirmado experimentalmente.

También se ha descrito la presencia en la circulación de la LDL desializada, es decir, con un contenido disminuido en ácido siálico, uno de los carbohidratos que forman las cadenas de glicosilación enzimática de la apoB. La LDL desializada está aumentada en pacientes con diabetes y tiene la capacidad de inducir la formación de células espumosas, por lo que es potencialmente aterogénica<sup>50</sup>. La desialización se ha atribuido a los procesos de oxidación ya que estos favorecen la pérdida del ácido siálico unido a la apoB. Por ello, la LDL desializada podría ser un reflejo de la presencia de la oxLDL<sup>51</sup>.

Otra modificación de la LDL, que cuantitativamente puede ser muy relevante, es la sobrecarga con ácidos grasos no esterificados (NEFA). Estos compuestos son generalmente transportados en la sangre asociados a la albúmina. Cuando al aumentar la concentración plasmática de NEFA la capacidad de transporte de la albúmina se ve excedida los NEFA se unen a otras macromoléculas, principalmente lipoproteínas<sup>52</sup>. La LDL con un contenido aumentado en NEFA tiene un mayor potencial inflamatorio y ve alterada su estructura favoreciendo su agregación<sup>53-55</sup>. Este fenómeno es importante en la diabetes, donde es frecuente que los niveles plasmáticos de NEFA estén incrementados. En este contexto, se ha descrito que la LDL de pacientes diabéticos tiene un contenido elevado de NEFA<sup>56</sup>. Esto podría explicar las observaciones de otros estudios que han mostrado que la LDL de estos individuos es más inflamatoria que la de sujetos sin diabetes, a pesar de no tener aumentados los índices de lipoperoxidación<sup>57,58</sup>.

Una propiedad común a las diferentes formas de LDL modificada descritas anteriormente es un aumento en la carga eléctrica de la partícula<sup>59</sup>. Aprovechando esta característica, Avogaro et al. fueron los primeros en aislar del plasma una fracción de la LDL modificada con un aumento de la carga negativa que denominaron LDL electronegativa (LDL(-))<sup>60</sup>. La LDL(-) se puede considerar un «pool» que contiene las diferentes formas modificadas de la LDL (fig. 2) que están presentes en la sangre y representa aproximadamente un 5% de la LDL total en individuos sanos. La LDL(-) está 2-4 veces aumentada en diferentes grupos de individuos con un elevado RCV o con arteriosclerosis avanzada, incluyendo pacientes con diabetes de tipo 1 y de tipo 2<sup>59,61,62</sup>. La proporción de LDL(-) es mucho más alta que los

valores que generalmente se describen de oxLDL o AGE-LDL (0,1-1%)<sup>63,64</sup>. En consecuencia, tanto la oxLDL como la AGE-LDL serían formas minoritarias dentro de la LDL(-) y, probablemente, la mayor parte de LDL(-) es LDL con un contenido aumentado en NEFA, con más apolipoproteínas minoritarias (diferentes de la apoB) asociadas y/o con mayor densidad (sdLDL). Por ello, la LDL(-) sería un reflejo de las anomalías metabólicas presentes en las diferentes enfermedades, mientras que la oxLDL o la AGE-LDL estarían relacionadas con la presencia de lesiones arterioscleróticas subyacentes.

## Utilidad de la lipoproteína de baja densidad modificada como biomarcador

Independientemente de la relevancia relativa de cada tipo de modificación en la generación de la LDL modificada y de las propiedades aterogénicas que cada uno de estos mecanismos confiere a la LDL, está ampliamente aceptado que la modificación de la LDL tiene un papel clave en la aterogénesis. Esto hace que muchos investigadores se hayan planteado que la cuantificación de la LDL modificada pueda ser utilizada como un marcador de RCV e incluso que pueda servir para hacer una estimación de la extensión y la evolución de las lesiones arterioscleróticas presentes en pacientes con arteriosclerosis<sup>4,64</sup>. Aunque no puede descartarse de manera absoluta que una parte de la oxLDL y la AGE-LDL se haya formado durante su tiempo de vida en la circulación plasmática, la percepción general es que la oxLDL y la AGE-LDL se han formado en la pared arterial. De esta manera, la existencia en el plasma de estas formas de LDL modificadas podría ser un reflejo de la presencia silente de lesiones arterioscleróticas activas ya que la LDL se oxida y/o glicosida en zonas lesionadas de la pared arterial pero no se encuentra en zonas sanas. Por esta razón, la oxLDL podría ser considerada no solo un biomarcador de la arteriosclerosis, sino también podría indicar la presencia de placas arterioscleróticas inestables y/o fracturadas que liberarían parte de su contenido a la circulación<sup>64-69</sup>.

