



FACULTAT  
DE CIÈNCIES  
I TECNOLOGIA  
UVIC | UVIC·UCC



Trabajo de Fin de Grado Experimental

# Caracterización de lipoproteínas en plasma de pacientes con ictus isquémico asociado a presencia de placa de aterosclerosis en la carótida interna.

Morwena Caballero Puig

**Grado en Biotecnología**

**Tutora externa:** Sònia Benítez González

**Tutora UVIC – UCC:** Marta Cullell Dalmau

**Ubicación:** Vic, junio de 2021

## **Resumen**

**Título:** Caracterización de lipoproteínas en plasma de pacientes con ictus isquémico asociado a presencia de placa de aterosclerosis en la carótida interna.

**Autora:** Morwena Caballero Puig

**Cotutores:** Dra. Sònia Benítez González (IIB Sant Pau) i Dra. Marta Cullell Dalmau (UVic)

**Fecha:** Junio de 2021

**Palabras clave:** estenosis, ictus isquémico, lípidos, lipoproteínas, inflamación, vulnerabilidad de la placa, biomarcadores, aterosclerosis carotídea.

La estenosis de la arteria carótida, causada por la aterosclerosis, da lugar al 20% de los ictus isquémicos, una de las mayores causas de muerte en la actualidad. En la aterosclerosis, las lipoproteínas juegan un papel fundamental, pues la acumulación de lípidos contribuye a la progresión e inflamación de la placa.

El riesgo de ruptura de la placa no sólo depende del grado de estenosis, sino de su vulnerabilidad, que viene determinada en gran parte por el nivel de inflamación y concentración de lípidos. La tomografía por emisión de positrones PET/CT determina el grado de inflamación de la placa y se ha descrito que es un predictor de recurrencia de ictus isquémico aterotrombótico, pero es una técnica cara y que requiere de personal especializado. El objetivo del proyecto en que se enfoca este trabajo es encontrar biomarcadores lipoproteicos, sobre todo lipoproteínas modificadas en plasma, que se asocien a los valores de PET para determinar el riesgo de la aparición del ictus y tomar decisiones clínicas sobre el tratamiento del paciente. Por otra parte, es de interés el estudio de las propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas en los pacientes para comprender la implicación de las lipoproteínas en esta patología.

Este trabajo está centrado en estudiar las propiedades de la LDL y HDL aisladas de pacientes a los siete días de sufrir ictus isquémico con aterosclerosis carotídea, estando clasificados según el grado de estenosis (mayor o menor al 50%), y se comparará con las lipoproteínas de controles sanos. Este conocimiento, junto al obtenido en el resto del proyecto en que se engloba, puede contribuir a la mejora de la salud pública evitando así la aparición o recurrencia del ictus isquémico.

## Summary

**Title:** Characterization of lipoproteins in plasma of patients with ischemic stroke associated with the presence of atherosclerosis plaque in the internal carotid.

**Author:** Morwena Caballero Puig

**Tutors:** Dra. Sònia Benítez González (IIB Sant Pau) and Dra. Marta Cullell Dalmau (UVic)

**Date:** June 2021

**Keywords:** stenosis, ischemic stroke, lipids, lipoproteins, inflammation, plaque vulnerability, biomarkers, carotid atherosclerosis.

Carotid artery stenosis, caused by atherosclerosis, accounts for 20% of ischemic strokes, one of the leading causes of death. In atherosclerosis, lipoproteins play a fundamental role since the accumulation of lipids contributes to the progression and inflammation of the plaque.

The risk of plaque rupture not only depends on the degree of stenosis, but it also takes place plaque vulnerability, which is largely determined by the level of inflammation and concentration of lipids. Positron emission tomography PET/CT determines the degree of inflammation of the plaque and has been described as a predictor of recurrence of atherothrombotic ischemic stroke, but it is an expensive technique that requires specialized personnel. The objective of the project on which this work is focused is to find lipoprotein biomarkers, especially modified lipoproteins in plasma, that are associated with PET values to determine the risk of the onset of stroke and make clinical decisions about the patient's treatment. On the other hand, the study of the physicochemical properties of lipoproteins in patients is of interest to understand the mechanisms involved in this pathology.

This work is focused on the study of the properties of LDL and HDL isolated from patients seven days after suffering ischemic stroke with carotid atherosclerosis, being classified according to the degree of stenosis (greater or less than 50%) and will be compared with lipoproteins of healthy controls. This knowledge with that obtained in the rest of the project in which it is included, can contribute to the improvement of public health, thus avoiding the appearance or recurrence of ischemic stroke.

# Índice de contenidos

Lista de abreviaturas .....	V
Lista de figuras .....	VII
1. Introducción .....	1
1.1. Ictus isquémico.....	1
1.1.1. Diagnóstico y tratamiento .....	2
1.1.2. Ictus isquémico y aterosclerosis .....	3
1.2. Ictus isquémico y lipoproteínas.....	5
1.2.1. Lipoproteínas de baja densidad LDL .....	5
1.2.2. Lipoproteínas de alta densidad HDL.....	6
1.3. Biomarcadores inflamatorios .....	7
2. Hipótesis y objetivos .....	8
2.1. Hipótesis.....	8
2.2. Objetivos .....	8
2.2.1. Objetivo general .....	8
2.2.2. Objetivos específicos.....	8
3. Materiales y métodos .....	9
3.1. Tipo de estudio .....	9
3.1.1. Criterios de inclusión .....	9
3.1.2. Criterios de exclusión.....	9
3.2. Diseño experimental.....	10
3.3. Obtención de muestras de sangre .....	11
3.4. Separación de lipoproteínas de <i>pool</i> .....	11
3.5. Separación de lipoproteínas de pacientes .....	12
3.6. Composición química de las lipoproteínas.....	13
3.7. Diálisis de la muestra por cromatografía de gel filtración .....	13
3.8. Cromatografía líquida (AKTA-FPLC).....	13
3.9. Susceptibilidad a la oxidación de la LDL .....	14
3.10. Cultivos celulares .....	14
3.10.1. Obtención e incubación de macrófagos con estímulos.....	15
3.11. Cuantificación de proteína (BCA).....	15
3.12. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).....	16
3.13. Análisis estadístico .....	16
3.14. Consideraciones éticas .....	16
4. Resultados .....	17
4.1. Características de la población.....	17

4.2.	Composición de las LDL.....	19
4.3.	Composición de las HDL .....	20
4.4.	LDL electronegativa.....	22
4.5.	Susceptibilidad a la oxidación de la LDL .....	22
4.6.	Cuantificación de biomarcadores inflamatorios IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1 e IL-10 .....	23
5.	Discusión.....	27
6.	Conclusiones .....	31
6.1.	Limitaciones y mejoras para realizar en proyectos futuros .....	31
7.	Bibliografía .....	32

## **Lista de abreviaturas**

**ACI:** arteria carótida interna

**AIT:** accidente isquémico transitorio

**apo:** apolipoproteína

**BCA:** ensayo con ácido bicinconínico

**cHDL:** colesterol HDL

**CL:** colesterol libre

**cLDL:** colesterol LDL

**CT:** colesterol total

**cVLDL:** colesterol VLDL

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**ELISA:** ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

**FBS:** suero bovino fetal

**FL:** fosfolípidos

**FPLC:** cromatografía líquida de proteínas

**HDL:** lipoproteína de alta densidad

**IDL:** lipoproteína de densidad intermedia

**IL:** interleucina

**IL-10:** interleucina-10

**IL-1 $\beta$ :** interleucina-1 $\beta$

**IL-6:** interleucina-6

**KBr:** bromuro potásico

**LCAT:** Lecitin Colesterol Acil Transferasa

**LDH:** lactato deshidrogenasa

**LDL(-):** lipoproteína de baja densidad electronegativa

**LDL(+):** lipoproteína de baja densidad electropositiva

**LDL:** lipoproteína de baja densidad

**LDLox:** lipoproteína de baja densidad oxidada

**LPS:** policarbonato libre de lipopolisacáridos

**MCP-1:** proteína quimiotáctica de monocitos 1

**mmLDL:** LDL mínimamente modificada

**MRS:** escala de Rankin modificada

**NEFA:** ácidos grasos no esterificados

**PAF-AH:** factor activador de plaquetas acetilhidrolasa

**PBS:** tampón fosfato salino

**PET:** tomografía por emisión de positrones

**PMA:** éster de forbol

**SST:** tubo separador de suero

**TG:** triglicéridos

**Tlat:** tiempo de latencia

**TOAST:** Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

**VLDL:** lipoproteína de densidad muy baja

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Ictus isquémico e ictus hemorrágico.....	1
<b>Figura 2.</b> Desarrollo de la fase inicial “estría grasa” (A). Progreso de la lesión (B).....	3
<b>Figura 3.</b> Ruptura de placa y trombosis.....	4
<b>Figura 4.</b> Perfil lipídico de los tres grupos incluidos en el estudio.....	18
<b>Figura 5.</b> Composición química de las LDL de los grupos de estudio.....	20
<b>Figura 6.</b> Composición química de las HDL de los grupos de estudio .....	21
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de fracción de LDL electronegativa en los grupos de estudio .....	22
<b>Figura 8.</b> Susceptibilidad de la LDL a la oxidación .....	23
<b>Figura 9.</b> Cuantificación de los biomarcadores inflamatorios IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1 e IL-10 .....	24
<b>Figura 10.</b> Porcentaje correspondiente a las citoquinas liberadas respecto a la LDL(-) sola .....	25



## **Lista de tablas**

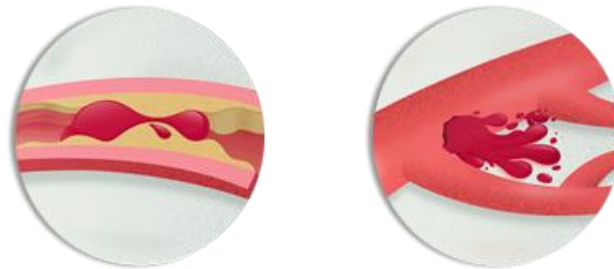
**Tabla 1.** Protocolo de aislamiento de lipoproteínas de pacientes..... 12

**Tabla 2.** Variables clínicas de la población de estudio..... 17

# 1. Introducción

## 1.1. Ictus isquémico

El ictus es la segunda causa principal de mortalidad en países desarrollados con 5,5 millones de muertes por año [1]. Se trata de una enfermedad cerebrovascular que se produce cuando existe un trastorno en la circulación cerebral mediante la obstrucción o rotura en un vaso sanguíneo, causando así un flujo de sangre deficiente en el cerebro. Debido a esto, las células nerviosas no reciben el oxígeno necesario y tienden a la muerte celular. El número de supervivientes de este tipo de accidente cerebrovascular suele ser elevado, y estos representan una gran población de riesgo en la que es necesario enfocar diversas estrategias con el objetivo de prevenir recurrencias de esta patología.



**Figura 1.** Ictus isquémico e ictus hemorrágico [2].

Según el mecanismo de lesión que ha tenido lugar, se distinguen dos clases de ictus, el isquémico y el hemorrágico, siendo el primero el más frecuente, representando el 85% de los casos [3]. El ictus isquémico se produce por la obstrucción del flujo sanguíneo en el cerebro causado por un trombo o coágulo de sangre, originando así la trombosis cerebral. En muchos de los casos, dicho coágulo se ha originado en una zona distinta al cerebro y mediante la circulación de la sangre es transportado hacia él, donde puede tener lugar la oclusión de un vaso sanguíneo, ocasionando un ictus isquémico. El 20% de estos ictus son de tipo aterotrombótico, es decir, son debidos a la presencia de placas de ateroma en las arterias de mediano-grande calibre, principalmente en la arteria carótida [4].

Por otra parte, el ictus hemorrágico supone el 15% de los casos de ictus, y es aquel en el que un vaso sanguíneo se rompe en el interior del cerebro provocando una hemorragia y una compresión de las estructuras del sistema nervioso.

