

LA ATEROSCLEROSIS Y LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD

Kenia María, Rodríguez Oropesa¹, Niurelkis, Suárez Castillo², Ela María, Céspedes Miranda³, Aleida, Lavandero Espina⁴.

¹ Especialidad Bioquímica Clínica, Departamento Ciencias Morfológicas, Facultad de Estomatología, ² Especialidad Bioquímica Clínica, Departamento Ciencias Básicas, Facultad Calixto García, ³ Especialidad Bioquímica Clínica, Departamento Ciencias Básicas, Facultad Calixto García, ⁴ Especialidad Bioquímica Clínica, Departamento Ciencias Morfológicas, Facultad de Estomatología. La Habana, Cuba

Email kenia.rodriguez@infomed.sld.cu

Resumen

Introducción: La modificación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) juega un papel central en la aterosclerosis. Las LDL oxidadas están íntimamente involucradas en la evolución de las lesiones ateroscleróticas. Su concentración en suero es considerada un predictor del grado de aterosclerosis coronaria.

Desarrollo: Se realizó una revisión bibliográfica sobre el papel crucial que juegan las LDL y los mecanismos moleculares implicados en la aterogénesis. Factores como la oxidación de las LDL, la disfunción endotelial y la inflamación, están vinculados al proceso; la retención de las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B-100 (ApoB) en la pared arterial es el evento crítico en la iniciación y progresión de la enfermedad. **Conclusiones** El conocimiento del papel crucial que juegan las LDL modificadas en el proceso de aterosclerosis, así como los mecanismos moleculares involucrados en el mismo, permitirán una aproximación a la creación de nuevos métodos diagnósticos para una mejor evaluación del riesgo cardiovascular y en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas.

Palabras clave: aterosclerosis, lipoproteínas de baja densidad, inflamación, oxidación.

INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de la pared vascular, progresiva, compleja, multicausal, y cuya exacta patogenia es aún poco conocida. Es tan antigua como el hombre, y lo acompaña desde su concepción hasta su muerte; aunque sus efectos clínicos adversos se evidencian con frecuencia después de la cuarta década de la vida.^{1,2,3}

La misma afecta a las arterias de mediano y gran calibre y tiene carácter sistémico⁴. Es un proceso innato al desarrollo de la vida humana. Durante el primer año de vida existen cambios celulares en las paredes arteriales del 100% de los niños; alrededor del 25 % de los jóvenes de 15 a 20 años están afectados por placas no obstructivas y silentes⁵.

Resulta de una combinación de alteraciones en el metabolismo de las lipoproteínas, estrés oxidativo, inflamación crónica y susceptibilidad a la trombosis.

Desarrollo

Los lípidos son solubles en grasa y para circular en la sangre, que es un medio acuoso, forman complejos denominados lipoproteínas. Estas están constituidas por un núcleo central de triglicéridos y ésteres de colesterol (lípidos no polares), recubiertos por una capa de proteínas (apoproteínas), fosfolípidos y colesterol libre, ordenados de tal manera que la parte no polar queda hacia el interior de la partícula donde están los lípidos no polares y la parte polar hacia el exterior, dirigida al medio acuoso. Las lipoproteínas constituyen un medio de transporte y reservorio circulante para los lípidos⁶.

Especial importancia tienen las lipoproteínas de baja densidad (LDL, de sus siglas en inglés), constituyen un grupo heterogéneo de partículas que varían en tamaño, composición y estructura. Cada partícula LDL contiene 1600 moléculas de ésteres de colesterol y 170 moléculas de triglicéridos que forman un núcleo lipídico central. Este núcleo está rodeado por una monocapa de 700 moléculas de fosfolípidos, principalmente lecitina y pequeñas cantidades de esfingomielina y lisolecitina, así como 600 moléculas de colesterol libre. En la capa exterior hay una proteína de gran tamaño, con peso molecular de 550 000 Dalton, llamada ApoB-100.