Para demostrar esta implicación de la LDL modificada y valorar su utilidad como biomarcador ha sido necesario el desarrollo de métodos rápidos, reproducibles y relativamente sencillos que permitan su cuantificación en grandes grupos de pacientes. Desde principios de los años 90 los avances en el desarrollo de inmunoensayos han permitido describir la presencia en la circulación plasmática de diferentes formas modificadas de LDL. Holvoet et al. desarrollaron un inmunoensayo capaz de detectar MDA-LDL, una forma de LDL modificada generada por oxidación, y fueron los primeros en describir una concentración aumentada en pacientes con arteriosclerosis<sup>70</sup>. Desde entonces se han comercializado al menos 3 métodos basados en anticuerpos diferentes (4E6, E06 y DLH3) que reconocen distintos epítomos oxidativos generados en la oxLDL (aducto MDA-Lys, fosforilcolina y fosfatidilcolina oxidada, respectivamente)<sup>4,70-72</sup>. Cohen et al. desarrollaron en 1993 un método de inmunoensayo para cuantificar la LDL glicada<sup>73</sup> que fue comercializado poco después. También se han desarrollado métodos para detectar la

AGE-LDL<sup>74</sup> y, más recientemente, se han implementado inmunoensayos capaces de detectar la LDL carbamylada<sup>49</sup> y la LDL(-). No obstante, estos últimos métodos no han sido comercializados, lo que ha limitado hasta ahora el desarrollo de estudios multicéntricos que puedan validar estos tipos de LDL modificada como marcadores de RCV. Con estas herramientas el objetivo que se han planteado muchos investigadores es determinar si, además de ser un agente causal, la cuantificación de la LDL modificada podía servir como biomarcador de la enfermedad arteriosclerótica que añadiera una información adicional a los factores de riesgo más clásicos. Con mucho, la mayoría de estudios se han realizado cuantificando la oxLDL, aunque los estudios que han evaluado la AGE-LDL y la LDL(-) han ido cobrando relevancia en los últimos años.

### Asociación de la lipoproteína de baja densidad oxidada con el riesgo cardiovascular

Numerosos estudios poblacionales han descrito una concentración aumentada de oxLDL en grupos de pacientes con un elevado RCV, incluyendo la hipercolesterolemia, la hipertrigliceridemia, el síndrome metabólico, la obesidad, la diabetes, la hipertensión o la enfermedad renal severa<sup>4,64,70,75-77</sup>. También se ha descrito una mayor concentración de oxLDL en el plasma de pacientes con arteriosclerosis angiográficamente documentada y esta concentración se ha asociado a la severidad de la enfermedad coronaria<sup>65,78-80</sup>. No obstante, a pesar de que la implicación de la oxLDL en el desarrollo de la arteriosclerosis está ampliamente aceptada, su valor como biomarcador independiente del RCV es moderado<sup>81-83</sup>. Esto puede ser debido a diversas razones. Por una parte, sobre todo en los individuos con dislipidemia, existe una fuerte correlación con los parámetros lipídicos, especialmente con el colesterol total y la LDL<sup>81</sup>. Esto enmascara el papel de la oxLDL como biomarcador y relativiza el valor de su cuantificación. Otro factor que explica la falta de estudios concluyentes es que no existe una estandarización de los diferentes inmunoensayos que utilizan anticuerpos que reconocen distintos epitopos generados durante el proceso oxidativo en la LDL<sup>4,64</sup>. Dado que este proceso es enormemente complejo y genera, de una manera más o menos secuencial, productos que aparecen en unas fases de la oxidación y son degradados en otras, los distintos inmunoensayos podrían detectar diferentes estados oxidativos de la LDL. Está claro que es necesaria una estandarización exhaustiva de estos métodos para poder comparar los resultados obtenidos con los estudios realizados.

Más unanimidad, y probablemente más aplicabilidad, tiene la observación de que la oxLDL, independientemente del método utilizado, aumenta su concentración temporalmente durante la fase aguda del infarto agudo de miocardio o del accidente vascular cerebral y también tras una angiografía transluminal percutánea<sup>84-86</sup>. Estas observaciones apoyan el concepto de que la oxLDL en la circulación proviene de la pared arterial lesionada y sugieren que la cuantificación en la sangre de oxLDL pudiese ser una herramienta muy útil para tener mayor conocimiento de la vulnerabilidad de las lesiones ateromatosas y para la

prevención secundaria de eventos cardiovasculares en pacientes con arteriosclerosis.