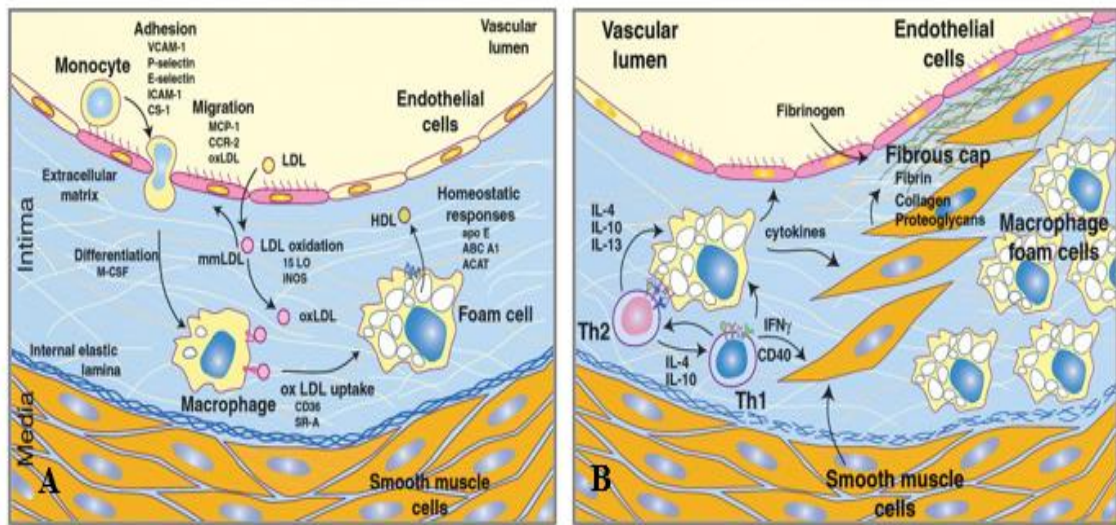
### 1.1.1. Diagnóstico y tratamiento

En cuanto al diagnóstico del ictus isquémico, a pesar de los avances en los tratamientos médicos actuales para prevenirlo, el grado de impacto sigue siendo alto. El diagnóstico está basado en un análisis de sangre, así como en diversas exploraciones físicas y neurológicas. Cuando hay sospecha de que se trata de un ictus de causa aterotrombótica también se hace una ecografía de la carótida.

En cuanto a tratamientos se refiere, se encuentran tanto en la fase aguda del ictus como en la prevención de este. En el primero son fundamentales los tratamientos trombolíticos, con el objetivo de lisar el trombo, pudiéndose administrar por vía intravenosa, intraarterial o combinada; mientras que en el segundo son de uso habitual los tratamientos antitrombóticos, antihipertensivos y mediante estatinas [5]. El uso de estatinas, inhibidores de HMG-CoA reductasa, es especialmente importante en el caso de ictus aterotrombóticos ya que tienen gran poder hipocolesterolemizante, que juega un papel importante en el desarrollo de la lesión ateromatosa, como se explicará en el siguiente apartado. En casos graves es necesaria cirugía para tratar una arteria estrechada por aterosclerosis, donde se lleva a cabo una endarterectomía para eliminar la placa, o bien una angioplastia carotídea mediante la implantación de un *stent* [6]. Sin embargo, para saber si una placa está activa (continúa creciendo) y por tanto se ha de operar, no sólo se debe tener en cuenta el grado de estenosis, sino también el contenido lipídico y de inflamación. Actualmente se utiliza una estrategia para determinar el riesgo de ruptura de la placa basada en el grado de inflamación determinado por una técnica de imagen llamada 18-FDG-PET (tomografía por emisión de positrones con 18-fluorodesoxiglucosa), que permite una cuantificación precisa de la inflamación de la placa midiendo el metabolismo de los macrófagos [7]. FDG es un análogo de glucosa que contiene un radiactivo isótopo de flúor-18, donde la tomografía computarizada permite determinar la ubicación de esta en el cuerpo debido a su aumento de captación en regiones específicas [8]. No obstante, es un procedimiento caro, poco común y arriesgado. Por ello, es necesario encontrar biomarcadores en plasma que permitan decidir en qué pacientes se realiza esta técnica PET y en cuáles no.

### 1.1.2. Ictus isquémico y aterosclerosis

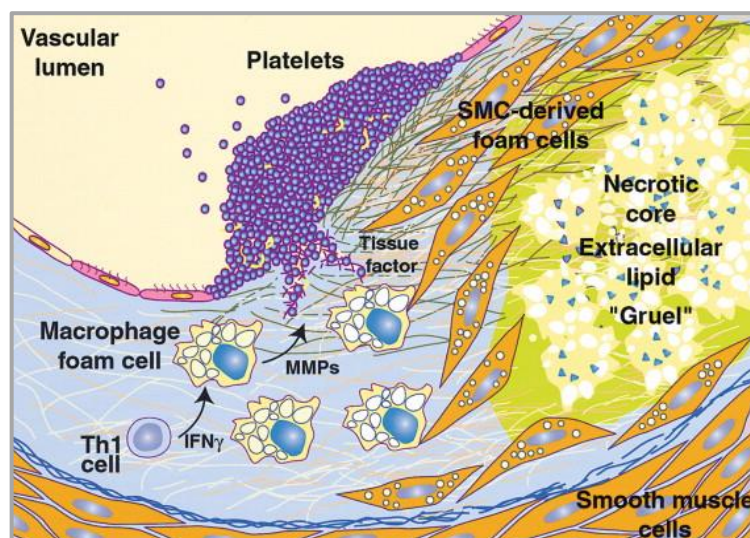
La aterosclerosis es una enfermedad con un importante componente inflamatorio que tiene lugar en la pared arterial, cuando ésta aumenta de grosor y rigidez, dificultando así el transporte de sangre. Son muchos los factores que conllevan al desarrollo de esta afección, como la hipertensión, el exceso de colesterol y triglicéridos o la obesidad, entre otros [9]. La lesión principal es la placa de ateroma que está compuesta principalmente por lípidos o lipoproteínas, tejido fibroso y células inflamatorias, dando lugar a la estenosis arterial. Puede afectar a arterias de diferentes localizaciones y con diferente grado de progresión, como en las arterias coronarias, aquellas que irrigan al corazón, pudiendo así causar un infarto agudo de miocardio o incluso la muerte súbita. En cuanto a la zona cerebral pueden verse afectadas las carótidas, vertebrales y cerebrales, causando así un accidente cerebrovascular agudo o un accidente isquémico transitorio (AIT) [10]. La aterosclerosis se presenta de forma crónica, por estenosis, o de forma aguda, por rotura de la placa y formación de un trombo.



**Figura 2. Desarrollo de la fase inicial “estría grasa” (A).** “La LDL está sujeta a modificaciones oxidativas en el espacio subendotelial, progresando desde LDL mínimamente modificada (mmLDL) a LDL extensamente oxidada (oxLDL). Los monocitos se unen a las células endoteliales y se liberan citoquinas inflamatorias. Los monocitos adherentes migran al espacio subendotelial y se diferencian en macrófagos. La captación de oxLDL a través de receptores conduce a la formación de células espumosas. El colesterol oxLDL captado por los receptores está sujeto a esterificación y almacenamiento en gotas lipídicas, se convierte en formas más solubles o se exporta a aceptores extracelulares de HDL a través de transportadores de colesterol”. **Progreso de la lesión (B).** “Las interacciones entre células espumosas establecen un proceso inflamatorio crónico. Las citoquinas secretadas por linfocitos y macrófagos ejercen efectos pro y antiaterogénicos sobre cada uno de los elementos celulares de la pared del vaso. Las células del músculo liso migran desde la porción medial de la pared arterial, proliferan y secretan proteínas de la matriz extracelular que forman una placa fibrosa” [11].

La evolución de la aterosclerosis se caracteriza por una fase inicial llamada “estría grasa” en la que hay una acumulación lipídica debida a la entrada de la fracción de LDL en el espacio subendotelial de la arteria [12]. Una vez aquí, la LDL se ve modificada por procesos enzimáticos, de oxidación y agregación, obteniendo así una fracción de LDL modificada, la cual induce la expresión de citoquinas, mediante las que se desencadena tanto la respuesta inmunitaria innata como la adaptativa. Esta alteración conduce a la movilización de monocitos, proceso facilitado por las citoquinas MCP-1 [13], forzando su diferenciación hacia macrófagos y células dendríticas [14]. Las LDL son fagocitadas por los macrófagos, que las reconocen mediante receptores específicos convirtiéndose así en células espumosas [15], favoreciendo la liberación de más citoquinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), así como el desarrollo de la placa de ateroma, la inflamación y la proliferación vascular [16].

La segunda y tercera fase, también conocidas como lesiones intermedias y avanzadas respectivamente, consisten en el continuo desarrollo de la placa, pues la inflamación causada permite el paso de más leucocitos. Dicha inflamación acarrea una elevada muerte celular, con lo que se obtiene un núcleo necrótico rico en lípidos en contacto con cristales de colesterol, células espumosas y diversas cápsulas fibrosas. Esta agrupación, junto con procesos de calcificación y vascularización, comporta la ruptura de la placa, generando así una aterotrombosis o trombo, pudiendo causar infartos de miocardio o isquemia cerebral [17] [18].



**Figura 3. Ruptura de placa y trombosis.** “La necrosis de los macrófagos y las células espumosas derivadas de las células del músculo liso conduce a la formación de un núcleo necrótico y la acumulación de colesterol extracelular. La secreción de macrófagos de metaloproteinasas de la matriz y la neovascularización contribuyen al debilitamiento de la placa fibrosa. La ruptura de la placa expone los componentes sanguíneos al factor tisular, lo que inicia la coagulación, el reclutamiento de plaquetas y la formación de un trombo” [11]

## **1.2. Ictus isquémico y lipoproteínas**

Dado el papel central de las LDL en el ictus isquémico aterotrombótico, los niveles lipídicos y las características cualitativas de esta lipoproteína puede determinar la aparición de este tipo de ictus. Por su parte, la HDL tiene una función protectora en la progresión de la arteriosclerosis. Las lipoproteínas son complejos lípido-proteína que transportan los lípidos apolares en circulación. La fracción proteica de las lipoproteínas están compuestas por una o más proteínas denominadas apolipoproteínas (apos) que tienen como función el transporte de lípidos y su metabolización.

Las lipoproteínas presentan una gran heterogeneidad, con estructuras y composiciones diferentes según su función. Se clasifican según su densidad, ya que se separan comúnmente por centrifugación, y se encuentran los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las de densidad intermedia (IDL), las de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL) [19].

Puesto que las lipoproteínas se encuentran en circulación, mayores niveles de concentración de colesterol y LDL tienden a contribuir en el desarrollo de la placa de ateroma. El contenido de lípidos presentes en la placa determina fuertemente la vulnerabilidad de esta y la tasa de progresión de la estenosis como consecuencia de la acumulación de fracciones lipoproteicas modificadas.

### **1.2.1. Lipoproteínas de baja densidad LDL**

Las partículas de LDL contienen aproximadamente el 70% del colesterol total circulante (cLDL) y tienen la función de liberar el colesterol procedente del hígado a las células de los tejidos periféricos mediante el reconocimiento de la apoB de la LDL por su receptor específico, que internaliza la partícula de LDL en la célula favoreciendo así la captación de colesterol [20]. Se ha observado que el uso de tratamientos hipolipemiantes consigue la disminución de las concentraciones en suero de cLDL y se reduce el riesgo y la mortalidad ocasionada por la enfermedad vascular. Se estima que para detener el proceso aterosclerótico es preciso disminuir la concentración sérica de cLDL al menos en un 40% [21].

Por tanto, la concentración de LDL en plasma es importante, en parte porque aumenta el número de partículas en la íntima arterial, donde son susceptibles a ser modificadas. Las propiedades inflamatorias de las LDL modificadas son objetivo de estudio en la

aterosclerosis. Las LDL modificadas son captadas por receptores *scavenger*, lo que lleva a la formación de células espumosas cargadas de lípidos que se encuentran en la placa aterosclerótica, siendo las más cruciales la LDL oxidada (LDLox) y la LDL mínimamente modificada [22]. Estas primeras son biomarcadores de vulnerabilidad de placa aterosclerótica que se pueden liberar en circulación.

De manera circulante también se encuentra una fracción de LDL con una alta carga negativa que constituye alrededor del 3-5% del total de LDL, la LDL(-), una modificación de la LDL con propiedades inflamatorias observadas en células endoteliales, monocitos y macrófagos [23]. Esta, al igual que la LDLox, también se ha sugerido que puede ser un marcador de vulnerabilidad de placa [24].

