

Evaluación de la heterogeneidad y función de HDL por el laboratorio[§]

Rajesh Movva,* Daniel J. Rader*

Traducción: Rosa Isabel Sierra Amor

RESUMEN

Antecedentes: La concentración de colesterol HDL-C (HDL-C) y su principal componente proteico apolipoproteína (apo) A-I están inversamente asociados con el riesgo cardiovascular, dejando atrás el concepto de que la terapia para aumentar la concentración de HDL-C y de apoA-I sea anti-aterosclerótica y protectora contra los eventos cardiovasculares. Una falla reciente del fármaco torcetrapib, una proteína inhibidora que transfiere el éster colesterol y que sustancialmente aumenta las concentraciones de HDL-C, ha llamado la atención por tener una heterogeneidad y función distinta de las concentraciones de esta molécula. **Contenido:** Esta revisión presenta el estado actual del conocimiento sobre los ensayos heterogéneos de HDL-C, su función y relación con la enfermedad cardiovascular. HDL-C es altamente heterogénea, con subfracciones que pueden ser identificadas con base en su densidad, tamaño, carga, y composición proteica, y el concepto atractivo de que ciertas subfracciones de HDL-C pueden predecir el riesgo cardiovascular. Además, se ha demostrado que HDL-C tiene una variedad de funciones que pueden contribuir al efecto protector cardiovascular, incluyendo la promoción del flujo de macrófagos de colesterol y el transporte de colesterol inverso y su efecto antiinflamatorio y promotor de óxido-nitroso. **Resumen:** Los ensayos de laboratorio robustos para subfracciones de HDL-C y sus funciones, así como la validación de la utilidad de estos ensayos para predecir el riesgo cardiovascular y estimar la respuesta a las intervenciones terapéuticas son críticamente importantes y de un gran interés para los clínicos cardiovasculares e investigadores y químicos clínicos.

Palabras clave: HDL, subfracciones, heterogeneidad, laboratorio.

ABSTRACT

Background: Plasma concentrations of HDL cholesterol (C-HDL) and its major protein component apolipoprotein (apo) A-I are strongly inversely associated with cardiovascular risk, leading to the concept that therapy to increase C-HDL and apoA-I concentrations would be anti-atherosclerotic and protective against cardiovascular events. The recent failure of the drug torcetrapib, a cholestryl ester transfer protein inhibitor that substantially increased C-HDL concentrations, has brought focus on the issues of HDL heterogeneity and function as distinct from C-HDL concentrations. **Content:** This review addresses the current state of knowledge regarding assays of HDL heterogeneity and function and their relationship to cardiovascular disease. HDL is highly heterogeneous, with subfractions that can be identified on the basis of density, size, charge, and protein composition, and the concept that certain subfractions of HDL may be better predictors of cardiovascular risk is attractive. In addition, HDL has been shown to have a variety of functions that may contribute to its cardiovascular protective effects, including promotion of macrophage cholesterol efflux and reverse cholesterol transport and anti-inflammatory and nitric oxide-promoting effects. **Summary:** Robust laboratory assays of HDL subfractions and functions and validation of the usefulness of these assays for predicting cardiovascular risk and assessing response to therapeutic interventions are critically important and of great interest to cardiovascular clinicians and investigators and clinical chemists.

Key words: HDL, subfractions, heterogeneity, laboratory.

[§] Artículo publicado en: Clin Chem. 2008; 54: 788-800, con autorización de *Clinical Chemistry* para traducción y republicación.

* Institute for Translational Medicine and Therapeutics and Cardiovascular Institute; University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA.

Correspondencia:

Daniel J. Rader.

Institute for Translational Medicine and Therapeutics, University of Pennsylvania Medical Center, 654 BRBII/III labs, 421 Curie Blvd, Philadelphia, PA 19104-6160. Fax 215-573-8606; E-mail: rader@mail.med.upenn.edu.

INTRODUCCIÓN

Se estima que 1.2 millones de estadounidenses experimentan un infarto al miocardio al año.¹ Hay muchísima evidencia de la efectividad de las terapias para disminuir el colesterol LDL (LDL-C)[‡], particularmente las estatinas, tanto en la prevención primaria como secundaria de la enfermedad aterosclerótica vascular. A pesar de los beneficios antiaterogénicos de las estatinas, aún permanece un riesgo residual sustancial. Los estudios epidemiológicos y clínicos prospectivos aleatorios han mostrado de manera consistente una asociación inversa muy poderosa entre la magnitud del colesterol HDL (HDL-C) y la enfermedad coronaria (EC).² En el *Framingham Heart Study*, cada aumento de 10 mg/dL (0.26 mmol/L) en HDL-C estaba asociado con una disminución significativa del riesgo relativo para la mortalidad por enfermedad coronaria en 19% de los hombres y 28% de las mujeres.³ La prevalencia de concentraciones bajas de HDL-C como lo definen las Guías del Programa Nacional de Educación en Colesterol para Adultos en Tratamiento del Panel III (ATP-III) como ≤ 40 mg/dL (≤ 1.04 mmol/L) en los hombres y ≤ 50 mg/dL (≤ 1.30 mmol/L) en las mujeres,⁴ fue tan alta como el 66% en las poblaciones de alto riesgo con enfermedad coronaria que estaban en terapia con estatinas, con relación a las concentraciones de LDL-C.⁵ En el análisis *post-hoc* del estudio de Tratamiento de Nuevas Metas, Barter y cols.⁶ encontraron que HDL-C era un predictor significativo de eventos cardiovasculares mayores, incluyendo la cohorte con concentraciones de LDL-C por debajo de 70 mg/dL (1.81 mmol/L); aunque el HDL-C bajo predice el riesgo aun en pacientes tratados con estatinas.