Las LDL aparecen como consecuencia de la metabolización plasmática de las lipoproteínas de muy baja densidad y de densidad intermedia. Es una partícula muy rica en colesterol, siendo la responsable del transporte del 70% del colesterol en suero. Su papel principal consiste en la liberación del colesterol procedente del hígado a las células de los tejidos periféricos. Las LDL son captadas por las células hepáticas y de tejidos periféricos mediante el receptor específico Apo B/E o receptor de LDL, el cual reconoce la ApoB-100. En este proceso se forman endosomas que, al fusionarse con lisosomas, provocan la hidrólisis de la ApoB-100 y del colesterol esterificado⁷, permitiendo así, la captación celular del colesterol. El colesterol libre procedente de las LDL es de nuevo esterificado por la acción de la enzima lecitina-colesterol-aciltransferasa (LCAT) para poder ser almacenado en las células.

La lipoproteína (a) (Lp(a)) es una variante genética de las LDL, descrita por Berg en 1963, aunque su metabolismo es independiente del de las LDL. La composición lipídica y proteica de la Lp(a) es similar a las LDL, aunque contiene una apoproteína adicional, la Apo(a), que le confiere características fisicoquímicas específicas. Tiene similitud estructural con el plasminógeno y posee propiedades trombogénicas⁸.

El aumento de la concentración plasmática de Lp (a) se asocia con un mayor riesgo de desarrollo prematuro de aterosclerosis en arterias coronarias⁹, cerebrales y en las extremidades inferiores¹⁰. Constituye un factor de riesgo independiente al LDL colesterol (LDL-c) para las Enfermedades Cardiovasculares (ECV) en sujetos jóvenes, y se ha utilizado como marcador de ECV en los pacientes con hipercolesterolemia familiar. Posee alta aterogenicidad ^{11,12}.

Una clase de las LDL es el fenotipo B o las pequeñas y densas (LDLsd, de sus siglas en inglés). El diámetro de estas partículas es inferior a los 255 Å y se las asocia a mayor riesgo coronario ¹³. Las partículas sintetizadas por el hígado son ricas en triglicéridos (VLDL 1), tienden a enriquecerse en Apo CIII, lo que retrasa su metabolismo periférico y su afinidad por el receptor LDL dando lugar con mayor facilidad a las LDLsd¹⁴. Están vinculadas a hipertrigliceridemia, HDL bajo y Apo AI disminuido y acompañan al síndrome de resistencia insulínica¹⁵.

La distribución de las LDL no guarda relación con la concentración de colesterol total o la de colesterol LDL. El tamaño de las LDL está íntimamente relacionado con la concentración de partículas VLDL y de triglicéridos totales. De este modo, la mayor parte de los sujetos con una trigliceridemia superior a 200 mg/dL, tienen un patrón B de LDL¹⁶.

Las LDLsd atraviesan al espacio subendotelial y permanecen más tiempo en él, posiblemente por su menor tamaño y porque, de forma primaria o de forma asociada al descenso funcional de las HDL, la disfunción endotelial favorece el aumento de permeabilidad de estas LDL pequeñas. Las LDLsd son más aterogénicas debido a una serie de características distintivas. Por una parte, tiene menor afinidad por el receptor de las LDL¹⁷, lo que implica una menor tasa de aclaramiento plasmático y un mayor tiempo de permanencia en la circulación.

También las LDLsd atraviesan la barrera endotelial con mayor facilidad que las LDL nativas ya que este es un proceso dependiente principalmente del tamaño

de la partícula de lipoproteína. También se unen con mayor afinidad a los proteoglicanos que constituyen la pared arterial, favoreciendo la retención subendotelial de lipoproteínas. Además, las LDLsd tienen mayor susceptibilidad a ser modificadas por mecanismos oxidativos y de glicación no enzimática¹⁸.

Diferentes grupos de investigadores han demostrado que el aumento de los niveles plasmáticos de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) es un predictor de enfermedad vascular aterosclerótica. Las LDLox, independientemente del método utilizado para su cuantificación, aumentan su concentración temporalmente durante la fase aguda del infarto agudo de miocardio o del accidente vascular cerebral y también tras una angiografía transluminal percutánea.^{19,20}.