### **1.2.2. Lipoproteínas de alta densidad HDL**

Las lipoproteínas de alta densidad HDL no sólo tienen la función del transporte reverso de colesterol, es decir, la movilización del colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado, donde es transformado y excretado en forma de ácidos biliares; sino que además tienen propiedades reparadoras, antioxidantes y antiinflamatorias sobre el proceso de aterosclerosis [25].

La HDL juega un papel central en muchos eventos involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis, y existe una relación inversa entre los niveles de colesterol HDL en plasma y el riesgo cardiovascular [26]. El papel protector de las HDL a menudo se relaciona con su capacidad para promover el transporte inverso de colesterol [27]. Sin embargo, la HDL presenta varias otras propiedades antiaterogénicas [28] como la inhibición de la agregación de la LDL [29] y la oxidación de la LDL, que previenen procesos inflamatorios celulares mediados por fosfolípidos oxidados [30] [31]. Además, la HDL ejerce un efecto protector sobre las células endoteliales y los monocitos [32] ya que inhibe que las células produzcan las moléculas inflamatorias inducidas por las LDL modificadas. Algunos de los efectos protectores de las HDL se han atribuido principalmente a la apolipoproteína (apo) A-I [31] [32], la principal proteína de las HDL. Sin embargo, las actividades enzimáticas asociadas con las HDL, como la paraoxonasa [33] y el factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH) [34], también se han relacionado con su acción ateroprotectora [35].

### **1.3. Biomarcadores inflamatorios**

Cada subtipo de accidente cerebrovascular puede determinar el perfil inflamatorio [36]. Los biomarcadores inflamatorios son especialmente importantes en el subtipo aterotrombótico, donde estos mediadores inflamatorios presentes en la placa pueden ser liberados en circulación. Como resultado, las citoquinas, metaloproteinasas, moléculas de adhesión y receptores celulares, entre otros factores, puede aumentar en circulación y puede ser el objetivo de diagnóstico y evaluación del pronóstico del ictus aterotrombótico [37].

Varios marcadores inflamatorios están aumentados en el ictus isquémico, como la interleucina 6 (IL-6), la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1). Estas son secretadas en la región isquémica por células inmunes activas, que impulsan el proceso inflamatorio y aceleran procesos inflamatorios adicionales al inducir la expresión de moléculas inflamatorias, reclutando así más leucocitos circulantes, que se infiltran en la región isquémica. MCP-1 e IL-6 se encuentran aumentadas en el subtipo aterotrombótico, y se correlacionan con la gravedad, los malos resultados y la recurrencia [38]. La IL-10, una citoquina antiinflamatoria, suele estar disminuida en pacientes con ictus isquémico y se asocia inversamente con el riesgo de ictus y con un resultado precoz [39]. La aparición en plasma de marcadores inflamatorios como consecuencia de presencia de una placa inflamada estaría probablemente relacionada con una mayor presencia de LDLs modificadas en la placa que inducen la mayor respuesta inflamatoria.

En conclusión, se ha observado la importancia de encontrar marcadores de placa inestable, tanto lipídicos como moléculas inflamatorias que permitan seleccionar pacientes candidatos a ser sometidos a PET. Entre estos marcadores podrían estar las lipoproteínas modificadas, como la LDL(-). El objetivo del estudio es determinar las características de la LDL y la HDL en los pacientes que puedan conllevar la generación de LDL modificada.



## **2. Hipótesis y objetivos**

### **2.1. Hipótesis**

Tanto las lipoproteínas como las moléculas inflamatorias están altamente relacionadas en los sucesos de aterosclerosis, y es por esto por lo que pueden estar aumentadas en circulación en el ictus asociado a dicha patología, por lo que es factible su uso futuro como biomarcadores plasmáticos. La LDL modificada podría jugar un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad y nuestra hipótesis es que la susceptibilidad a la modificación de las LDL debería de ser mayor en pacientes con un grado de estenosis elevado que en un grado de estenosis menor y que en controles sanos.

### **2.2. Objetivos**

#### **2.2.1. Objetivo general**

El objetivo general del estudio es evaluar las lipoproteínas LDL y HDL aisladas de pacientes, a nivel de su composición química y sus propiedades aterogénicas, inflamatorias y citotóxicas.

#### **2.2.2. Objetivos específicos**

- Determinar la composición química de las LDL y HDL de los pacientes.
- Cuantificar el porcentaje de la forma modificada LDL(-).
- Estudiar la susceptibilidad a la oxidación de la LDL.
- Evaluar el efecto inflamatorio de las LDL de pacientes sobre un cultivo de macrófagos cuantificando la liberación de citoquinas.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio de las HDL de pacientes sobre la acción inflamatoria de la LDL(-) en un cultivo de macrófagos, mediante la inducción de citoquinas.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Tipo de estudio**

En este estudio se han incluido pacientes que han sufrido un ictus isquémico con presencia de placa aterosclerótica en la carótida interna procedentes del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona entre los años 2015-2018. Los pacientes con ictus isquémico se han dividido en dos grupos para su análisis: pacientes con estenosis carotídea severa (mayor al 50% de la ocupación de la arteria) y pacientes sin estenosis significativa (menor al 50% de ocupación). También se ha incluido un grupo de controles sanos sin accidente cerebrovascular. Cada grupo presenta una  $n = 9$ .

##### **3.1.1. Criterios de inclusión**

Los criterios de inclusión de los pacientes con ictus isquémico y presencia de placa aterosclerótica en la carótida interna son:

- Pacientes mayores de edad con ictus isquémico no más de 7 días.
- Presencia de al menos una placa aterosclerótica, independientemente del grado de estenosis.
- Obtención de consentimiento por escrito del paciente o representante familiar.

Y en el grupo control:

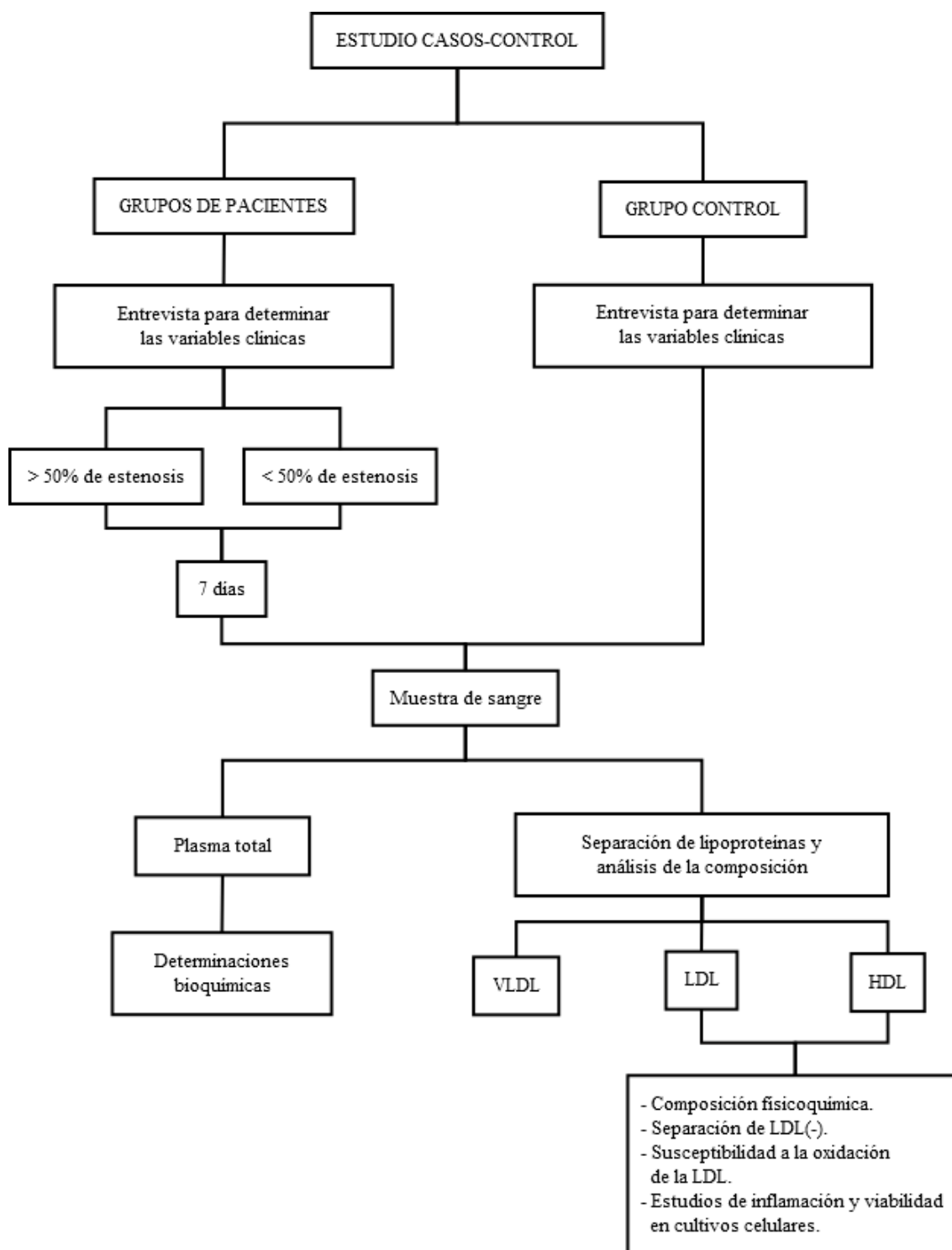
- Género y edad equivalente a los pacientes, que no hayan tenido ictus, valores normolipémicos y normoglicémicos.
- Obtención de consentimiento por escrito del paciente o representante familiar.

##### **3.1.2. Criterios de exclusión**

Los criterios de exclusión seguidos en el estudio son:

- Accidente cerebrovascular posterior.
- Ictus cardioembólico según los criterios TOAST.
- Dependencia funcional después del ictus, índice medido por la escala de Rankin modificada (MRS).
- Endarterectomía previa de la ACI ipsilateral.

### 3.2. Diseño experimental



### 3.3. Obtención de muestras de sangre

Se han recolectado muestras de sangre de los pacientes y de los controles. Concretamente, se han extraído 2 tubos de ensayo Vacutainer de 10 mL, uno con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y uno con SST (tubo separador de suero). Las muestras de plasma y suero obtenidas después de centrifugar se han alicuotado en fracciones de 1 mL y se han guardado a -80°C por tal de ser analizadas en tandas.

### 3.4. Separación de lipoproteínas de *pool*

A partir de una mezcla de sueros de pacientes normolipémicos, denominada *pool*, proveniente de los laboratorios del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, se lleva a cabo la separación de las diferentes lipoproteínas (VLDL, IDL y LDL). Este *pool* se realiza con el objetivo de aislar la LDL y obtener la cantidad necesaria de fracción de LDL(-), que posteriormente se usará como control positivo de inducción de la inflamación en una línea celular de macrófagos.

Se parte de una cantidad de plasma de 250 mL, el cual se filtra para eliminar componentes innecesarios y, una vez filtrado, se disuelve un inhibidor de proteasas para evitar la descomposición proteica. La muestra inicial presenta una densidad de 1,006 g/mL, por lo que hay que ajustarla a la densidad de la lipoproteína que se desea separar: VLDL e IDL (1,019 g/mL), LDL (1,063 g/mL) y HDL (1,210 g/mL) [40]. Para separar la fracción lipoproteica deseada es necesario calcular la cantidad de KBr a añadir mediante la siguiente fórmula [41]:

$$\text{gramos KBr} = \frac{\text{Volumen inicial pool (mL)} \cdot (\text{Densidad final} - \text{Densidad inicial})}{1 - (0,312 \cdot \text{Densidad final})}$$

Como la separación de lipoproteínas se realiza mediante ultracentrifugación secuencial de flotación en función de la densidad de la lipoproteína a aislar, se reparte la muestra en 12 tubos de ultracentrífuga de policarbonato libre de lipopolisacáridos (LPS), agregando la solución de densidad correspondiente (volumen máximo = 20 mL). Las muestras se centrifugan en la Ultracentrífuga Beckman Optimal 90K durante un mínimo de 18 horas para las VLDL y 20 horas para las LDL, ambas a 36.000 rpm. Pasados estos períodos de

tiempo, se recoge el sobrenadante del tubo, que corresponde a la lipoproteína separada, así como el infranadante, en el que se encuentran el resto de las lipoproteínas.

El infranadante se debe de llevar al volumen del *pool* inicial, donde se repite el proceso ya citado anteriormente en el que se realiza el cálculo de los gramos de KBr necesarios, esta vez teniendo presente la densidad de la muestra y la de la nueva lipoproteína a aislar, es decir, la LDL.