### Lipoproteína de baja densidad modificada como biomarcador de riesgo cardiovascular en la diabetes

La mayor parte de los estudios realizados en pacientes con diabetes, tanto de tipo 1 como de tipo 2, han demostrado una concentración aumentada de los diferentes tipos de LDL modificada, incluyendo la oxLDL, la LDL glicada, la AGE-LDL y la LDL(-)<sup>62,73,87-92</sup>. En general, se ha observado que un mal control glicémico se asocia a concentraciones más elevadas de la LDL modificada y que su optimización, mediante diferentes terapias, resulta en la disminución de estas concentraciones<sup>62,93,94</sup>. De forma similar a lo observado en los estudios realizados en la población sin diabetes, el tratamiento con hipolipemiantes también disminuye los niveles de las LDL modificadas en los pacientes con diabetes, existiendo una clara relación con los efectos sobre el perfil lipídico<sup>90,95,96</sup>. Por ello, su valor predictivo como factor independiente de eventos clínicos cardiovasculares no está totalmente claro. Especialmente en la diabetes de tipo 2, donde el perfil lipídico suele estar alterado, los estudios han arrojado importantes discrepancias<sup>97,98</sup>. Algunos estudios realizados en una población con diabetes han señalado a la oxLDL como un factor predictivo de la aparición de eventos cardiovasculares, aunque algunos autores no han encontrado esta asociación independiente cuando se han considerado las anomalías del perfil lipídico<sup>99-101</sup>. Sin embargo, y a diferencia de la débil asociación de la LDL modificada con eventos clínicos, otros estudios han encontrado asociaciones independientes con otros marcadores de la evolución de la arteriosclerosis como el grosor de la íntima-media carotídea o la nefropatía diabética<sup>102-106</sup>.

Un avance importante en la utilización de la LDL como biomarcador es la cuantificación de inmunocomplejos formados por anticuerpos y LDL modificadas (IC-oxLDL o IC-AGE-LDL), principalmente en estudios llevados a cabo en sujetos con diabetes de tipo 1<sup>107</sup>. Una de las propiedades de los diferentes tipos de LDL modificadas es que tienen capacidad inmunogénica<sup>108-113</sup>. Esta propiedad ha permitido detectar en el plasma autoanticuerpos específicos contra las diferentes LDL modificadas, incluyendo la oxLDL, la AGE-LDL y la LDL(-). Diversos estudios han mostrado que la concentración de estos autoanticuerpos se asocia con la presencia de la enfermedad arteriosclerótica, aunque existen numerosas discrepancias al respecto. Las evidencias actuales sugieren que los anticuerpos del tipo IgG estarían asociados positivamente con el desarrollo de arteriosclerosis, mientras que los anticuerpos de tipo IgM tendrían un papel ateroprotector<sup>114</sup>.

Los estudios más relevantes en este aspecto los ha realizado el grupo de Virella y Lopes-Virella, principalmente en sujetos con diabetes de tipo 1. Estos autores han mostrado en estudios *in vitro* que los IC-LDL tienen más potencial aterogénico que las LDL modificadas no unidas a anticuerpos<sup>97,115</sup>. Esto sería debido a que, además de la activación de la vía mediada por receptores «scavenger» que reconocen la LDL modificada, también activan en monocitos la vía del receptor Fc, específico de anticuerpos, potenciando el proceso inflamatorio<sup>20,115,116</sup>. Por otra parte, es

importante señalar que la mayor parte de la oxLDL y la AGE-LDL presente en la circulación plasmática circula en forma de IC<sup>20,74,117</sup>. Esto refuerza el concepto de que «in vivo» los inmunocomplejos con la oxLDL o la AGE-LDL tendrían un papel más relevante en el desarrollo de la arteriosclerosis que estas mismas LDL en forma libre.