A pesar de los datos observacionales abrumadores que incluyen una relación inversa de las concentraciones de HDL-C y apolipoproteína A-I (apoA-I) con el riesgo de enfermedad coronaria, hay inconsistencias en la experiencia observacional y de intervención que levanta importantes preguntas acerca del valor

de las mediciones de HDL-C y apoA-I como indicadores causales del riesgo de aterosclerosis. Hay varios síndromes genéticos de valores muy bajos de HDL-C y apoA-I que no están claramente asociados con el aumento de riesgo de enfermedad coronaria prematura. Por ejemplo, una deficiencia en la lecitin:colesterol aciltransferasa (LCAT) no parece aumentar el riesgo cardiovascular a pesar de que las concentraciones de HDL-C sean de < 15 mg/dL (< 0.39 mmol/L).⁷ Es sumamente conocido que individuos heterocigotos para la mutación Milano del gen 2 de la apolipoproteína A-I (*APOAI*)^{II} no desarrollan enfermedad cardiovascular temprana a pesar de que el HDL-C fuese de < 20 mg/dL (< 0.52 mmol/L),⁸ una situación similar lo es para la mutación Paris para *APOAI*.⁹ Aun la enfermedad Tangier, causada por mutaciones en la ATP-transportadora del cassette AI (ABCA1) que transporta el gen (*ABCA1*), en el cual la concentración del HDL/C y la apoA-I son virtualmente indetectables, no está asociada con el marcado aumento en la enfermedad coronaria que puede esperarse de un fenotipo tan dramático.¹⁰ Es muy importante remarcar, que los pacientes con deficiencia a LCAT y enfermedad Tangier a menudo tienen disminuidas las concentraciones de LDL-C, las cuales pueden ser un factor que establezca las bajas concentraciones de HDL-C.^{7,10}

Estas enfermedades genéticas están asociadas con un aumento significativo del cambio en HDL, por lo cual mediciones en estado estables pueden ser menos informativas que mediciones del flujo del cambio de HDL.¹¹ En cualquier caso, estas enfermedades ilustran como simples mediciones de HDL no siempre correlacionan con el riesgo cardiovascular. Datos de intervenciones aleatorias en estudios controlados para HDL dan una impresión compleja similar. Los fibratos, o agonistas receptores α para peroxisoma proliferadora activada, tienen modestos aumentos de HDL en el humano, pero los datos sobre su relación en la reducción del riesgo cardiovascular son confusos. Los efectos cardioprotectores de los fibratos fueron sugeridos en el estudio de *Helsinki Heart*¹² y en el estudio de intervención de lipoproteínas de alta densidad de la Oficina de Veteranos (*Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention trial*, VA-HIT).¹³ De hecho, un estudio posterior específicamente estuvo dirigido a los hombres con HDL-C bajo y permanece aun

[‡] Abreviaturas no estándar: LDL-C: LDL colesterol; HDL-C: HDL colesterol; EC: enfermedad coronaria; apo: apolipoproteína; LCAT: lecitin:colesterol aciltransferasa; ABCA1: ATP-transportadora del cassette AI; VA-HIT: Estudio de Intervención de Lipoproteína de Alta Densidad de la Oficina de Veteranos; CETP: proteína de transferencia de éster de colesterol; TRC: transporte reverso de colesterol: SR-BI: receptores removedores tipo BI; VAP: vertical de autoperfil; EGG: electroforesis por gradiente de gel; RMN: resonancia magnética nuclear; LpA-I: apolipoproteína que contiene sólo apoA-I; LpA-I:A-II: apolipoproteína que contiene apoA-I y apoA-II; FER_{HDL}: velocidad de esterificación fraccional en HDL; PON1: paraoxonasa.