### 3.5. Separación de lipoproteínas de pacientes

El aislamiento de lipoproteínas de pacientes sigue el mismo criterio que el de lipoproteínas de *pool*, a excepción de los volúmenes de las muestras. En este caso es de interés aislar las lipoproteínas en las que se centra el estudio, la LDL y la HDL.

Para realizar el procedimiento, se calcula la cantidad necesaria de KBr para llevarlas a la densidad de la lipoproteína que se quiere separar siguiendo la misma fórmula que en el punto anterior, teniendo en cuenta que el volumen final de las muestras es de 2,5 mL. Con los gramos de KBr obtenidos se determina el volumen de solución de densidad de KBr 1,340 g/mL (57,4 g/mL en 117,9 mL de solución de densidad 1,006) que se añaden para el aislamiento de las lipoproteínas.

Para la separación de las lipoproteínas se utilizan tubos de ultracentrífuga, también de policarbonato libre de LPS, a los que se les añade 1 mL de plasma (para el aislamiento de VLDL) o de infranadante (para el aislamiento de LDL y HDL), el volumen de solución de densidad inicial correspondiente y el de solución de densidad 1,340 g/mL (Tabla 1). Los tubos se homogenizan por inversión suave, se equilibran y se centrifugan en las mismas condiciones que las muestras de *pool*. Por último, se recogen los sobrenadantes correspondientes: 400 µL para la VLDL, 600 µL para la LDL y 800 µL para la HDL.

Día	Lipoproteína a separar	Plasma/ infranadante	Solución de densidad KBr 1,340 g/mL	Solución de densidad inicial	Volumen final
1	VLDL + IDL	1 mL	97 µL	1,403 mL de sol. 1,006	2,5 mL
2	LDL	1 mL	338 µL	1,162 mL de sol. 1,019	2,5 mL
3	HDL	1 mL	1212 µL	0,288 mL de sol. 1,063	2,5 mL

**Tabla 1.** Protocolo de aislamiento de lipoproteínas de pacientes.

### **3.6. Composición química de las lipoproteínas**

Para el análisis de la composición de las lipoproteínas obtenidas se utiliza un autoanalizador (Cobas c501) reforzado por métodos inmunturbidimétricos mediante anticuerpos para las apolipoproteínas, y enzimocolorimétricos para el resto de elementos. Para su calibrado, puesta a punto y función son necesarios unos reactivos comerciales de Roche Diagnostics para la determinación de apoB, apoA-I, triglicéridos y colesterol; Wako Biochemicals para fosfolípidos i colesterol libre y Kamiya Biomedicals para apoA-II, apoE i apoC-III.

### **3.7. Diálisis de la muestra por cromatografía de gel filtración**

La fracción de LDL que ha sido recogida con anterioridad del *pool* de plasma de donantes sanos se dializa en tampón A (Tris-HCl 10 mM i EDTA 1 mM a pH 7,4) mediante una membrana semipermeable SnakeSkin de Thermo Scientific. Esta muestra de LDL se deja a 4°C para, posteriormente, separar la LDL(-).

En cuanto a las muestras de LDL provenientes de los pacientes de estudio, se dializan mediante las columnas PD10 de GE Healthcare con resina Saphadex G-25 (separación por cromatografía en gel filtración) con tampón A, para después someter las muestras a una cromatografía líquida. Una vez realizado dicho proceso, se dializan esta vez con tampón fosfato salino (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O) y 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 7,4) con el fin de eliminar restos de KBr y EDTA usados durante el proceso de separación de lipoproteínas, evitando así su interferencia en análisis posteriores.

### **3.8. Cromatografía líquida (AKTA-FPLC)**

Para la separación de LDL y cuantificación de los porcentajes de LDL(-) y LDL(+) que contiene una muestra de LDL se usa un sistema de cromatografía líquida AKTA-FPLC de Amerham Pharmacia Biotech, donde los cálculos se obtienen mediante la integración de los picos de absorción a 280 nm. Las columnas utilizadas en el estudio son la Q Sepharosa<sup>TM</sup> HP 26/10, para la separación de LDL(-) perteneciente a la LDL de *pool*, y la MonoQ<sup>TM</sup> 5/50 GL con la que se cuantifican las muestras de pacientes, ambas de GE Healthcare. Estas dos columnas son de intercambio aniónico, de manera que contienen una resina cargada positivamente. Para el correcto funcionamiento del sistema se

necesitan dos soluciones tampón: el tampón A, como tampón de unión a la columna y el tampón B (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM i NaCl 1M a pH 7,4) como tampón de elución. La LDL(+) eluye al 24,5% de Tampón B, que corresponde a una conductividad de 24,5-25,9 mS/cm; y la LDL(-) eluye al 60% de Tampón B, que en este caso corresponde a una conductividad de 56,7-57,10 mS/cm.

### **3.9. Susceptibilidad a la oxidación de la LDL**

Una de las primeras moléculas que aparecen durante la oxidación lipídica son los dienos conjugados. Su monitorización permite cuantificar la susceptibilidad a la oxidación de la LDL de forma in vitro.

Para esta técnica se utiliza una placa de 96 pocillos para ultravioletado, PBS, las LDL de los pacientes y el agente oxidante ( $\text{CuSO}_4$ ). Es muy importante que las LDL de los pacientes estén bien dializadas en PBS para poder realizar esta técnica, ya que, si queda algo de EDTA, aunque se añada  $\text{CuSO}_4$  para que se oxiden, este no podrá actuar. Las LDL de los pacientes se igualan con PBS a una concentración de 62,5 mg/L de apoB en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ /pozo. Finalmente, se añade el  $\text{CuSO}_4$  a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$  en cada pozo y se realiza la monitorización de la cinética a 234 nm durante 4 h a 37°C en el espectrofotómetro Synergy HT de Biotek. La susceptibilidad a la oxidación de las LDL se determina a partir del tiempo de latencia (Tlat) en minutos.

### **3.10. Cultivos celulares**

Para la evaluación del efecto inflamatorio de las LDL y el antiinflamatorio de las HDL de los pacientes de estudio en contraposición con los controles, se trabaja con una línea celular llamada THP1-XBlue<sup>TM</sup>-MD2-CD14 de InvivoGen, que derivan de las THP-1, que corresponden a monocitos humanos, y son utilizadas para estudios de viabilidad celular e inflamación. Este tipo celular sobreexpresa el receptor CD14, el cual media la unión a las LDL(-) y la liberación de citoquinas inducida por la LDL(-).

El mantenimiento de esta línea celular se realiza con medio completo, es decir, con RPMI 1640 suplementado con el 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina y estreptomicina (P/S) y los antibióticos selectivos Normocina<sup>TM</sup> (50 mg/mL), Zeocina<sup>TM</sup> (100 mg/mL) i G418 (100 mg/mL), que inhiben el crecimiento de aquellas células en

cultivo que no sobreexpresan el receptor CD14. Además, se mantienen en incubación a 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub> y al 95% de humedad relativa.

Las THP1-CD14 crecen en suspensión, y se mantienen a una densidad celular entre  $5 \cdot 10^5$  –  $2 \cdot 10^6$  células/mL. Durante días alternos se realiza el mantenimiento, que consiste en la adición de medio o, cuando aumenta la densidad celular, centrifugar las células durante 5 minutos a 1.500 rpm y monitorizar su crecimiento mediante microscopía óptica y conteo de células en la cámara de Neubauer. Este procedimiento se realiza con el objetivo de realizar subcultivos para permitir el continuo crecimiento celular.

### **3.10.1. Obtención e incubación de macrófagos con estímulos**

Para la posterior obtención de macrófagos y cultivo de éstos con las muestras de estudio, se realiza una siembra celular en placas de 12 pozos con una densidad celular cada una de unas 400.000 células/pozo con 1 mL de medio completo más 50 ng/mL de PMA (éster de forbol) durante 24 horas para obtener las células diferenciadas en macrófagos. Pasado este período de tiempo se vuelven a monitorizar las células de las placas para observar su estado. Si se han diferenciado correctamente se desecha el medio completo que contienen para añadirle los estímulos. Las condiciones de inducción son: Blanco (medio sin estímulo), LDL(-) proveniente de *pool* sola, HDL de pacientes sola, LDL de pacientes sola y LDL(-) más HDL de pacientes, dializadas previamente en PBS y filtradas para estar en condiciones estériles. Se realiza la placa con un volumen final en cada pozo de 800 µL para las HDL y de 500 µL para las LDL en medio deficiente (RPMI suplementado con un 1% de FBS y 1% de P/S). Dichos cálculos se han realizado a partir de las concentraciones de apoB y apoA-I obtenidas en las etapas anteriores. Seguidamente, se incuba durante 24 horas, y, pasado este período de tiempo, se recogen los sobrenadantes, se centrifugan durante 10 minutos a 2.000 rpm para eliminar componentes celulares sobrantes y se conservan a -80°C para el estudio posterior de citoquinas. Para la subsiguiente cuantificación de proteína mediante BCA, se les añade NaOH a las placas con el fin de obtener la proteína de las células.

### **3.11. Cuantificación de proteína (BCA)**

Para cuantificar la concentración de proteína total presente en las muestras aisladas previamente, se realiza un ensayo con ácido bicinónico, facilitado por el kit comercial Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay, en una placa de 96 pocillos siguiendo



las instrucciones del fabricante y realizando una lectura final a 570 nm en el lector de placas Beckman AD340.

### **3.12. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)**

En referencia a la determinación de la capacidad inflamatoria de las LDL y antiinflamatoria de las HDL, a partir de los sobrenadantes celulares obtenidos previamente se miden diversos biomarcadores inflamatorios, así como la IL-6 (de eBioscience), IL-1 $\beta$  (de Diaclone), MCP-1 e IL-10 (ambos de Invitrogen). Esta cuantificación se hace mediante kits comerciales de ELISA de tipo *sandwich* siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realiza una lectura final en el lector de placas Beckman AD340 a 450 nm.

### **3.13. Análisis estadístico**

Para realizar el análisis estadístico de los resultados se ha utilizado el software *GraphPad Prism 8.0.2*. Puesto que el número de pacientes estudiados es reducido ( $n = 9$  por cada caso) se deben realizar pruebas no paramétricas, más robustas respecto a las pruebas paramétricas ya que al requerir menos condiciones de validez, son válidas en más situaciones. Como las muestras no son pareadas se utiliza la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar los grupos de pacientes entre ellos y estos con el grupo control (dos a dos). Se consideran significativos los valores de  $P < 0,05$ . Todos los datos están expresados como mediana  $\pm$  desviación estándar (SD).

### **3.14. Consideraciones éticas**

El estudio se ha llevado a cabo en estricta conformidad con las directrices éticas internacionales para la investigación médica en seres humanos. Los investigadores han sido responsables de garantizar que el estudio se ha realizado de acuerdo con los estándares contenidos en la Declaración de Helsinki y ley española. Antes de iniciar el proyecto, el Comité de Protección de Sujetos Humanos (CEIC) ha aprobado el protocolo del estudio y se ha garantizado la entrega de información al sujeto, así como el modelo de consentimiento informado a utilizar. Todos los participantes han sido incluidos después de obtener el consentimiento informado por escrito. Antes de incluir cualquier tema en el estudio, el investigador ha informado al participante de los objetivos y métodos de este o de cualquier inconveniente que esto pueda ocasionar.