En concordancia con esta idea, los estudios realizados por este grupo han mostrado que las concentraciones de IC-oxLDL y de IC-AGE-LDL están fuertemente asociadas con el grosor íntima-media carotídea y su progresión en la diabetes de tipo 1 de manera independiente a otros factores de riesgo<sup>88</sup>. Estos IC también están asociados con el grado de calcificación coronaria<sup>118</sup>, con el riesgo de desarrollar nefropatía<sup>119</sup> y con la progresión de retinopatía<sup>120</sup>. La importancia de estos estudios es que se han llevado a cabo con un número importante de individuos que forman parte de la cohorte del estudio DCCT/EDIC, por lo que la consistencia de los resultados es alta. Sin embargo, no se han realizado todavía estudios donde se analice la asociación de los IC-LDL con la incidencia de eventos coronarios en diabéticos de tipo 1. Donde sí se ha analizado esta asociación es en diabéticos de tipo 2 (cohorte VADT)<sup>102</sup>. Curiosamente, en estos pacientes no hay una asociación entre la incidencia de eventos clínicos y IC-oxLDL o IC-AGE-LDL pero sí con la concentración de inmunocomplejos de MDA-LDL, una forma específica de oxLDL, la cual no estaba asociada con la progresión de la arteriosclerosis en diabéticos de tipo 1<sup>88</sup>. Las razones que pueden explicar estas diferencias no están claras, aunque podrían ser atribuidas a una diferente evolución de las lesiones entre ambos tipos de pacientes con diabetes. El principal inconveniente de este método analítico es que requiere un paso previo de precipitación de los inmunocomplejos antes de la cuantificación mediante un inmunoensayo de la LDL modificada. Esto incrementa la complejidad técnica de la medida y, por tanto, su realización es difícil para la mayor parte de laboratorios clínicos.

## Conclusiones

La concentración plasmática de diferentes LDL modificadas está elevada en pacientes con diabetes, aunque en muchas ocasiones esta observación ha sido estrechamente asociada a la presencia de dislipidemia. Sin embargo, los últimos estudios que han valorado la concentración de LDL modificadas asociadas a inmunocomplejos han mostrado una asociación con la presencia y la progresión de la arteriosclerosis tanto en la diabetes de tipo 1 como en la diabetes de tipo 2. Esta es una aproximación prometedora que podría ayudar a una mejor predicción del RCV no solo en pacientes con diabetes, sino también en otras enfermedades con un desarrollo acelerado de la arteriosclerosis. Sin embargo, para definir mejor la implicación de cada tipo de LDL modificada en el desarrollo de la arteriosclerosis son necesarios más estudios realizados por diferentes grupos de investigación en pacientes con diferentes enfermedades o situaciones asociadas con la arteriosclerosis precoz.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Los autores de este trabajo han sido financiados por el Instituto de Salud Carlos III (CIBERDEM, FIS PI05-2099, FIS CP06-0220 y FIS PI10-00265) y la Generalitat de Catalunya (2009-SGR-1205).

## Bibliografía

1. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107:1058-70.
2. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2009;5:150-9.
3. Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. Oxidized LDL: Diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13:39-75.
4. Fraley AE, Tsimikas S. Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:502-9.
5. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome-a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*. 2006;23:469-80.
6. Farmer JA. Diabetic dyslipidemia and atherosclerosis: Evidence from clinical trials. *Curr Diab Rep*. 2008;8:71-7.
7. Sahade V, França S, Badaró R, Fernando Adán L. Obesity and postprandial lipemia in adolescents: Risk factors for cardiovascular disease. *Endocrinol Nutr*. 2012;59:131-9.
8. Wagner Fahlin AM, Sánchez Quesada JL, Pérez Pérez A. Diabetes mellitus y lipemia posprandial. *Endocrinol Nutr*. 2000;47:311-21.
9. Vergès B. Abnormal hepatic apolipoprotein B metabolism in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2010;211:353-60.
10. Ascaso JF. Advances in cholesterol-lowering interventions. *Endocrinol Nutr*. 2010;57:210-9.
11. Escolà-Gil JC, Rotllan N, Julve J, Blanco-Vaca F. In vivo macrophage-specific RCT and antioxidant and antiinflammatory HDL activity measurements: New tools for predicting HDL atheroprotection. *Atherosclerosis*. 2009;206:321-7.
12. Kontush A, Chapman MJ. Why is HDL functionally deficient in type 2 diabetes? *Curr Diab Rep*. 2008;8:51-9.
13. Chapman MJ, Guérin M, Bruckert E. Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J*. 1998;19 Suppl A:A24-30.
14. Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Role of advanced glycosylation products in complications of diabetes. *Diabetes Care*. 1988;11 Suppl 1:73-9.
15. Curtiss LK, Witztum JL. Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CII, and E are glycosylated in hyperglycemic diabetic subjects. *Diabetes*. 1985;34:452-61.
16. Wang X, Bucala R, Milne R. Epitopes close to the apolipoprotein B low density lipoprotein receptor-binding site are modified by advanced glycation end products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:7643-7.
17. Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, Soran H, Durrington PN. Glycation of LDL in non-diabetic people: Small dense LDL is preferentially glycated both in vivo and in vitro. *Atherosclerosis*. 2009;202:162-8.
18. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988;318:1315-21.
19. Lopes-Virella MF, Klein RL, Virella G. Modification of lipoproteins in diabetes. *Diabetes Metab Rev*. 1996;12:69-90.
20. Virella G, Atchley D, Koskinen S, Zheng D, Lopes-Virella MF. Proinflammatory properties of immune complexes prepared with purified human oxLDL antibodies and human oxLDL. *Clin Immunol*. 2002;105:81-92.