^{II} Genes humanos: *APOAI*: apolipoproteína A-I; *ABCA1*, ATP-transportadora del cassette, subfamilia A (ABC1), miembro 1; *ABCG1*: ATP-transportadora del cassette, subfamilia G (WHITE), miembro 1; *CETP*, proteína de transferencia de ésteres de colesterol en plasma.

siendo el mejor ejemplo de estudios clínicos positivos en el aumento de HDL, aunque la magnitud del aumento de HDL fue pequeña, y el beneficio no se relacionó directamente con el aumento de HDL *per se*. Otros estudios de fibratos, como el de Prevención del Infarto con Bezafibrato¹⁴ y el de Intervención con Fenofibrato y la disminución del evento en Diabetes,¹⁵ a pesar de sugerir un beneficio positivo, fueron defraudantes. El ácido nicotínico (niacina), comúnmente comercializado, es el fármaco más efectivo para aumentar el HDL, pero datos de estudios clínicos mostraron resultados benéficos^{16,17} antes del uso de estatinas, aunque la evidencia es muy poca para poder mostrar beneficios en esta era tan popular con el tratamiento con estatinas. Algunos estudios de imagen de aterosclerosis usando el grosor de la íntima-media de la carótida (IMT)¹⁸ o la angiografía la coronaria,¹⁹ han sugerido el beneficio de agregar niacina a la estatina. Un meta-análisis de los estudios clínicos usando ultrasonido intravascular sugiere que estos cambios en el volumen del ateroma estaban relacionados con cambios en HDL-C,²⁰ consistentes con el concepto de que la intervención que aumenta HDL puede ser benéfica.

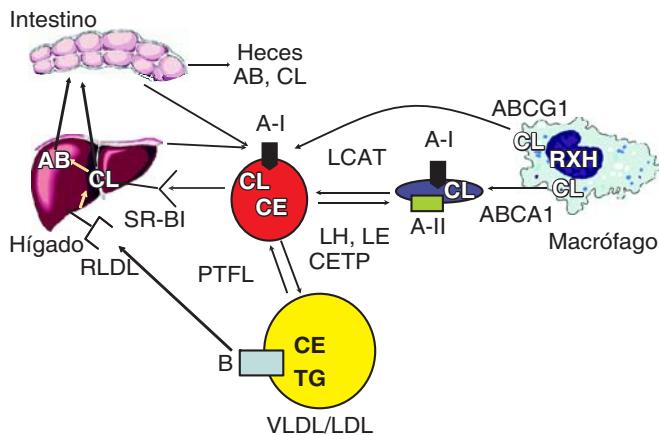
La experiencia con torcetrapib, un inhibidor de la proteína de transferencia del éster de colesterol (CETP) ha levantado una serie de preguntas muy profundas sobre el valor del aumento de la concentración de HDL-C para disminuir el riesgo cardiovascular. El torcetrapib ha mostrado incrementos sustanciales en la concentración de HDL-C del 50 al 100%,^{21,22} y fundamentado en este efecto, se avanzó en el desarrollo de la fase III. Sin embargo, el gran estudio clínico Investigación del manejo del nivel de lípidos para entender su impacto en eventos ateroscleróticos, fue terminado tempranamente debido al aumento en la morbilidad cardiovascular y la mortalidad total a pesar de que se observó un 72% de aumento en la concentración de HDL-C en individuos tratados con este fármaco.²³ Estudios de imagen usando ultrasonido intravascular²⁴ y ultrasonido de la carótida para medir IMT²⁵ fueron negativos a pesar de que hubo un aumento favorable similar en HDL-C. Así mismo, la interpretación de los resultados del estudio clínico con el torcetrapib es complicada debido al hecho de que este fármaco aumenta la presión arterial y aumenta la aldosterona como un efecto basado en un mecanismo de cese no-mecánico.²⁶ De hecho, otro inhibidor CETP, el anacetrapib, recientemente reportó un aumento de HDL de hasta 128% sin aumentar la presión arterial ambulatoria.²⁷ No obstante, la experiencia con torcetrapib fuerte-

mente sugiere que las medidas terapéuticas basadas solamente en el aumento en HDL-C no son las adecuadas para reducir el riesgo cardiovascular.

La química analítica relacionada con la medición de HDL-C y las subclases de HDL han sufrido una evolución sustancial en las últimas décadas.^{28,29} Sobre la base de desarrollos más recientes, hay una necesidad muy grande por identificar otras subclases de HDL relacionadas y sus funciones, y encontrar biomarcadores que pronostiquen mejor el riesgo cardiovascular y puedan ser usados para estimar clínicamente el beneficio de las nuevas terapias para HDL. Esta necesidad presenta una oportunidad para los químicos clínicos al tomar el liderazgo en el desarrollo y la validación de tales marcadores. Además de ser una fuente para obtener mejores marcadores para el flujo del colesterol, la HDL tiene funciones pleiotrópicas que incluye efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antitrombóticos y promotores del óxido nítrico. Esta revisión se enfoca a los métodos *in vitro* para medir varias subfracciones de HDL y las funciones de HDL que pudieran ser más efectivas que lo que se tiene actualmente como marcadores para el riesgo cardiovascular.