La experiencia acumulada durante las últimas décadas ha permitido formular varias hipótesis que intentan explicar la etiología y patogénesis de la aterosclerosis²¹. Entre las más aceptadas se encuentran la hipótesis de la respuesta al daño y la hipótesis de la respuesta a la retención de las LDL.

Entre las principales alteraciones funcionales que sufre el endotelio se encuentra el aumento de su permeabilidad, particularmente a lipoproteínas (Lp) proaterogénicas, las cuales, una vez modificadas, inducen la secreción endotelial de agentes quimiotácticos y la expresión de moléculas de adhesión, desencadenando el proceso inflamatorio característico de la aterosclerosis^{22,23}.

Las LDLox están íntimamente involucradas en la iniciación, progresión y desestabilización de las lesiones ateroscleróticas²⁴. La retención de LDL en la íntima arterial se produce debido a la unión de la ApoB-100 a los proteoglicanos (PGs) de la matriz extracelular cargados negativamente. Esto hace a las Lp susceptibles a modificaciones oxidativas por especies reactivas del oxígeno y/o por enzimas como la mieloperoxidasa y la lipooxigenasa liberadas por células inflamatorias²⁵.

Las LDLox se retienen en la íntima arterial, inducen la infiltración de monocitos, promueven su diferenciación a macrófagos y formación de células espumosas. Inducen además, la expresión de moléculas quimiotácticas como: la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1, de sus siglas en inglés) por células vasculares. Las LDLox son citotóxicas y conducen a la pérdida de la integridad endotelial²⁶.

Hay una asociación entre el grado de oxidación de las LDL y la evolución de la placa de ateroma²⁷. **La modificación de las LDL tiene un papel clave en la aterogénesis**, independientemente de la relevancia relativa de cada tipo de **modificación en la generación de las LDL modificadas**. Entre las principales modificaciones de las LDL se encuentran las LDL-Malonaldehído (LDL-MDA), LDL-Glicosiladas (LDL-AGE) y LDL-Acetiladas (LDL-Acet)²⁸.

Los biomarcadores del plasma tienen la ventaja de ser no invasivos, lo que hace que sean aplicables a una mayor cantidad de pacientes en situación de riesgo. Se han desarrollado AcMs y sistemas diagnósticos para detectar diferentes modificaciones oxidativas de las LDLox en sangre^{29,30,31,32}. Pero al ser tan diferentes, no ha sido posible compararlos y establecer claramente la relevancia clínica de los mismos.

Las LDL pueden ser modificadas mediante diferentes mecanismos como la hiperglicemia, inflamación, estrés oxidativo, carbamilación, sobrecarga con ácidos grasos no esterificados (NEFA), lipólisis, proteólisis y agregación³³. La actividad biológica de las LDL modificadas se debe a la generación de nuevos compuestos como consecuencia de las modificaciones oxidativas sufridas por las LDL. Algunos de estos efectos biológicos pueden ser atribuidos a componentes individuales, mientras que otros se deben al efecto combinado de varios componentes de las partículas de LDLox.

Las modificaciones de las LDL pueden ocurrir tanto en la fracción lipídica como en la fracción proteica. La oxidación de LDL es un proceso mediado por radicales libres que produce numerosos cambios estructurales, los cuales dependen de un evento inicial común, la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en las partículas LDL. Los radicales libres, al inducir la peroxidación de los lípidos de la membrana, alteran las propiedades de la misma inactivando los receptores de membrana o las enzimas que pueden alterar la función celular normal.

Además, las LDLox por sí mismas se han identificado como un potente estímulo para la formación vascular de radicales de oxígeno originándose así la perpetuidad del proceso oxidativo. Varios estudios implican al anión superóxido como agente que promueve la oxidación de los lípidos de LDL, mediada por las CML y los monocitos-macrófagos³⁴.