21. Isoda K, Folco E, Marwali MR, Ohsuzu F, Libby P. Glycated LDL increases monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis. *Atherosclerosis*. 2008;198:307–12.
22. Hodgkinson CP, Laxton RC, Patel K, Ye S. Advanced glycation end-product of low density lipoprotein activates the toll-like 4 receptor pathway implications for diabetic atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:2275–81.
23. Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN. Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19:378–84.
24. Rabbani N, Thornalley PJ. Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22:309–17.
25. Rabbani N, Chittari MV, Bodmer CW, Zehnder D, Ceriello A, Thornalley PJ. Increased glycation and oxidative damage to apolipoprotein B100 of LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes and effect of metformin. *Diabetes*. 2010;59:1038–45.
26. Rabbani N, Godfrey L, Xue M, Shaheen F, Geoffrion M, Milne R, et al. Glycation of LDL by methylglyoxal increases arterial atherogenicity: A possible contributor to increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *Diabetes*. 2011;60:1973–80.
27. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54:1615–25.
28. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: An update. *J Lipid Res*. 2009;50:S376–81.
29. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320:915–24.
30. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:831–42.
31. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: An update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1177–8.
32. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115–26.
33. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: The role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res*. 2004;45:993–1007.
34. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:791–804.
35. Sánchez-Quesada JL, Villegas S. Modified forms of LDL in plasma. En: Parthasarathy S, editor. *Atherogenesis*. Rijeka, Croatia: InTech; 2011. p. 447–72.
36. Oörni K, Kovanen PT. Lipoprotein modification by secretory phospholipase A(2) enzymes contributes to the initiation and progression of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20:421–7.
37. Katsuda S, Coltrera MD, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis. IV. Immunocytochemical analysis of cell activation and proliferation in lesions of young adults. *Am J Pathol*. 1993;142:1787–93.
38. Pentikäinen MO, Oörni K, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. *J Intern Med*. 2000;247:359–70.
39. Williams KJ, Tabas I. Lipoprotein retention and clues for atheroma regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1536–40.
40. Fenske D, Dersch K, Lux C, Zipse L, Suriyaphol P, Dragneva Y, et al. Enzymatically hydrolyzed low-density lipoprotein modulates inflammatory responses in endothelial cells. *Thromb Haemost*. 2008;100:1146–54.
41. Klouche M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation*. 2000;101:1799–805.
42. Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;421:277–90.
43. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9:471–4.
44. Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:123–39.
45. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation*. 2002;105:2107–11.
46. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: Does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11:93–102.
47. Bhakdi S, Lackner KJ, Han SR, Torzewski M, Husmann M. Beyond cholesterol: The enigma of atherosclerosis revisited. *Thromb Haemost*. 2004;91:639–45.
48. Apostolov EO, Ray D, Savenka AV, Shah SV, Basnakian AG. Chronic uremia stimulates LDL carbamylation and atherosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:1852–7.
49. Apostolov EO, Shah SV, Ok E, Basnakian AG. Quantification of carbamylated LDL in human sera by a new sandwich ELISA. *Clin Chem*. 2005;51:719–28.
50. Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov ZA, Popov EG, Jaakkola O, Solakivi T, et al. Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization. *Lab Invest*. 1992;67:665–75.
51. Tertov VV, Bittolo-Bon G, Sobenin IA, Cazzolato G, Orekhov AN, Avogaro P. Naturally occurring modified low density lipoproteins are similar if not identical: More electronegative and desialylated lipoprotein subfractions. *Exp Mol Pathol*. 1995;62:166–72.
52. Lagrost L, Florentin E, Guyard-Dangremont V, Athias A, Gandjini H, Lallemand C, et al. Evidence for nonesterified fatty acids as modulators of neutral lipid transfers in normolipidemic human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1388–96.
53. Benítez S, Camacho M, Arcelus R, Vila L, Bancells C, Ordóñez-Llanos J, et al. Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL. *Atherosclerosis*. 2004;177:299–305.
54. Gaubatz JW, Gillard BK, Massey JB, Hoogeveen RC, Huang M, Lloyd EE, et al. Dynamics of dense electronegative low density lipoproteins and their preferential association with lipoprotein phospholipase A(2). *J Lipid Res*. 2007;48:348–57.
55. Lu M, Gantz DL, Herscovitz H, Gursky O. Kinetic analysis of thermal stability of human low density lipoproteins: A model for LDL fusion in atherogenesis. *J Lipid Res*. 2012;53:2175–85.
56. Phillips C, Owens D, Collins P, Tomkin GH. Low density lipoprotein non-esterified fatty acids and lipoprotein lipase in diabetes. *Atherosclerosis*. 2005;181:109–14.
57. Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Pérez A, Wagner AM, Rigla M, Carreras G, et al. The inflammatory properties of electronegative low-density lipoprotein from type 1 diabetic patients are related to increased platelet-activating factor acetylhydrolase activity. *Diabetologia*. 2005;48:2162–9.
58. Benítez S, Pérez A, Sánchez-Quesada JL, Wagner AM, Rigla M, Arcelus R, et al. Electronegative low-density lipoprotein subfraction from type 2 diabetic subjects is proatherogenic and unrelated to glycemic control. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23:26–34.

59. Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Ordóñez-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15:329–35.
60. Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis*. 1988;8:79–87.
61. Mello AP, da Silva IT, Abdalla DS, Damasceno NR. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis*. 2011;215:257–65.
62. Sánchez-Quesada JL, Vinagre I, de Juan-Franco E, Sánchez-Hernández J, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J, et al. Effect of improving glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus on low-density lipoprotein size, electronegative low-density lipoprotein and lipoprotein-associated phospholipase A2 distribution. *Am J Cardiol*. 2012;110:67–71.
63. Sánchez-Quesada JL, Estruch M, Benítez S, Ordóñez-Llanos J. Electronegative LDL: A useful biomarker of cardiovascular risk. *Clin Lipidol*. 2012;7:345–59.
64. Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL: A biomarker and a pathogenic factor. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20:363–9.
65. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:844–8.
66. Holvoet P, Collen D, van de Werf F. Malondialdehyde-modified LDL as a marker of acute coronary syndromes. *JAMA*. 1999;281:1718–21.
67. Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1649–54.
68. Tsimikas S. Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2006;8:55–61.
69. Uno M, Kitazato KT, Nishi K, Itabe H, Nagahiro S. Raised plasma oxidised LDL in acute cerebral infarction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74:312–6.
70. Holvoet P, Perez G, Zhao Z, Brouwers E, Bernar H, Collen D. Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. *J Clin Invest*. 1995;95:2611–9.
71. Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, Shimamura K, Uchiyama H, Kimura J, et al. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res*. 1996;37:45–53.
72. Tsimikas S, Witztum JL. Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation*. 2001;103:1930–2.
73. Cohen MP, Lautenslager G, Shea E. Glycated LDL concentrations in non-diabetic and diabetic subjects measured with monoclonal antibodies reactive with glycated apolipoprotein B epitopes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1993;31:707–13.
74. Virella G, Derrick MB, Pate V, Chassereau C, Thorpe SR, Lopes-Virella MF. Development of capture assays for different modifications of human low-density lipoprotein. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:68–75.
75. Holvoet P, Theilmeier G, Shivalkar B, Flameng W, Collen D. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:415–22.
76. Tsimikas S, Clopton P, Brilakis ES, Marcovina SM, Khera A, Miller ER, et al. Relationship of oxidized phospholipids on apolipoprotein B-100 particles to race/ethnicity, apolipoprotein(a) isoform size, and cardiovascular risk factors: Results from the Dallas Heart Study. *Circulation*. 2009;119:1711–9.
77. Frostegård J, Wu R, Lemne C, Thulin T, Witztum JL, de Faire U. Circulating oxidized low-density lipoprotein is increased in hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 2003;105:615–20.
78. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, van de Werf F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation*. 1998;98:1487–94.
79. Tsimikas S, Aikawa M, Miller Jr FJ, Miller ER, Torzewski M, Lentz SR, et al. Increased plasma oxidized phospholipid:apolipoprotein B-100 ratio with concomitant depletion of oxidized phospholipids from atherosclerotic lesions after dietary lipid-lowering: A potential biomarker of early atherosclerosis regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:175–81.
80. Tsimikas S, Kiechl S, Willeit J, Mayr M, Miller ER, Kronenberg F, et al. Oxidized phospholipids predict the presence and progression of carotid and femoral atherosclerosis and symptomatic cardiovascular disease: Five-year prospective results from the Bruneck study. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:2219–28.
81. Herder C, Baumert J, Zierer A, Roden M, Meisinger C, Karakas M, et al. Immunological and cardiometabolic risk factors in the prediction of type 2 diabetes and coronary events: MONICA/KORA Augsburg case-cohort study. *PLoS One*. 2011;6:e19852.
82. Wu T, Willett WC, Rifai N, Shai I, Manson JE, Rimm EB. Is plasma oxidized low-density lipoprotein, measured with the widely used antibody 4E6, an independent predictor of coronary heart disease among U.S. men and women? *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:973–9.
83. Meisinger C, Baumert J, Khuseynova N, Loewel H, Koenig W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation*. 2005;112:651–7.
84. Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, Patel R, Pattison J, Miller E, et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:360–70.
85. Tsimikas S, Lau HK, Han KR, Shortal B, Miller ER, Segev A, et al. Percutaneous coronary intervention results in acute increases in oxidized phospholipids and lipoprotein(a): Short-term and long-term immunologic responses to oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*. 2004;109:3164–70.
86. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;103:1955–60.
87. Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Bang H, Heiss G, Duncan BB, Folsom AR, et al. Circulating oxidised low-density lipoprotein and intercellular adhesion molecule-1 and risk of type 2 diabetes mellitus: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetologia*. 2007;50:36–42.
88. Lopes-Virella MF, Hunt KJ, Baker NL, Lachin J, Nathan DM, Virella G. Levels of oxidized LDL and advanced glycation end products-modified LDL in circulating immune complexes are strongly associated with increased levels of carotid intima-media thickness and its progression in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011;60:582–9.
89. Sánchez-Quesada JL, Pérez A, Caixàs A, Rigla M, Payés A, Benítez S, et al. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: Relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:3243–9.
90. Zhang B, Kaneshi T, Ohta T, Saku K. Relation between insulin resistance and fast-migrating LDL subfraction as characterized by capillary isotachopheresis. *J Lipid Res*. 2005;46:2265–77.