Avances recientes en el entendimiento del metabolismo de HDL y el transporte reverso del colesterol

La regulación molecular del metabolismo de HDL y el transporte reverso de colesterol (*Figura 1*) es compleja. Mucho se ha aprendido en esta última década, y este tema ha sido comentado en varias excelentes revisiones.³⁰⁻³² ApoA-I es la proteína principal de HDL presente en casi todas las partículas de HDL y que es sintetizada en el hígado y el intestino. ApoA-I se secreta como una proteína pobre en lípidos, y después rápidamente adquiere fosfolípidos y colesterol no esterificado de los mismos tejidos vía el transportador ABCA1 para formar las partículas discoidales HDL.³³ Esta HDL naciente adquiere además colesterol libre de otros tejidos periféricos, y este colesterol es esterificado, formando ésteres de colesterol (CE) por la enzima LCAT asociada a HDL, generando un HDL esférico. El CETP transfiere CE del HDL a lipoproteínas que contienen apoB en intercambio por triglicéridos. Las enzimas lipolíticas, lipasa hepática y lipasa endotelial, hidrolizan los triglicéridos y fosfolípidos de HDL, generando partículas HDL pequeñas. La apoA-I que es parte de HDL madura es catabolizada por el hígado, mientras que la apoA-I pobre en lípidos es catabolizada por los riñones.



HDL naciente puede promover el flujo del colesterol de los macrófagos vía ABCA1 y HDL maduro vía ABCG1. El colesterol es esterificado a éster de colesterol (CE) en el plasma por lecitin-colesterol aciltransferasa (LCAT), y ambos colesteroles, libre no esterificado (CL) y CE son transportados al hígado ya sea directamente vía SR-B1 o indirectamente vía transferencia a apoB-lipoproteínas (B) vía CETP. El contenido de HDL está modulado por la lipasa hepática (LH), la lipasa endotelial (LE), y la proteína transportadora de fosfolípidos (PTFL).

AB: ácidos biliares; CL: colesterol libre; A-I: apolipoproteína A-I; A-II: apolipoproteína A-II; RXH: receptor X hepático; RLDL: receptor LDL; TG: triglicéridos.

Figura 1. ApoA-I es sintetizada en el intestino y el hígado, formando partículas emergentes de HDL a través de la congregación de lípidos.

HDL facilita el proceso conocido como transporte de colesterol reversible (TRC) en el cual el colesterol no esterificado en los tejidos periféricos es transferido a HDL y regresado finalmente al hígado para ser excretado por la bilis y las heces. De aquí que TRC es un mecanismo importante por el cual HDL protege contra la aterosclerosis, aunque está por ser demostrado y probado definitivamente. El macrófago es la célula más importante para la promoción mediada por HDL del flujo de colesterol, y la regulación molecular del flujo del colesterol a partir de los macrófagos ha sido extensamente estudiada. El transportador ABCA1 es el instrumento en la vía clásica del flujo de colesterol por el macrófago y promueve el flujo de colesterol a apoA-I pobre en lípidos como un aceptor. Otro miembro de esta familia, ABCG1, codificado para la ATP-transportadora del cassette, de la subfamilia G (WHITE), miembro del gen 1 (ABCG1), promueve el flujo del colesterol por los macrófagos a partículas maduras de HDL. La expresión de ABCA1 y ABCG1 está sobreexpresada por el receptor nuclear X hepático, el cual es activado por los oxisteroles,

productos del metabolismo del colesterol por los macrófagos. Una vez que el colesterol es transferido a HDL, se requiere que el hígado lo tome para completar el proceso TRC. Existen dos vías hepáticas principales en este proceso: el colesterol HDL puede ser tomado de manera selectiva por el hígado, vía el receptor tipo BI (SR-BI), una vía muy importante en los roedores la cual no tiene CETP de manera natural. Y una segunda vía en humanos y otras especies que se expresan para CETP e involucra la transferencia de CE vía CETP a lipoproteínas que contienen apoB, las cuales son tomadas por el hígado. Esta vía puede ser importante, particularmente en los humanos, para la adquisición en el hígado de HDL derivada de CE. A pesar de que la promoción del flujo de colesterol y TRC podría ser el mecanismo principal por el cual HDL protege contra la aterosclerosis, durante la última década ha habido un crecimiento sustancial en el interés de otras propiedades de HDL que puedan ser atero-protectoras. Esto incluye las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de HDL,³⁴ así como los efectos promotores de óxido nítrico endotelial y anti-trombótico de HDL.³⁵ A pesar del concepto de que las partículas de HDL tienen un sinfín de propiedades que protegen contra la aterosclerosis, y que estas funciones no necesariamente pueden ser inferidas a partir de la medición de las concentraciones plasmáticas de HDL, se ha favorecido el interés en los ensayos de sus subfracciones y de la función de la misma para afinar la evaluación del riesgo asociado a HDL.