El óxido nítrico y el peroxinitrito son otros oxidantes relevantes para la oxidación de LDL producidos por las células endoteliales y los macrófagos. Ciertas enzimas celulares tales como lipoxigenasa³⁵ que convierte los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en hidroperóxidos, pueden también oxidar LDL. Asimismo, la mieloperoxidasa secretada por los fagocitos, y los productos originados tras su acción (ácido hipocloroso y el radical tirosil) promueven también la oxidación de las lipoproteínas³⁶.

Los productos de oxidación lipídica se asocian directamente con la inducción, propagación y acumulación de monocitos subendoteliales y otras reacciones asociadas con la inflamación, la cual es un proceso fundamental en el desarrollo de la placa aterosclerótica. La estimación de malondialdehído (MDA) mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) es la medición más ampliamente usada de peroxidación lipídica y el grado de extensión de oxidación de las LDL es frecuentemente expresado como equivalentes de MDA por mg de ApoB-100³⁷.

Se considera a las LDL mínimamente modificadas cuando sus valores oscilan en el rango entre 3-12 nmol de TBARS/mg ApoB. En las LDL mínimamente modificadas ocurren modificaciones en la porción lipídica, fundamentalmente a expensas de la formación de productos de peroxidación lipídica iniciales como peróxidos e hidroperóxidos. No se producen cambios en la ApoB-100. La partícula sigue siendo reconocida por los receptores de LDL³⁸.

Las LDL están extensivamente oxidadas cuando alcanzan valores por encima de 30 nmol de TBARS/mg ApoB. Dentro de los productos de la peroxidación lipídica se encuentran aldehídos de cadena corta formados a partir de la ruptura oxidativa de ácidos grasos insaturados, uno de los más estudiados es el MDA. Como resultado se originan las LDL-MDA, con pérdida de la afinidad de la ApoB por el receptor de LDL e incremento de la afinidad por los receptores basureros³⁹.

Una propiedad **común a las diferentes formas de LDL modificadas es un aumento** en la carga eléctrica de la partícula que conlleva a cambios en la movilidad electroforética de las LDLox⁴⁰.

Avogaro y colaboradores⁴¹ fueron los primeros en aislar del plasma una fracción **de LDL mínimamente modificadas con un aumento de la carga negativa** que denominaron LDL electronegativas (LDL(-)). Las mismas son proinflamatorias, proapoptóticas y antiangiogénicas^{42,43}. Se consideran citotóxicas para las células endoteliales y contribuyen al reclutamiento de las células inflamatorias en la fase inicial de la aterosclerosis^{44,45}.

Las LDL(-) contienen las diferentes formas modificadas de las LDL que están presentes en la sangre y representan aproximadamente un 5% de las LDL total en individuos sanos. Las LDL(-) están 2-4 veces aumentadas en diferentes grupos de individuos con un elevado RCV o con aterosclerosis avanzada, incluyendo pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2^{46,47}.

La enzima acetil-hidrolasa-factor activador de plaquetas está asociada a las LDL(-), incrementando su acción proinflamatoria. Como resultado de su acción se originan las LDL acetiladas (LDL-Acet), que constituyen una forma de LDL electronegativas.

Por su parte, el proceso de glicación puede afectar tanto los fosfolípidos como la ApoB de las LDL, y como consecuencia del mismo, se incrementa la susceptibilidad de las lipoproteínas a modificaciones oxidativas. Los productos finales de glicosilación avanzada (AGE) se originan por estrés oxidativo e hiperglicemia. Los mismos reaccionan con las LDL oxidándolas y generando las LDL-AGE⁴⁸.

Aunque no puede descartarse de manera absoluta que una parte de las LDLox y las LDL-AGE se haya formado durante su tiempo de vida en la circulación plasmática, la percepción general es que las LDLox y las LDL-AGE se han formado en la pared arterial⁴⁹. De esta manera, la existencia en el plasma de estas formas de LDL modificadas podría ser un reflejo de la presencia silente de lesiones ateroscleróticas activas, ya que las LDL se oxidan y/o glicosilan en zonas lesionadas de la pared arterial, pero no se encuentra en zonas sanas.