91. Nakhjavani M, Asgharani F, Khalilzadeh O, Esteghamati A, Ghaneei A, Morteza A, et al. Oxidized low-density lipoprotein is negatively correlated with lecithin-cholesterol acyltransferase activity in type 2 diabetes mellitus. *Am J Med Sci.* 2011;341:92–5.
92. Bastos AS, Graves DT, Loureiro AP, Rossa Júnior C, Abdalla DS, Faulin Tdo E, et al. Lipid peroxidation is associated with the severity of periodontal disease and local inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E1353–62.
93. Akanji AO, Abdella N, Mojiminiyi OA. Determinants of glycated LDL levels in nondiabetic and diabetic hyperlipidaemic patients in Kuwait. *Clin Chim Acta.* 2002;317:171–6.
94. Abe M, Maruyama N, Okada K, Matsumoto S, Matsumoto K, Soma M. Effects of lipid-lowering therapy with rosuvastatin on kidney function and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18:1018–28.
95. Sánchez-Quesada JL, Ota-Entraigas C, Franco M, Jorba O, González-Sastre F, Blanco-Vaca F, et al. Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 1999;84:655–9.
96. Zhang B, Matsunaga A, Rainwater DL, Miura S, Noda K, Nishikawa H, et al. Effects of rosuvastatin on electronegative LDL as characterized by capillary isotachopheresis: The ROSARY Study. *J Lipid Res.* 2009;50:1832–41.
97. Virella G, Lopes-Virella MF. The pathogenic role of the adaptive immune response to modified LDL in diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:76.
98. Rizzo M, Berneis K, Koulouris S, Pastromas S, Rini GB, Sakellariou D, et al. Should we measure routinely oxidized and atherogenic dense low-density lipoproteins in subjects with type 2 diabetes? *Int J Clin Pract.* 2010;64:1632–42.
99. Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Kume A, et al. Predictive value of circulating oxidized LDL for cardiac events in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Diabetes Care.* 2004;27:843–4.
100. Holvoet P, Harris TB, Tracy RP, Verhamme P, Newman AB, Rubin SM, et al. Association of high coronary heart disease risk status with circulating oxidized LDL in the well-functioning elderly: Findings from the Health, Aging, and Body Composition study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1444–8.
101. Hsu RM, Devaraj S, Jialal I. Autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* 2002;317:145–50.
102. Lopes-Virella MF, Hunt KJ, Baker NL, Virella G, Moritz T. The levels of MDA-LDL in circulating immune complexes predict myocardial infarction in the VADT study. *Atherosclerosis.* 2012;224:526–31.
103. Ujihara N, Sakka Y, Takeda M, Hirayama M, Ishii A, Tomonaga O, et al. Association between plasma oxidized low-density lipoprotein and diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002;58:109–14.
104. Gokulakrishnan K, Deepa R, Velmurugan K, Ravikumar R, Karkuzhali K, Mohan V. Oxidized low-density lipoprotein and intimal medial thickness in subjects with glucose intolerance: The Chennai Urban Rural Epidemiology Study-25. *Metabolism.* 2007;56:245–50.