Heterogeneidad y medición de las subfracciones de HDL

HDL es una macromolécula compleja formada por lípidos (fosfolípidos y colesterol libre no esterificado en la superficie, y ésteres de colesterol y triglicéridos en el centro) y proteínas (apolipoproteínas y una variedad de otras proteínas en pequeñas cantidades). Subfracciones múltiples de HDL basadas en su densidad, tamaño, carga y composición pueden identificarse en el plasma. Un tema de considerable interés es conocer si las subfracciones específicas de HDL le dan una mayor habilidad para predecir el riesgo cardiovascular que la HDL por sí sola, o puede ser de mayor utilidad en evaluar los beneficios de una intervención terapéutica dirigida hacia ella. Los pacientes con enfermedad coronaria generalmente tienen pequeñas partículas más densas de HDL, lo que nos lleva a pensar que partículas más grandes de HDL pueden estar asociadas con una protección mayor de EC. Sin embargo, los datos que indican esta habilidad

predictiva de las subclases de HDL para el riesgo a EC, no son convincentes.

El método clásico para la separación de las subfracciones de lipoproteínas es la densidad. En 1951, Lindgren y cols. primero identificaron 2 subespecies por ultracentrifugación analítica basada en su optimismo.³⁶ HDL₂, la cual tiene un rango de densidad de 1.063–1.125 g/mL, comprende las partículas más grandes y ricas en colesterol y la HDL₃, la cual representa el rango de 1.125–1.210 g/mL, comprende las partículas pequeñas y pobres en lípidos. Harvel y cols, primero describieron la separación de lipoproteínas por ultracentrifugación repetitiva, después incrementaron progresivamente la densidad del solvente.³⁷ Estas fracciones de lipoproteínas fueron divididas en los siguientes grupos de densidad: <1.019, 1.019 – 1.063, y >1.063, los cuales más tarde se llamaron lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL), y de alta densidad (HDL), respectivamente. El gradiente de densidad en la ultracentrifugación continúa siendo el estándar de oro para el aislamiento de las lipoproteínas, aun después de 50 años. Últimamente, métodos más convenientes como es la ultracentrifugación preparativa³⁸ o la precipitación diferencial han sido desarrolladas. La ultracentrifugación preparativa produce HDL₃ después de un solo centrifugado a una densidad de 1.125, y la HDL₂ se calcula como la diferencia entre HDL total y HDL₃. En la precipitación selectiva de HDL, las subfracciones HDL₂, y HDL₃, fueron desarrolladas como el método analítico que consumía menos tiempo.³⁹ Este método no requiere de ningún equipo especializado y un número relativamente grande de muestras plasmáticas pueden ser procesadas y analizadas al mismo tiempo.⁴⁰

La principal pregunta es si la separación por densidad de las subfracciones de HDL provee de más información con relación a los resultados cardiovasculares que midiéndola por sí misma como HDL-C. En general, existe aún la controversia con relación a si el efecto antiaterogénico de HDL puede atribuirse a una o a ambas fracciones de HDL, y cuál es la importancia relativa del colesterol HDL₂ y HDL₃. En el estudio Kupio⁴¹ y en el estudio de los Suburbios de la ciudad de Québec,⁴² HDL₂ resultó estar inversamente asociada con la EC. La HDL₃ tuvo una asociación inversa muy fuerte con EC en el estudio *Physician's Health Study*,⁴³ así como en los grupos de estudio del CAE Philly y el estudio Speedwell tras 5 años de seguimiento,⁴⁴ y en el estudio Caerphilly con 9 años de seguimiento.⁴⁵ Los resultados de estos estudios no proveen una evidencia concluyente en la utilidad de

la medición rutinaria de las fracciones de HDL en la estratificación del riesgo para EC. La diferencia en los resultados de varios estudios puede ser atribuida a los diferentes métodos utilizados, la variación étnica, o la heterogeneidad probable de las subfracciones con funciones fisiológicamente diferentes. El método vertical de autoperfil (VAP) es una técnica de ultracentrifugación de gradiente de densidad zonal de velocidad invertida, con *spin* vertical sencillo, que separa todas las lipoproteínas en <1 h.⁴⁶ El análisis VAP puede realizarse en menos tiempo que otros métodos porque usa un rotor vertical en el cual las lipoproteínas se separan a través del eje horizontal corto del tubo de la centrífuga en vez del eje vertical largo, como en la ultracentrifugación secuencial, la cual generalmente usa rotores de camisas en columpio. El método VAP es una prueba sensible para la comprensiva medición de las principales subclases de HDL. Existen pocos datos, sin embargo, se han asociado las diferentes subfracciones de HDL, evaluadas por el método VAP, a eventos cardiovasculares. El método VAP, comercializado como Atherotech, está al acceso para los clínicos en varios laboratorios de referencia como una prueba de servicio al costo.