La ApoB-100 es modificada más tardíamente por derivatización de varios grupos funcionales de aminoácidos como la lisina, cisteína, histidina, triptófano y tirosina⁵⁰. La modificación de alrededor del 16% de las lisinas por MDA, conlleva a la pérdida del reconocimiento por el receptor de las LDL y la aparición de epitopos de reconocimiento por los receptores basureros. Además de la derivatización de las cadenas laterales, la ruptura de cadenas peptídicas y el cruzamiento de polipéptidos pueden ocurrir durante la oxidación de las LDL.

Conclusiones

El conocimiento del papel central que juegan las LDL modificadas en la iniciación y progresión del proceso de aterosclerosis, así como los mecanismos moleculares involucrados en el mismo, permitirán una aproximación a la creación de nuevos métodos diagnósticos para una mejor evaluación del riesgo cardiovascular (RCV) y en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas.

Referencias Bibliográficas

1. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010; 134: 33-46.
2. Legein B. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cell. Mol. Life Sci*. 2013; 70: 3847-69.
3. Alie N, Eldib M, Fayad ZA, Mani V. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease: PET/CT for the Evaluation of Atherosclerosis and Inflammation. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* 2014;8(S3): 13-21.
4. Örbom A, Jansson B, Schiopu A, Evans-Axelsson S, Nilsson J, Fredrikson G, et al. Multi-radionuclide digital autoradiography of the intra-aortic atherosclerotic plaques using a monoclonal antibody targeting oxidized low-density lipoprotein. *Am J Nucl Med Mol*. 2014; 4(2)172-180.
5. Fearon IM. Risk factors, oxidative stress, and cardiovascular disease. En: I. Laher (ed.), *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. 2014; DOI 10.1007/978-3-642-30018-9_46, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
6. Errico TL, Chen X, Martin Campos JM, Julve J, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca. Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. F. *Clin Invest Arterioscl*. 2013; 25(2):98-103.
7. Mathews CK, Van Holde KE. Metabolismo lipídico I: Ácidos Grasos, Triglicéridos y Lipoproteínas. En *Bioquímica*. Mac. Graw- Hill Interamericana 1998; 693-696.
8. Hoefler G, Harnoncourt F, Paschke E, Mirti W, Pfeiffer KH, Kostner G. Lipoprotein Lp(a). A risk factor for myocardial infarction. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 398-401.
9. Rhoads GG, Dahlen G, Berg K, Morton NE, Dannenberg AL. Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *JAMA* 1986; 256: 2540-2554.
10. Nogués X, Sentí M, Pedro-Botet J, Rubiés-Prat J, Vidal-Barraquer F. Serum lipoprotein (a) levels in men with peripheral vascular disease. *Angiology* 1991; 42: 659-664.
11. Sandkamp M, Funke H, Schulte H, Köhler E, Assmann G. Lipoprotein (a) is an independent risk for myocardial infarction at a young age. *Clin Chem* 1990; 36: 20-23.