105. Piarulli F, Lapolla A, Sartore G, Rossetti C, Bax G, Noale M, et al. Autoantibodies against oxidized LDLs and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28:653–7.
106. Brown WV, Goldberg RB, Lopes-Virella M, Reaven P. Reducing vascular disease risk in the type 2 diabetic patient. *J Clin Lipidol.* 2011;5:3–11.
107. Lopes-Virella MF, Thorpe SR, Derrick MB, Chassereau C, Virella G. The immunogenicity of modified lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1043:367–78.
108. Lopes-Virella MF, Virella G. Immune mechanisms in the pathogenesis of atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 1991;285:383–92.
109. Witztum JL, Koschinsky T. Metabolic and immunological consequences of glycation of low density lipoproteins. *Prog Clin Biol Res.* 1989;304:219–34.
110. Tsimikas S, Palinski W, Witztum JL. Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:95–100.
111. Korpinen E, Groop PH, Akerblom HK, Vaarala O. Immune response to glycated and oxidized LDL in IDDM patients with and without renal disease. *Diabetes Care.* 1997;20:1168–71.
112. Oliveira JA, Sevanian A, Rodrigues RJ, Apolinário E, Abdalla DS. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. *Clin Biochem.* 2006;39:708–14.
113. Virella G, Thorpe SR, Alderson NL, Stephan EM, Atchley D, Wagner F, et al. Autoimmune response to advanced glycosylation end-products of human LDL. *J Lipid Res.* 2003;44:487–93.
114. Lopes-Virella MF, Virella G. Clinical significance of the humoral immune response to modified LDL. *Clin Immunol.* 2010;134:55–65.
115. Saad AF, Virella G, Chassereau C, Boackle RJ, Lopes-Virella MF. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res.* 2006;47:1975–83.
116. Lopes-Virella MF, Binzafar N, Rackley S, Takei A, la Via M, Virella G. The uptake of LDL-IC by human macrophages: Predominant involvement of the Fc gamma RI receptor. *Atherosclerosis.* 1997;135:161–70.
117. Virella G, Carter RE, Saad A, Crosswell EG, Game BA, Lopes-Virella MF. Distribution of IgM and IgG antibodies to oxidized LDL in immune complexes isolated from patients with type 1 diabetes and its relationship with nephropathy. *Clin Immunol.* 2008;127:394–400.
118. Lopes-Virella MF, Baker NL, Hunt KJ, Lachin J, Nathan D, Virella G. Oxidized LDL immune complexes and coronary artery calcification in type 1 diabetes. *Atherosclerosis.* 2011;214:462–7.
119. Lopes-Virella MF, Carter RE, Baker NL, Lachin J, Virella G. High levels of oxidized LDL in circulating immune complexes are associated with increased odds of developing abnormal albuminuria in type 1 diabetes. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:1416–23.
120. Lopes-Virella MF, Baker NL, Hunt KJ, Lyons TJ, Jenkins AJ, Virella G. High concentrations of AGE-LDL and oxidized LDL in circulating immune complexes are associated with progression of retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2012;35:1333–40.