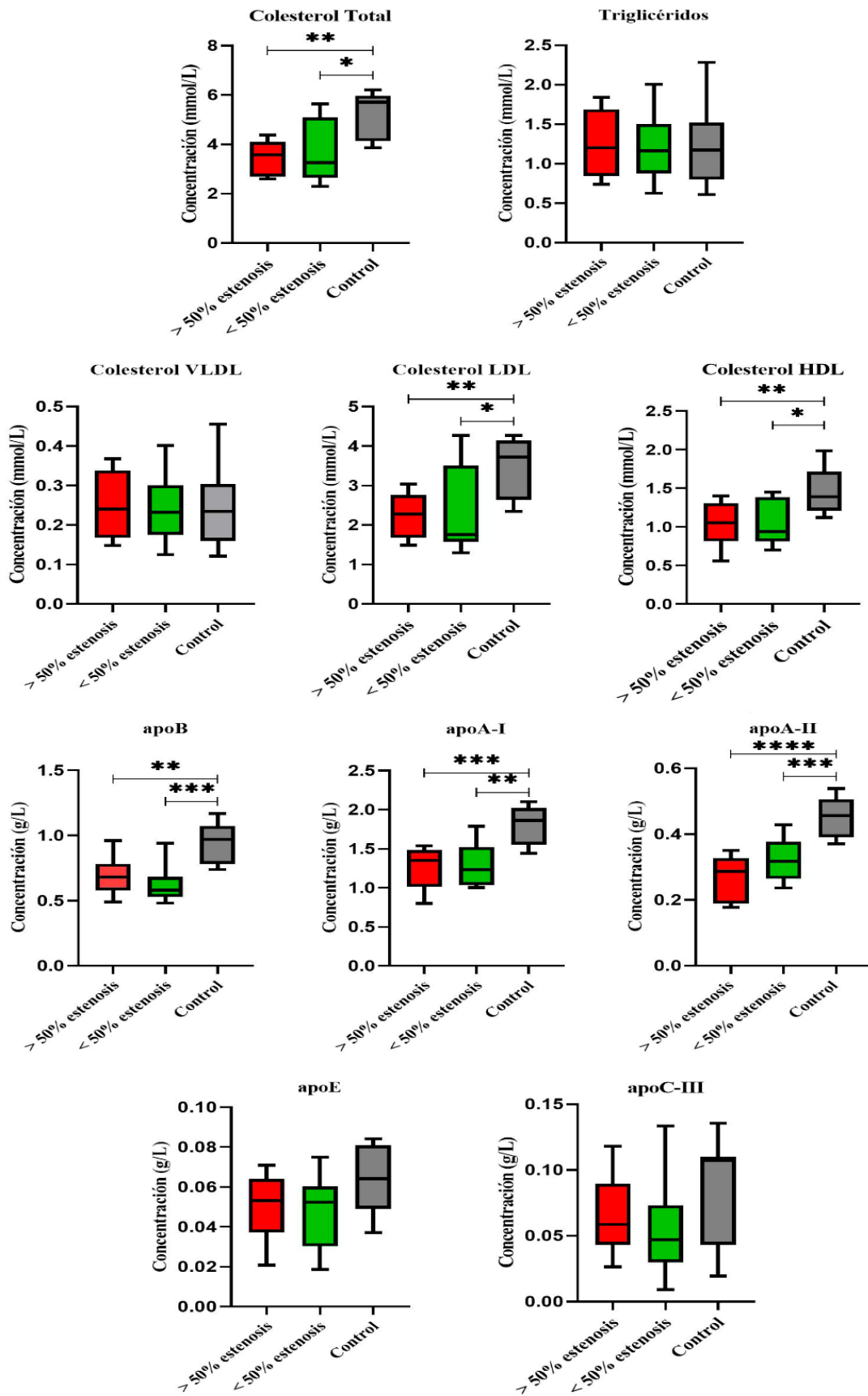
## 4. Resultados

### 4.1. Características de la población

En este estudio se han incluido 9 pacientes en el grupo de estenosis superior al 50%, 9 en el de estenosis inferior al 50% y 9 en el grupo control. Las variables antropométricas de los pacientes, así como las de los controles, se encuentran detalladas en la Tabla 2.

		>50% de estenosis (n=9)	<50% de estenosis (n=9)	Control (n=9)
<i>Características</i>	<b>Edad (años)</b>	76,67 ± 10,17	73,89 ± 8,88	71,11 ± 2,421
	<b>Peso (kg)</b>	72,13 ± 16,28	73,27 ± 7,227	71,56 ± 8,921
	<b>Altura (m)</b>	1,668 ± 0,1067	1,689 ± 0,05862	1,624 ± 0,07828
	<b>IMC</b>	26,09 ± 3,21	25,63 ± 2,426	27,13 ± 3,148
	<b>% Hombres / mujeres</b>	33/67	11/89	44/56
<i>Medicación previa</i>	<b>% Ictus isquémico previo</b>	33	0	0
	<b>% Antiagregantes</b>	55,56	44,44	0
	<b>% Estatinas</b>	66,67	44,44	22,22

**Tabla 2. Variables clínicas de la población de estudio.** Los datos están representados con la mediana ± SD.



**Figura 4. Perfil lipídico de los tres grupos incluidos en el estudio.** Los gráficos muestran la concentración de los componentes mayoritarios (colesterol total, triglicéridos, colesterol VLDL, LDL y HDL) y de los minoritarios (apoE, apoB, apoA-I, apoA-II y apoC-III). Los datos están representados con diagramas de caja. \* indica  $P \leq 0.05$ ; \*\* indica  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* indica  $P \leq 0.001$  y \*\*\*\* indica  $P \leq 0.0001$ .

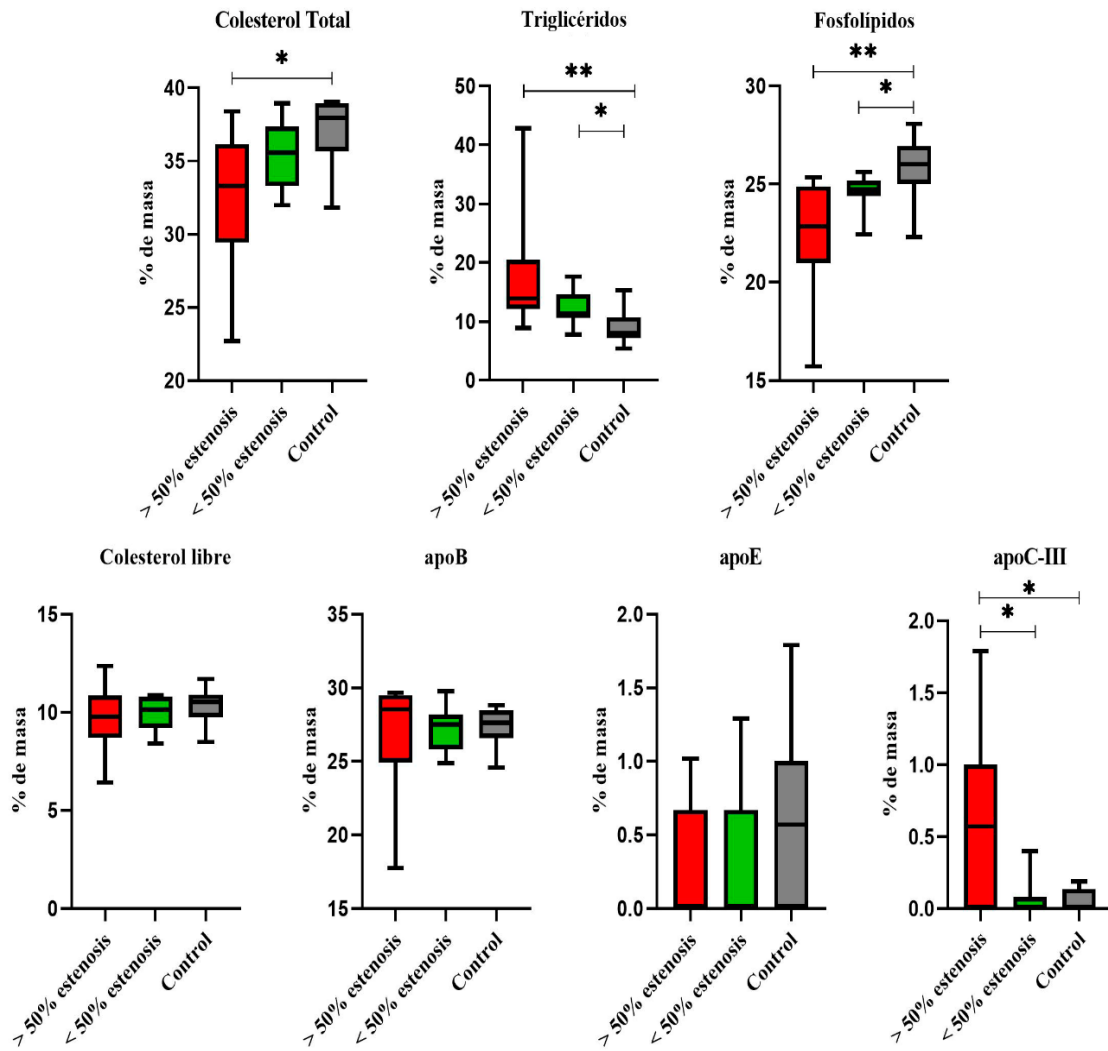
En referencia al perfil lipídico (obtenido por autoanalizador Cobas c501) representado en la Figura 4, se observa que existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los dos grupos de estudio (estenosis severa y no significativa) versus el grupo control en cuanto a los niveles de CT, lo cual parece debido al descenso significativo en los niveles de cLDL y cHDL, pero no a los de cVLDL. Lo mismo ocurre a nivel de apoB (la apolipoproteína propia de la LDL), y de apoA-I y apoA-II (las propias de HDL), donde se encuentran las mismas diferencias entre los grupos. Cabe destacar que el descenso es menor en los de mayor grado de estenosis. Sin embargo, no se observan cambios en los niveles de TG ni en los de apoCIII ni apoE.

#### **4.2. Composición de las LDL**

Los componentes principales de las LDL, incluyendo los lípidos y las apolipoproteínas, se encuentran representados en la Figura 5.

En cuanto a los niveles de CT se observa una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo que presenta una estenosis superior al 50%, mientras que en referencia a los niveles de TG, los de los pacientes tienden a ser aumentados en contraste con el grupo control, al revés que el porcentaje de masa de fosfolípidos, donde el grupo control sufre un aumento de estos mostrando diferencias versus el grupo  $> 50\%$  de estenosis y el grupo  $< 50\%$  de estenosis. Por lo que respecta a los niveles de colesterol libre no se observan diferencias significativas entre los diversos grupos de estudio.

En el caso de las apolipoproteínas tampoco se observan dichas diferencias entre los grupos en cuanto a niveles de apoB y apoE, pero sí se observan en los de apoC-III, viéndose el grupo que presenta una estenosis severa ( $> 50\%$ ) incrementado respecto los demás grupos.

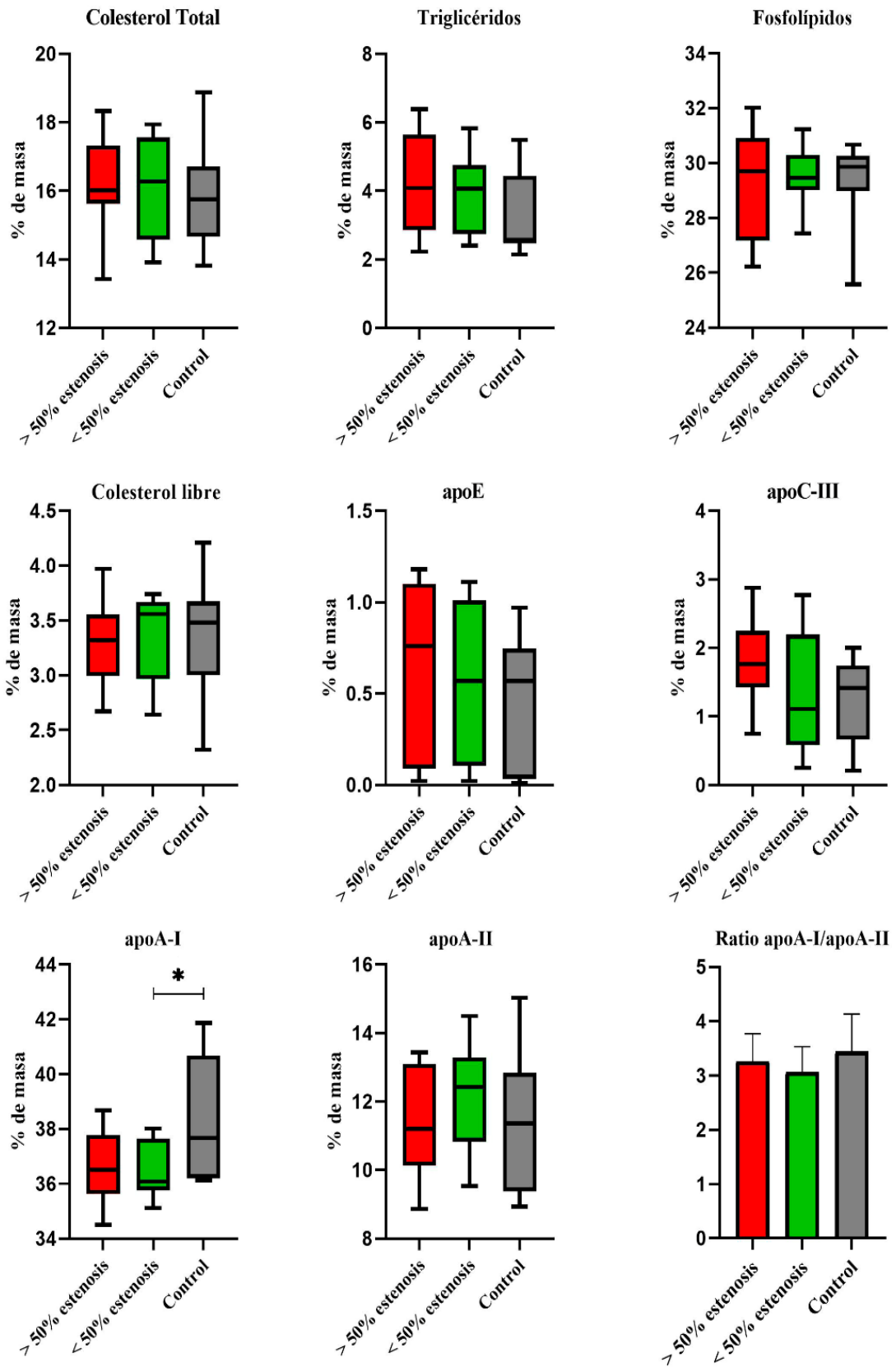


**Figura 5. Composición química de las LDL de los grupos de estudio.** Los gráficos muestran el porcentaje en masa de los componentes lipídicos y apolipoproteicos. Los datos están representados en diagramas de caja. \* indica  $P \leq 0,05$ ; \*\* indica  $P \leq 0,01$ .