Las subfracciones de HDL pueden separarse también con base en su tamaño. El método original para la separación por tamaño fue electroforesis por gradiente de gel de poliacrilamida no-desnaturalizado (EGG) en conjunto con la densitometría automatizada.⁴⁷ Una revisión completa y detallada del EGG de poliacrilamida para la determinación por tamaño de lipoproteínas, incluyendo HDL, fue publicada recientemente.⁴⁸ Aunque los métodos están bien establecidos y son reproducibles, hay poca información que sugiere que las subclases de HDL determinadas por el EGG poliacrilamida sean más predictoras de EC que las concentraciones de HDL-C. La EGG comercializada por el laboratorio *Berkeley Heart*, también está al acceso a los clínicos como un servicio por prueba al costo.

La carga es otra propiedad importante que se ha usado para separar las subclases de HDL. La electroforesis de lipoproteínas no-desnaturalizada se ha usado por décadas como una técnica estándar en el laboratorio para separar analíticamente las proteínas, donde HDL migra como una banda α . La separación de HDL por electroforesis bidimensional (en donde se incorpora la separación sobre la base del tamaño, además de la carga) ha revelado heterogeneidad adicional, con pre- β 1, pre- β 2, y pre- α HDL, además de las especies α -migrantes.⁴⁹ La electroforesis bidimensional ha sido usada para resolver por lo menos

12 distintas subpoblaciones de HDL conteniendo apoA-I. Una correlación fuertemente negativa se ha observado entre las partículas grandes y ricas en colesterol α -1 y EC.⁵⁰ En el estudio *Framingham Offspring*,⁵¹ los casos de EC tuvieron una mayor concentración de partículas pre- β -1 y α -3 y menor concentración de partículas α -1, pre- α -3, y pre- α -1. Las concentraciones α -1 y pre- α -3 están inversamente asociadas, mientras que las partículas α -3 y pre- α -1 tienen una asociación positiva con la prevalencia de EC después de ajustar los datos de factores de riesgo establecidos para EC. La HDL α -1 fue la más significativamente asociada a la EC, y por cada miligramo por decilitro que aumentó la concentración de la partícula α -1, disminuyó la EC en un 26% ($p < 0.0001$). También se observaron correlaciones significativas negativas en el estudio *HDL-Atherosclerosis Treatment*⁵⁰ y en el estudio VA-HIT.⁵² Contrariamente, el estudio VA-HIT demostró una correlación significativamente positiva entre los eventos EC y las concentraciones de α -3, y en la pequeña, partículas pre- β -1 pobres en lípidos.⁵²

La espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN) es otro método rápido para estimar las subfracciones de HDL.⁵³ Cada subclase de HDL emite señales distintas en el RMN, las cuales tienen aptitudes individuales que pueden ser medidas con exactitud, y estas amplitudes son directamente proporcionales al número de subclases de partículas que emiten una señal, independientemente de la variación en la composición de la partícula. Las partículas de HDL cuantificadas por RMN son subclasicadas en tres clases de tamaños, grande, mediana y pequeña. Los datos publicados indican una relación de las subclases de HDL, estimadas a través de RMN, con el riesgo de EC. En el estudio de intervención con estatin en las arterias coronarias y la limitación de pravastatina en la aterosclerosis (*Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries statin intervention trial*),⁵⁴ la concentración de las partículas grandes y pequeñas de HDL estuvieron inversamente asociadas con la progresión de la enfermedad arterial coronaria documentada a través de la angiografía, independientemente del HDL-C y de otros lípidos. En el estudio VA-HIT,⁵⁵ las mediciones de las concentraciones de las partículas totales y pequeñas de HDL por RMN fueron predictoras independientes de recurrencia de enfermedad cardiovascular. En el estudio multiétnico de aterosclerosis, el número total de partículas HDL estuvo fuertemente asociado con la aterosclerosis de la carótida que HDL-C.⁵⁶ Un estudio recientemente reportado presentó el caso del tamaño de las partículas de HDL y el riesgo a la en-

fermedad cardiovascular por análisis de la relación entre el tamaño de las partículas de HDL-C y HDL (estimadas a través de RMN) para el riesgo de enfermedad cardiovascular después de controlar por apoA-I y apoB.⁵⁷ Interesantemente, aunque el tamaño de las partículas de HDL-C y HDL son generalmente inversamente proporcionales con el riesgo de enfermedad cardiovascular, una vez que los resultados fueron controlados por apoA-I y apoB, los niveles más altos de las partículas de HDL-C y HDL se encontraron positivamente asociados con los eventos de EC. El análisis de lipoproteínas por RMN, comercializada por *Liposcience*, está al acceso del clínico como una prueba de servicio al costo.