12. Nogués X, Sentí M, Pedro-Botet J, Molina L, Serrat R, Pons S, Rubiés-Prat J. Enfermedad cardíaca coronaria y lipoproteína (a): su relación con otros factores lipídicos de riesgo cardiovascular. *Med Clin* 1992;98: 171-174.
13. Selby JV et al. LDL subclass fenotypes and the insulinoreistence syndrome in woman. *Circulation*. 1993; 88: 381-7.
14. Krauss RM. Dietary and genetic probes of atherogenic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2265-2272.
15. Calandra S, Tarugi P, Speedy HE, Dean AF, Bertolini S, Shoulders CC. Mechanisms and genetic determinants regulating sterol absorption, circulating LDL levels, and sterol elimination: Implications for classification and disease risk. *J Lipid Res*. 2011;52:1885-1926.
16. Taskinen MR. Diabetic dyslipidemia. *Atheroscler Suppl*. 2002;3:47-51.
17. Chapman MJ, Guérin M, Bruckert E. Atherogenic, dense lowdensity lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. *Eur Heart J*. 1998;19 Suppl A:A24-30.
18. Taskinen MR. Diabetic dyslipidemia. *Atheroscler Suppl*. 2002;3:47-51.
19. 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.
20. 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.
21. Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol* 2001;22(12): 665-9.
22. Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in therosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007;116(16): 1832-1844.
23. Badimon L, Storey RF, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. *Thromb. Haemost*. 2011;105 (1): S34-S42.
24. Kwon GP, Schroeder JL, Amar MJ, Remaley AT, Balaban RS. Contribution of macromolecular structure to the retention of low-density lipoprotein at arterial branch points. *Circulation* 2008;11: 2919-2927.

25. Weber C, Noels S. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* 2011;17(11): 1410-1422.
26. Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.* 2010;13: 39–75.
27. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142: 231–255.
28. Fraley AE, Tsimikas S. Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2006;17:502–509.
29. Holvoet P, Macy E, Landeloos M, et al. Analytical performance and diagnostic accuracy of immunometric assays for the measurement of circulating oxidized LDL. *Clin Chem* 2006; 52:760-764.
30. 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.
31. Itabe H, Kimura J, Uchiyama H, Shimamura K, Takano T. JP8304395 (1996).
32. Witztum JL, Wulf P, Horkko S, Steinberg D. WO9908109 (1999).
33. Zingg JM, Ricciarelli R, Azzi A. Scavenger receptors and modified lipoproteins: fatal attractions? *IUBMB Life.* 2000; 49: 397-403.
34. Calmarza P. Lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas. *Electron J. Biomed.* 2008;3: 52-60.
35. 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(15): 1487– 1494.
36. Calmarza P. Lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas. *Electron J. Biomed.* 2008;3: 52-60.
37. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990;9:515-540.
38. Harkewicz R, Hartvigsen K, Almazan F, Dennis EA, Witztum JL, Miller YI. Cholesteryl ester hydroperoxides are biologically active components of minimally oxidized lipoprotein low density. *J Biol Chem.* 2008; 283: 10241-10251.

39. Ashraf MZ, Kar NS, Podrez EA. Oxidized Phospholipids: Biomarker for Cardiovascular Diseases. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 2009;41(6):1241–1244.
40. Sánchez-Quesada JL, Benítez S, **Ordóñez**-Llanos J. Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol.* 2004;15:329-335.
41. **Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G. Presence of a modified low density** lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis.* 1988;8: 79---87.
42. Demuth K, Myara I, Chappey B, et al. A cytotoxic electronegative LDL subfraction is present in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16: 773-783.
43. Sánchez-Quesada JL, Camacho M, Anton R, Benitez S, Vila L, Ordóñez-Llanos J. Electronegative LDL of FH subjects: Chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2003; 166: 261-270.
44. Ziouzenkova O, Asatryan L, Sahady D, et al. Dual roles for lipolysis and oxidation in peroxisome proliferation-activator receptor responses to electronegative low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2003; 278: 39874-39881.
45. Mello AP, da Silva IT, Abdalla DS, Damasceno NR. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis.* 2011;215:257-265.
46. Mello AP, da Silva IT, Abdalla DS, Damasceno NR. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis.* 2011;215:257-265.
47. 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.
48. Brown BE, Rashid I, Van Reyk DM, Davies MJ. Glycation of lowdensity lipoprotein results in the time-dependent accumulation of cholesteryl esters and apolipoprotein B-100 protein in primary human monocyte-derived macrophages. *FEBS J.* 2007; 274:1530-1541.
49. **Sánchez-Quesada JL, Villegas S. Modified forms of LDL in plasma.** En: Parthasarathy S, editor. *Atherogenesis.* Rijeka, Croatia: InTech; 2011. p. 447-472.

50. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in the oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992;13:341-390.