### 4.3. Composición de las HDL

En referencia a los niveles de los componentes de las lipoproteínas HDL, representados en la Figura 6, no se encuentran diferencias significativas entre los tres grupos, a excepción de la que hay presente en cuanto a la apoA-I, pues hay un incremento importante de los niveles de esta en el grupo control.

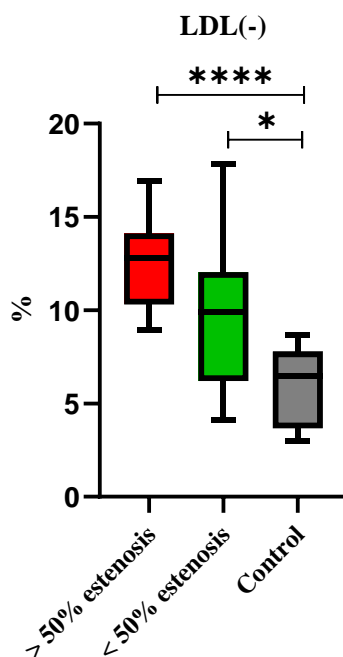
Por lo que concierne al ratio apoA-I/apoAII, tiene tendencia a ser mayor el ratio en los controles.



**Figura 6. Composición química de las HDL de los grupos de estudio.** Los gráficos muestran el porcentaje en masa de los componentes lipídicos y apolipoproteicos. Los datos están representados en diagramas de caja. \* indica  $P \leq 0,05$ .

#### 4.4. LDL electronegativa

Se ha evaluado el porcentaje de LDL(-) para estudiar si los pacientes tienen incrementada esta LDL modificada con características aterogénicas, pues tal y como indica la bibliografía utilizada, se ha observado que las LDL de pacientes con presencia de placa aterotrombótica son más susceptibles a sufrir modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de estas.



**Figura 7. Porcentaje de fracción de LDL electronegativa en los grupos de estudio.** El gráfico muestra el porcentaje de LDL(-). Los datos están representados en diagramas de caja. \* indica  $P \leq 0,05$ ; \*\*\*\*\* indica  $P \leq 0,0001$ .

En la Figura 7 se puede observar que el grupo de estenosis mayor al 50% presenta grandes diferencias respecto al grupo control, así como el grupo de estenosis menor al 50%, que también las presenta.

#### 4.5. Susceptibilidad a la oxidación de la LDL

En la Figura 8 están representados los Tlat de las LDL de los pacientes de los diversos grupos analizados. Este tiempo de latencia es mayor cuando la partícula se oxida más tarde, es decir, es más resistente a la oxidación in vitro. Se puede observar un menor tiempo de oxidación en el grupo de estenosis > 50%, significativo respecto al del grupo control ( $P = 0,0244$ ), pues este presenta un tiempo más elevado. Esto implica que las partículas de LDL de los pacientes que han sufrido ictus isquémico con una placa que ocupa más del 50% de la carótida presentan una mayor tendencia a la oxidación que las

LDL de los controles, sin presentar diferencias significativas respecto al segundo grupo de estudio.

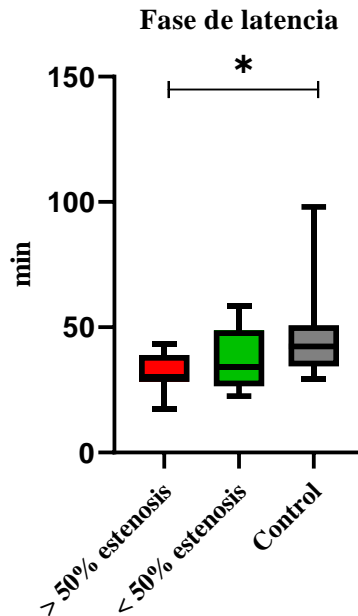
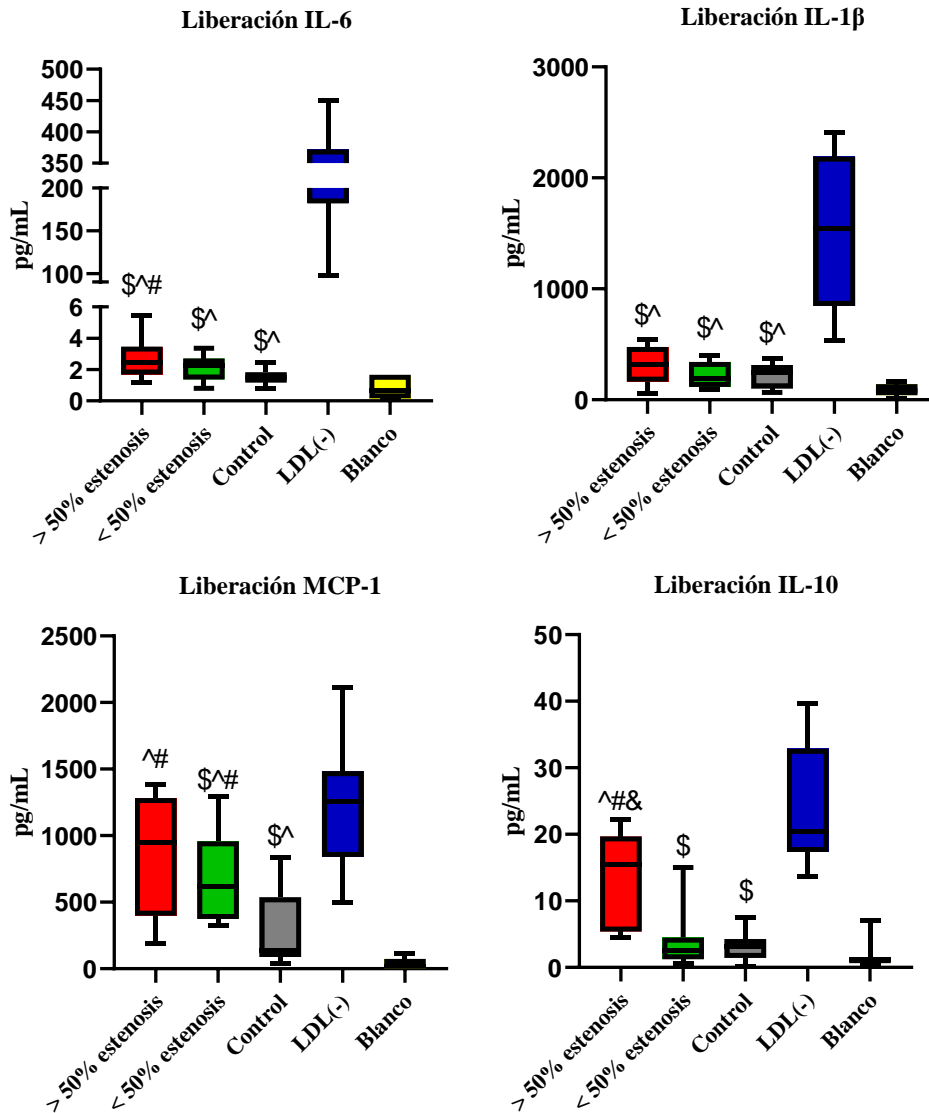


Figura 8. Susceptibilidad de la LDL a la oxidación. El gráfico muestra el Tlat en minutos. Los datos están representados en diagramas de caja. \* indica  $P \leq 0,05$ .

#### 4.6. Cuantificación de biomarcadores inflamatorios IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1 e IL-10

Para determinar y cuantificar la capacidad inflamatoria de las LDL así como la antiinflamatoria de las HDL de cada grupo de estudio, después de la incubación con el cultivo de macrófagos, se mide la concentración de los biomarcadores inflamatorios IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1 y del biomarcador antiinflamatorio IL-10. Los resultados de la cuantificación están representados en la Figura 9. Cabe mencionar que todos los datos están relativizados por proteína calculada mediante BCA.





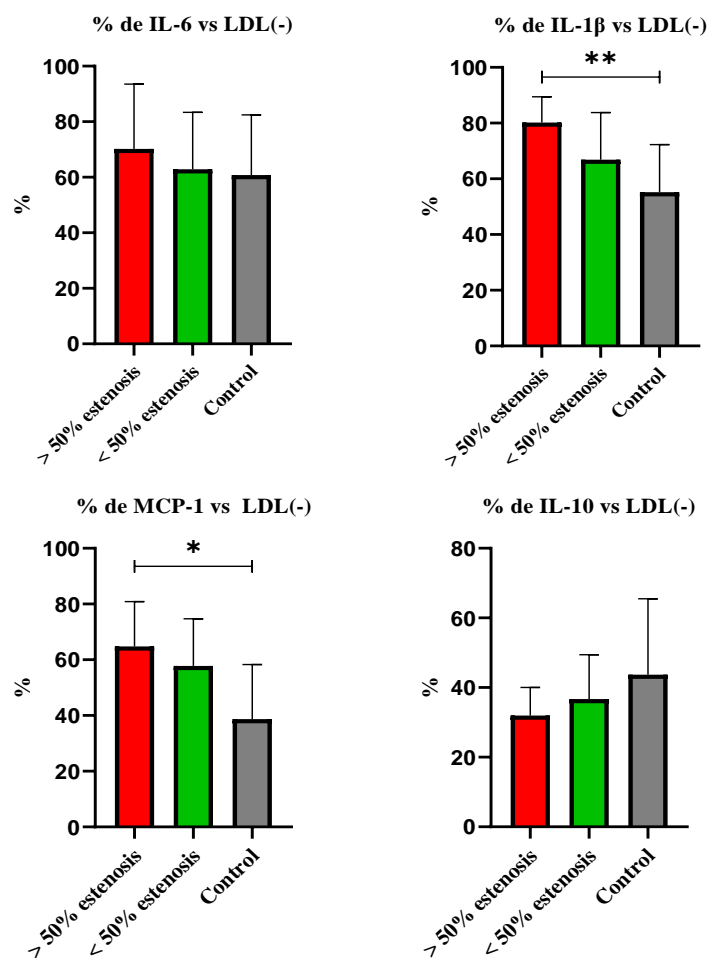
**Figura 9. Cuantificación de los biomarcadores inflamatorios IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1 e IL-10.** El gráfico muestra las concentraciones de los diferentes biomarcadores en pg/mL. Los datos están representados en diagramas de cajas. \$ y ^ indican  $P \leq 0,05$  versus a la LDL(-) y el blanco, respectivamente. # indica  $P \leq 0,05$  respecto al grupo control. & indica  $P \leq 0,05$  respecto al grupo < 50% estenosis. Todos los datos están relativizados por proteína calculada mediante BCA.