Composición de apolipoproteína y otras proteínas de HDL

La proteína más abundante de HDL, apoA-I, puede ser cuantificada actualmente en el plasma usando una variedad de inmunoensayos. Una importante pregunta es si las concentraciones plasmáticas de apoA-I son más predictivas de EC que las concentraciones de HDL-C, aunque es difícil de estimar estadísticamente por la correlación tan estrecha entre apoA-I y HDL-C. No obstante, un gran número de estudios prospectivos poblacionales han sugerido que las concentraciones de apoA-I pueden ser más predictivas de futuros eventos cardiovasculares que las concentraciones de HDL-C.⁵⁸ Más aún, a pesar de que el análisis de datos fue controlado para HDL-C, apoA-I aún tuvo una asociación inversamente continua con el riesgo de enfermedad cardiovascular.⁵⁷ Es posible que las concentraciones de apoA-I puedan ser superiores para HDL-C en la predicción de riesgo cardiovascular, pero esta forma de aproximación no ha sido aún incorporada a las guías nacionales. Así mismo, nuevas intervenciones terapéuticas que aumentan la concentración de apoA-I podrían ser superiores a aquellas que primariamente aumentaron las concentraciones de HDL-C, pero esta superioridad es teórica por ahora.

La segunda proteína más abundante en HDL es la apoA-II, aunque existe controversia sobre el papel de apoA-II en el riesgo cardiovascular. Un estudio de casos y controles anidado en el gran estudio de Investigación Prospectiva Europea en Cáncer y Nutrición en Norfolk (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition in Norfolk trial*), demostró que las concentraciones plasmáticas de apoA-II estaban fuerte e inversamente correlacionadas con los eventos de EC, incluso después de ajustarlos por los fac-

tores de riesgo cardiovascular tradicionales y concentraciones de HDL-C y apoA-I.⁵⁹ Así el concepto, basados en estudios en ratones,⁶⁰ de que apoA-II pudiera ser proaterogénica no apoya la evidencia epidemiológica en humanos.

HDL se puede separar en 2 subclases primarias de acuerdo con la composición de sus principales apolipoproteínas, aquellas que contienen solamente apoA-I (LpA-I) y las que contienen ambas, apoA-I y apoA-II (LpA-I:A-II).^{61,62} En la mayoría de la gente, LpA-I es aproximadamente un tercio y LpA-I:A-II es aproximadamente dos tercios del total de HDL.⁶³ LpA-I se encuentra más en HDL₂, mientras que LpA-I:AII, se encuentra más en HDL₃.⁶⁴ Con relación a si alguna de estas partículas es más predictiva de EC, hay una variedad considerable de estudios reportados. Algunos estudios muestran que los individuos que tienen EC presentan solamente una reducción en LpA-I,^{43,65} mientras que otros reportan reducciones en ambas LpA-I y LpA-I:AII.⁶⁶⁻⁶⁸ En el estudio *Framingham Offspring* y el VA-HIT,⁶⁹ la cuantificación de las subclases de HDL LpA-I y LpA-I:A-II por electroinmunoensayo diferencial en los participantes masculinos, no provee información adicional sobre el riesgo de EC, comparado con las mediciones de lípidos tradicionales.

Las partículas de HDL llevan un número grande de proteínas adicionales de considerable baja abundancia comparado con apoAI y apoA-II. Otras apolipoproteínas que se conocen bien y están asociadas con HDL incluyen a apoA-IV; apoC-I, C-II, y C-III, y apoE. La mayoría de estas apolipoproteínas son altamente intercambiables y pueden también estar asociadas con lipoproteínas que contienen apo-B. Aunque la medición de la concentración total en plasma de estas apolipoproteínas no es específica en cuanto al contenido, con respecto a la fracción de HDL *per se*, estas mediciones se pueden obtener primero por precipitación de lipoproteínas que contienen apoB y después midiendo la apolipoproteína de interés en el sobrenadante. De hecho, esta forma fue usada para demostrar que HDL –apoC-III, era un determinante importante de la progresión de la aterosclerosis.⁷⁰

Basándose en este reconocimiento de que HDL contiene muchas proteínas, se han desarrollado formalmente análisis proteómicos de HDL. Una publicación reciente determina que un gran número de proteínas involucradas en la inflamación, la regulación complementaria y la inmunidad innata están fisiológicamente unidas a HDL humana.⁷¹ Estas observaciones refuerzan el concepto de que HDL está involucrada como componente de manera innata en el sistema inmune. Un ejemplo elegante de este fenóme-

no es la demostración de que HDL sirve de plataforma para el ensamblaje de un complejo contenido apoL-I y la proteína relacionada con haptoglobina (ambas encontradas en el estudio proteómico) que es altamente lítica para una especie de tripanosoma.⁷² La composición proteica de HDL varía considerablemente entre los individuos, lo que es consistente con las diferencias en la función de HDL entre los individuos (ver más adelante). Uno espera que las cuantificaciones específicas de la concentración de proteína HDL puedan finalmente permitir enlaces que estén funcionalmente y además asociados con el riesgo a la aterosclerosis.