En cuanto a los niveles de IL-6, se pueden destacar las diferencias que presenta el grupo con mayor estenosis respecto a la LDL(-) ( $P < 0,0001$ ), que actúa como control positivo del análisis; respecto al blanco ( $P = 0,0012$ ), que permite saber la concentración de citoquinas características de estudio liberadas por los monocitos en estado basal (en ausencia de LDL); y respecto al grupo control ( $P = 0,04$ ). Por lo que hace a los dos grupos de estudio restantes (grupo con menor estenosis y grupo control), también presentan diferencias respecto a los valores de los controles tanto positivo ( $P < 0,0001$  para ambos) como negativo para biomarcadores inflamatorios ( $P = 0,0055$  y  $P = 0,0383$ ).

respectivamente). Esto también ocurre en la cuantificación de IL-1 $\beta$ , donde los tres grupos presentan diferencias en comparación con la LDL(-) y el blanco ( $P < 0,05$ ).

Por lo que respecta a los valores de MCP-1, se puede observar que el primer grupo muestra diferencias respecto el blanco ( $P < 0,0001$ ) y el grupo control ( $P = 0,0039$ ), pero no respecto los valores de LDL(-). El segundo grupo (estenosis menor al 50%), en cambio, sí las presenta tanto versus el grupo control ( $P = 0,0137$ ), la LDL(-) ( $P = 0,0005$ ) y el blanco ( $P < 0,0001$ ) así como el grupo control, donde también se encuentran diferencias respecto a los controles de liberación de citoquinas ( $P < 0,05$ ).

Finalmente, observando las concentraciones en base a la citoquina antiinflamatoria IL-10, se obtienen valores elevados en el caso del grupo de mayor estenosis, valores significativos respecto al blanco ( $P = 0,0003$ ), al grupo con menor estenosis ( $P = 0,0008$ ) y al grupo control ( $P = 0,0005$ ). Estos dos últimos sólo presentan diferencias significativas respecto a la LDL(-) y al blanco ( $P < 0,05$ ).



**Figura 10. Porcentaje correspondiente a las citoquinas liberadas respecto a la LDL(-) sola.** El gráfico muestra la acción protectora de la HDL. Los datos están representados con la mediana  $\pm$  SD. \* indica  $P \leq 0,05$ . \*\* indica  $P \leq 0,01$ .

En referencia a la acción protectora de las HDL, en las diversas situaciones de estudio presentadas respecto a las liberadas por la LDL(-)pool en ausencia de HDL (calculada mediante la fórmula expuesta), se observa un porcentaje mayor de citoquinas liberadas en el grupo de estenosis superior al 50% en los casos de las interleucinas inflamatorias, presentando desigualdades respecto al grupo control en el análisis de IL-1 $\beta$  ( $P = 0,0019$ ) y MCP-1 ( $P = 0,0106$ ). Una mayor liberación de citoquinas corresponde a una menor acción protectora de la HDL correspondiente, por lo que el primer grupo ya mencionado presenta unas lipoproteínas de alta densidad menos protectoras, seguidas por las del grupo de estenosis < 50% y, finalmente, las del grupo control, siendo estas las más protectoras.

$$\% \text{ acción antiinflamatoria HDL} = \frac{((LDL(-)pool + HDLpaciente) - HDLpaciente) \cdot 100}{LDL(-)pool}$$

En cuanto al porcentaje correspondiente de IL-10, se distingue una menor presencia de citoquinas antiinflamatorias en los grupos que presentan estenosis en la arteria carótida.

## 5. Discusión

La mayoría de los estudios epidemiológicos han encontrado una relación directa entre el accidente cerebrovascular y los lípidos, especialmente en aterosclerosis de grandes arterias [42]. Los niveles de colesterol total y de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) se han asociado con accidente cerebrovascular isquémico. En el caso de LDL, la presencia de partículas LDL pequeñas y densas se ven incrementadas después del ictus isquémico por aterosclerosis carotídea [43].

En este trabajo se ha estudiado las propiedades fisicoquímicas de la LDL y HDL de los pacientes que han sufrido ictus isquémico causado por aterosclerosis, proceso complejo en el que intervienen diversos factores.

Los resultados obtenidos en cuanto al estudio del perfil lipídico de los grupos de estudio muestran niveles elevados de colesterol total, colesterol LDL y HDL en los controles comparados con los grupos con estenosis. Este hecho se puede relacionar con los datos correspondientes a las variables clínicas, donde se muestra el porcentaje de pacientes que tenían un tratamiento previo de estatinas y antiagregantes, que es mayor en el grupo de estudio de estenosis superior al 50% (cabe destacar que en el momento del ictus también se les administra estatinas), siendo las más administradas atorvastatina y simvastatina, que actúan inhibiendo la HMG-CoA reductasa, enzima que limita la biosíntesis del colesterol e inhibiendo la síntesis de este en el hígado. Su inhibición implica un aumento en el número de receptores de LDL en las células, acto que conlleva a la disminución de los niveles plasmáticos de CT y cLDL. Es necesario añadir que las estatinas tienen efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antitrombóticos asociados a su acción sobre las proteínas G [44]. El menor nivel plasmático de CT en los pacientes parece debido a un descenso de las LDL y HDL, no en las VLDL, ya que el cVLDL no difirió del de controles, así como tampoco los TG. En cuanto a las lipoproteínas analizadas, podemos relacionar los niveles de apoB obtenidos con la explicación anterior, pues una disminución en las partículas de LDL comporta una disminución en su apolipoproteína constituyente principal. Lo mismo ocurre respecto a los niveles presentes de apoA-I y apoA-II, pues este primero es el constituyente proteico mayoritario de la HDL, encontrándose también en quilomicrones. Su función principal es el transporte reverso de colesterol, por vía dependiente e independiente de receptores, y a través de la activación de la LCAT. En cuanto a la apoA-II, en estudios con ratones y seres humanos, los niveles

de esta apolipoproteína se han asociado con una mayor susceptibilidad a la aterosclerosis, niveles aumentados de ácidos grasos libres y aumento de la grasa corporal [45].

Haciendo hincapié en la composición de la LDL, el hecho de que los pacientes presenten niveles inferiores de CT y fosfolípidos y niveles superiores de TG conduce a que estos presentan unas partículas LDL con una composición lipídica alterada que puede conllevar a diferencias estructurales y funcionales. Esta alteración de la composición de las LDL de los pacientes puede deberse a que provengan de VLDL con características también alteradas, o bien sean LDL modificadas liberadas de la placa de aterosclerosis.

En referencia a la composición realizada sobre las lipoproteínas HDL, es necesario destacar los niveles de apoA-I disminuidos en los pacientes. Esto puede contribuir al descenso de apoA-I observado en plasma. El ratio apoA-I/apoA-II está disminuido en pacientes, y como se ha comentado, a la apoA-I se le han atribuido funciones protectoras, al contrario que a la apoA-II. Esto sugiere que la HDL de los pacientes puede presentar una funcionalidad alterada. Estos resultados tienen sentido, ya que bajos niveles de estas HDL se asocian con un incremento en la incidencia de aterotrombosis [46]. Este hecho da lugar al estudio de posibles dianas terapéuticas para incrementar los niveles de HDL circulantes o para mejorar su composición y, por tanto, su funcionalidad.

Durante la observación de las modificaciones de las LDL mediante el análisis de sus fracciones electronegativas, se han obtenido unos resultados acordes a los esperados [24], pues se observan niveles de LDL(-) elevados en los grupos que han sufrido ictus isquémico causados por aterosclerosis, sobre todo en el grupo de estenosis mayor al 50%. Como bien queda demostrado en la bibliografía facilitada, se ha expuesto que, a parte de la presencia en circulación de LDL oxidada, la fracción electronegativa también tiene propiedades inflamatorias [16]. Como se ha citado anteriormente, la obtención de una mayor fracción de LDL(-) en pacientes concuerda con la hipótesis de que las LDL de los pacientes presentan una mayor tendencia a tener características lipídicas modificadas respecto las de los controles. En conjunto, los resultados hacen ver que la LDL de los pacientes podría ser más susceptible a sufrir alteraciones y tener propiedades aterogénicas.

Esto último se puede corroborar con los resultados de la susceptibilidad que las LDL de los pacientes presentan a la oxidación, en las que el grupo esperado (el de estenosis mayor al 50%) ha resultado tener una Tlat inferior respecto al grupo control (menor Tlat indica

un rápido proceso de oxidación). En los procesos anteriores se han obtenido, por parte de este mismo grupo de estudio, mayor concentración de LDL(-) y LDL con composición lipídica alterada, hecho que ha sido correlacionado con los resultados de la oxidación, pues diversos estudios han corroborado que las LDL que sufren modificaciones tienden a ser más susceptibles a dicho proceso oxidativo [47]. Como se ha indicado anteriormente, la LDLox junto con la LDL(-) son biomarcadores de vulnerabilidad de placa.

La lipoproteína de baja densidad (LDL), principalmente la modificada por oxidación u otros procesos, promueve una respuesta inflamatoria en células de la pared arterial, desempeñando así un papel clave en la progresión de la aterosclerosis. Por el contrario, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son antiaterogénicas, en parte al contrarrestar las propiedades aterogénicas de la LDL modificada. Según estudios realizados, las propiedades cualitativas de la LDL y la HDL pueden verse alteradas en episodios aterotrombóticos, y tales alteraciones pueden determinar el estado inflamatorio de los pacientes y contribuir a la aparición y recurrencia del ictus. El desequilibrio entre la función proinflamatoria y antiinflamatoria de las lipoproteínas podrían conducir a una mayor respuesta inflamatoria de los macrófagos y correlacionarse con la inflamación evaluada por PET.

En relación con la explicación anterior, las fracciones electronegativas de LDL tienen como principal acción inflamatoria inducir la liberación de citoquinas por parte de los monocitos [48]. Los resultados obtenidos en cuanto a la cuantificación de citoquinas inducida por la LDL total de los grupos de estudio permiten la observación de los elevados niveles de estas encontradas en el grupo con estenosis mayor al 50%, aunque en el análisis de la MCP-1 también se pueden ver diferencias en el grupo de estenosis menor al 50%. Este hecho podría ser consecuencia de los niveles elevados de LDL(-) en los grupos de estudio en comparación con los de los controles, por lo que es acertado el resultado obtenido. Se ha examinado a su vez la capacidad protectora de las HDL en relación a respuestas inflamatorias, indicando una acción antiinflamatoria en las muestras que contenían LDL(-)pool con las HDL de pacientes, sobre todo en las del grupo control, la cual es menor en los pacientes, indicando que tienen una HDL menos protectora. Finalmente, respecto a la IL-10, cabe decir que lo esperado, según la bibliografía consultada, sería esperar bajos niveles de esta interleucina. Sin embargo, dados los resultados, se observa incrementada en el grupo de mayor estenosis. Esto podría ser

debido a que aumenta la acción de moléculas antiinflamatorias para evitar daños y mantener el equilibrio.

En conjunto, los resultados muestran que, en pacientes de ictus isquémico aterotrombótico, y sobre todo los de alta estenosis, presentan un perfil lipídico diferente, y tanto la LDL como la HDL presentan diferencias composicionales y funcionales que pueden contribuir al desarrollo de la patología.

## **6. Conclusiones**

- Los pacientes pertenecientes a los grupos de estudio presentan niveles inferiores de colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL respecto a los del grupo control debido principalmente al tratamiento con estatinas.
- Los grupos de estudio presentan unas partículas LDL con una composición lipídica alterada en comparación con las del grupo control.
- Los pacientes con presencia de placa aterosclerótica presentan un mayor porcentaje de LDL(-). Conforme aumenta el grado de estenosis, se incrementan estos niveles de LDL(-).
- Las partículas de LDL de los pacientes con estenosis severa son más susceptibles a ser oxidadas.
- Las LDL de los pacientes tienen mayor capacidad inflamatoria sobre macrófagos en cultivos.
- Las HDL de los pacientes tienen menor proporción de apoA-I/apoA-II y menor capacidad antiinflamatoria.

### **6.1. Limitaciones y mejoras para realizar en proyectos futuros**

Para poder obtener resultados más sólidos y concluyentes sería necesario incrementar el número de casos de estudio, la “n”, ya que las muestras analizadas para la realización de este trabajo han sido escasas y solamente se han podido observar leves tendencias. Además, sería indispensable relacionar los resultados obtenidos del estudio con diversas técnicas, así como los resultados de imagen obtenidos por el ya mencionado PET. También cabe destacar que sería necesario realizar otras técnicas experimentales correlacionadas con el estudio, así como el análisis de las ya mencionadas actividades enzimáticas asociadas con las HDL, como la paraoxonasa [33] y el factor activador de plaquetas acetilhidrolasa (PAF-AH) [34].



## 7. Bibliografía

- [1] C. O. Johnson et al., «Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016», *Lancet Neurol.*, vol. 18, n.o 5, pp. 439-458, may 2019, doi: 10.1016/S1474-4422(19)30034-1.
- [2] «¿Qué es un ictus? | PortalCLÍNICA», Clínic Barcelona.
- [3] T. D. Musuka, S. B. Wilton, M. Traboulsi, y M. D. Hill, «Diagnosis and management of acute ischemic stroke: speed is critical», *Can. Med. Assoc. J.*, vol. 187, n.o 12, pp. 887-893, sep. 2015, doi: 10.1503/cmaj.140355.
- [4] J. R. Shiber, E. Fontane, y A. Adewale, «Stroke registry: hemorrhagic vs ischemic strokes», *Am. J. Emerg. Med.*, vol. 28, n.o 3, pp. 331-333, mar. 2010, doi: 10.1016/j.ajem.2008.10.026.
- [5] M. Alonso de Leciana et al., «Guía para el tratamiento del infarto cerebral agudo», *Neurología*, vol. 29, n.o 2, pp. 102-122, mar. 2014, doi: 10.1016/j.nrl.2011.09.012.
- [6] «Cirugías y procedimientos para la aterosclerosis», *News-Medical.net*, jul. 14, 2009.
- [7] J. H. F. Rudd et al., «Imaging Atherosclerotic Plaque Inflammation With [ 18 F]-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography», *Circulation*, vol. 105, n.o 23, pp. 2708-2711, jun. 2002, doi: 10.1161/01.CIR.0000020548.60110.76.
- [8] «Detección de la inflamación vascular en la aterosclerosis subclínica mediante PET / RM», *SAC | Sociedad Argentina de Cardiología*, may 20, 2019.
- [9] E. J. Benjamin et al., «Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association», *Circulation*, vol. 139, n.o 10, mar. 2019, doi: 10.1161/CIR.0000000000000659.
- [10] J. Y. Chong, «Accidente cerebrovascular isquémico», p. 13.
- [11] C. K. Glass y J. L. Witztum, «Atherosclerosis: The Road Ahead», *Cell*, vol. 104, n.o 4, pp. 503-516, feb. 2001, doi: 10.1016/S0092-8674(01)00238-0.
- [12] A. Upadhye, J. M. Sturek, y C. A. McNamara, «2019 Russell Ross Memorial Lecture in Vascular Biology: B Lymphocyte–Mediated Protective Immunity in Atherosclerosis», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 40, n.o 2, pp. 309-322, feb. 2020, doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313064.
- [13] Z. Hu et al., «Efectos antiaterogénicos de la inhibición de la expresión de MCP-1 mediada por ARNi», *An. Cir. Vasc.*, vol. 23, n.o 5, pp. 719-729, sep. 2009, doi: 10.1016/j.acvsp.2009.11.016.
- [14] Bentzon Jacob Fog, Otsuka Fumiyuki, Virmani Renu, y Falk Erling, «Mechanisms of Plaque Formation and Rupture», *Circ. Res.*, vol. 114, n.o 12, pp. 1852-1866, jun. 2014, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.
- [15] V. Llorente y L. Badimon, «Bases celulares y moleculares de la acumulación de colesterol en la pared vascular y su contribución a la progresión de la lesión aterosclerótica», *Rev. Esp. Cardiol.*, vol. 51, n.o 8, pp. 633-641, ago. 1998.
- [16] N. Puig, E. Jiménez-Xarrié, P. Camps-Renom, y S. Benitez, «Search for Reliable Circulating Biomarkers to Predict Carotid Plaque Vulnerability», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, n.o 21, p. 8236, nov. 2020, doi: 10.3390/ijms21218236.

- [17] L. A. V. Baroncini, A. P. Filho, S. G. Ramos, A. R. Martins, y L. O. Murta, «Histological composition and progression of carotid plaque», *Thromb. J.*, vol. 5, p. 4, feb. 2007, doi: 10.1186/1477-9560-5-4.
- [18] M. Vargas-Valverde, «El proceso inflamatorio como vínculo entre la aterosclerosis y el sistema inmunológico», vol. 24, p. 8.
- [19] M. H. Dominiczak y M. J. Caslake, «Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications», *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 48, n.o 6, pp. 498-515, nov. 2011, doi: 10.1258/acb.2011.011111.
- [20] O. Maldonado Saavedra, I. Ramírez Sánchez, J. R. García Sánchez, G. M. Ceballos Reyes, y E. Méndez Bolaina, «Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas», *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, vol. 43, n.o 2, pp. 7-22, jun. 2012.
- [21] E. Climent, D. Benaiges, y J. Pedro-Botet, «Lipid-lowering treatment in secondary prevention of ischaemic cerebrovascular disease», *Clínica E Investig. En Arterioscler. Engl. Ed.*, vol. 32, n.o 4, pp. 175-182, jul. 2020, doi: 10.1016/j.artere.2020.07.001.
- [22] C. Carvajal Carvajal, «LDL oxidada y la aterosclerosis», *Med. Leg. Costa Rica*, vol. 32, n.o 1, pp. 161-169, mar. 2015.
- [23] M. Estruch, J. L. Sánchez-Quesada, J. Ordóñez Llanos, y S. Benítez, «Electronegative LDL: A Circulating Modified LDL with a Role in Inflammation», *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/181324.
- [24] M.-Y. Shen et al., «Plasma L5 levels are elevated in ischemic stroke patients and enhance platelet aggregation», *Blood*, vol. 127, n.o 10, pp. 1336-1345, mar. 2016, doi: 10.1182/blood-2015-05-646117.
- [25] M. Tomás, G. Latorre, M. Sentí, y J. Marrugat, «Función antioxidante de las lipoproteínas de alta densidad: un nuevo paradigma en la arteriosclerosis», *Rev. Esp. Cardiol.*, vol. 57, n.o 6, pp. 557-569, jun. 2004, doi: 10.1157/13062921.
- [26] J. F. Desforges, D. J. Gordon, y B. M. Rifkind, «High-Density Lipoprotein — The Clinical Implications of Recent Studies», *N. Engl. J. Med.*, vol. 321, n.o 19, pp. 1311-1316, nov. 1989, doi: 10.1056/NEJM198911093211907.
- [27] D. J. Rader, «Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies», *J. Clin. Invest.*, vol. 116, n.o 12, pp. 3090-3100, dic. 2006, doi: 10.1172/JCI30163.
- [28] P. J. Kelly et al., «Anti-inflammatory approaches to ischaemic stroke prevention», *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 89, n.o 2, pp. 211-218, feb. 2018, doi: 10.1136/jnnp-2016-314817.
- [29] J. Khoo, E. Miller, P. McLoughlin, y D. Steinberg, «Prevention of low density lipoprotein aggregation by high density lipoprotein or apolipoprotein A-I.», *J. Lipid Res.*, vol. 31, n.o 4, pp. 645-652, abr. 1990, doi: 10.1016/S0022-2275(20)42832-9.
- [30] S. Parthasarathy, J. Barnett, y L. G. Fong, «High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.*, vol. 1044, n.o 2, pp. 275-283, may 1990, doi: 10.1016/0005-2760(90)90314-N.
- [31] M. Navab et al., «Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1», *J. Lipid Res.*, vol. 41, n.o 9, pp. 1481-1494, sep. 2000, doi: 10.1016/S0022-2275(20)33461-1.

- [32] A. J. Murphy et al., «High-Density Lipoprotein Reduces the Human Monocyte Inflammatory Response», *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, n.o 11, pp. 2071-2077, nov. 2008, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.168690.
- [33] M. I. Mackness, S. Arrol, y P. N. Durrington, «Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein», *FEBS Lett.*, vol. 286, n.o 1-2, pp. 152-154, 1991, doi: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80962-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80962-3).
- [34] A. D. Watson et al., «Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein.», *J. Clin. Invest.*, vol. 95, n.o 2, pp. 774-782, feb. 1995.
- [35] R. L. Sacco et al., «High-Density Lipoprotein Cholesterol and Ischemic Stroke in the Elderly: The Northern Manhattan Stroke Study», *JAMA*, vol. 285, n.o 21, p. 2729, jun. 2001, doi: 10.1001/jama.285.21.2729.
- [36] T. Antonino, D. R. Domenico, P. Rosaria, A. Valentina, P. Antonio, y L. Giuseppe, «Inflammation in Ischemic Stroke Subtypes», *Curr. Pharm. Des.*, vol. 18, n.o 28, pp. 4289-4310, ago. 2012.
- [37] E. Martinez, J. Martorell, y V. Riambau, «Review of serum biomarkers in carotid atherosclerosis», *J. Vasc. Surg.*, vol. 71, n.o 1, pp. 329-341, ene. 2020, doi: 10.1016/j.jvs.2019.04.488.
- [38] H. Ormstad, H. C. D. Aass, N. Lund-Sørensen, K.-F. Amthor, y L. Sandvik, «Serum levels of cytokines and C-reactive protein in acute ischemic stroke patients, and their relationship to stroke lateralization, type, and infarct volume», *J. Neurol.*, vol. 258, n.o 4, pp. 677-685, abr. 2011, doi: 10.1007/s00415-011-6006-0.
- [39] A. R. Nayak, R. S. Kashyap, H. J. Purohit, D. Kabra, G. M. Taori, y H. F. Dagainawala, «Evaluation of the inflammatory response in sera from acute ischemic stroke patients by measurement of IL-2 and IL-10», *Inflamm. Res.*, vol. 58, n.o 10, pp. 687-691, oct. 2009, doi: 10.1007/s00011-009-0036-4.
- [40] R. J. HAVEL, H. A. EDER, y J. H. BRAGDON, «The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.», *J. Clin. Invest.*, vol. 34, n.o 9, pp. 1345-1353, 1955, doi: 10.1172/JCI103182.
- [41] A. H. M. Terpstra y A. E. Pels, «Isolation of plasma lipoproteins by a combination of differential and density gradient ultracentrifugation», *Fresenius Z. Für Anal. Chem.*, vol. 330, n.o 2, pp. 149-151, 1988, doi: 10.1007/BF00470729.
- [42] S. Yaghi y M. S. V. Elkind, «Lipids and Cerebrovascular Disease: Research and Practice», *Stroke J. Cereb. Circ.*, vol. 46, n.o 11, pp. 3322-3328, nov. 2015, doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011164.
- [43] H. Shen et al., «Correlation between small dense low-density lipoprotein cholesterol and carotid artery intima-media thickness in a healthy Chinese population», *Lipids Health Dis.*, vol. 14, n.o 1, p. 137, dic. 2015, doi: 10.1186/s12944-015-0143-x.
- [44] P. M. Ramos, «Del concepto de estatinas de alta potencia a los efectos extralipídicos de las estatinas», *Rev. Esp. Cardiol. Supl.*, vol. 15, pp. 22-27, 2015, doi: 10.1016/S1131-3587(15)70121-4.
- [45] F. Blanco-Vaca, J. C. Escolà-Gil, J. M. Martín-Campos, y J. Julve, «Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein», *J. Lipid Res.*, vol. 42, n.o 11, pp. 1727-1739, nov. 2001, doi: 10.1016/S0022-2275(20)31499-1.

- [46] J. J. Badimón y B. Ibáñez, «Incremento de las HDL como arma terapéutica en la aterotrombosis», *Rev. Esp. Cardiol.*, vol. 63, n.o 3, pp. 323-333, mar. 2010, doi: 10.1016/S0300-8932(10)70091-9.
- [47] N.-A. Le, «Lipoprotein-Associated Oxidative Stress: A New Twist to the Postprandial Hypothesis», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, n.o 1, pp. 401-419, dic. 2014, doi: 10.3390/ijms16010401.
- [48] C. Bancells, J. L. Sánchez-Quesada, R. Birkelund, J. Ordóñez-Llanos, y S. Benítez, «HDL and electronegative LDL exchange anti- and pro-inflammatory properties», *J. Lipid Res.*, vol. 51, n.o 10, pp. 2947-2956, oct. 2010, doi: 10.1194/jlr.M005777.