Estimación del flujo y del transporte reverso de colesterol por el laboratorio

Se han descrito varias propiedades de HDL que pueden contribuir a la antiheterogeneidad y efectos cardioprotectores de HDL (Figura 2). La hipótesis más popular, sin embargo, es que HDL y apoA-I protegen contra la aterosclerosis, por lo menos en parte, al promover el flujo de colesterol de las células, particularmente a través de la vía de los macrófagos que contienen colesterol, en la pared arterial, facilitando el proceso de TRC, y el transporte del colesterol al hígado por medio de la excreción en la bilis y finalmente en las heces. Si el TRC es un importante mecanismo de ateroprotección por HDL, está por establecerse aún de manera concluyente. Sin embargo, ha habido un gran interés últimamente para entender la regulación molecular de esta vía. Los estudios de muchos laboratorios han confirmado que el papel del TRC no siempre correlaciona con la concentración en plasma

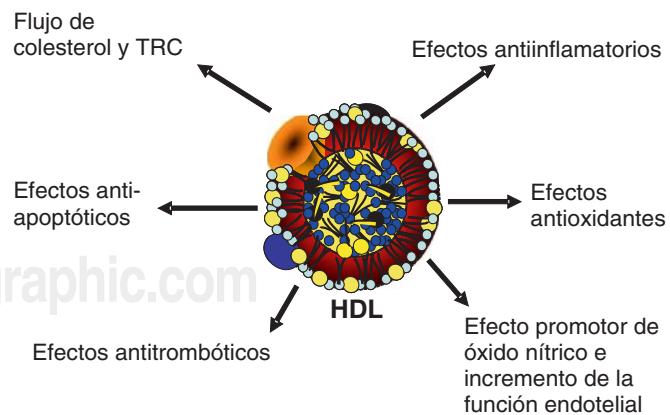


Figura 2. Varias propiedades antiaterogénicas de HDL. TRC: transporte reverso de colesterol.

de HDL-C y apoA-I, lo que indica que las mediciones de TRC o sus componentes pueden proveer de información clínica importante más allá de la que se obtiene con HDL-C y apoA-I. Con relación a la aterosclerosis, el tipo de célula más importante para mediar el flujo de colesterol, es el macrófago, y por ello, la regulación molecular del flujo de colesterol por el macrófago ha sido de particular interés. Esta sección se enfoca a los ensayos de laboratorio que pueden proveer de información sobre la función del HDL con relación al flujo de colesterol por el macrófago o TRC como promotor.

Capacidad de flujo del colesterol

La mejor de las funciones reconocidas de HDL y apoA-I, por ser ateroprotectoras, es el impulso del flujo del colesterol de las células, particularmente macrófagos, ya que son las células primarias que acumulan el colesterol dentro de la placa aterosclerótica. Ha habido una investigación importante sobre el mecanismo molecular por el cual los macrófagos eliminan el colesterol. El transportador ABCA1 promueve el flujo del colesterol a apoA-I pobre en lípidos, o pre-HDL, como un aceptor.⁷³ Los macrófagos del ratón ABCA1-*knockout* sustancialmente han disminuido el flujo del colesterol a apoA-I pobre en lípidos, y el trasplante de médula ósea deficiente en ABCA1 resultó en un aumento significativo de aterosclerosis.⁷⁴ Recientemente, otro gen miembro de la familia ABC, ABCG1, fue identificado como un promotor del flujo de colesterol del macrófago a partículas maduras de HDL,^{75,76} la forma más abundante de HDL en plasma. Así, ABCA1 y ABCG1 actúan cooperando *in vivo* para promover el flujo de colesterol por los macrófagos y TRC,⁷⁷ lo que es consistente con una observación reciente de que el ratón deficiente en macrófagos ABCA1 y ABCG1 desarrolle de manera marcada una aterosclerosis acelerada.⁷⁸ Aunque SR-B1 ha mostrado facilitar *in vitro* el flujo de colesterol de los macrófagos a HDL madura,⁷⁹ su papel de mediador de TRC en macrófagos *in vivo*, probablemente no tiene importancia cuantitativa.⁷⁷ Los niveles de expresión ABCA1 y ABCG1 están regulados por receptores hepáticos nucleares X α y β .⁸⁰ Un receptor sintético hepático X agonista significativamente promueve el TRC de los macrófagos *in vivo*, a pesar de tener poco efecto en la concentración de HDL plasmática;⁸¹ los receptores hepáticos sintéticos X también han mostrado que inhiben o causan regresión de la aterosclerosis.⁸²⁻⁸⁴

Concentraciones altas de HDL-C circulante han sido consideradas por mucho tiempo como los mejo-

res indicadores de la promoción del flujo del colesterol celular, y por lo tanto, un gran ateroprotector. Sin embargo, las inconsistencias en la relación de las condiciones genéticas en el metabolismo de HDL a aterosclerosis, así como la experiencia con tocetrapid, un inhibidor de CETP, ha hecho que esta propuesta sea cuestionada. De hecho, hay una variación considerable entre los individuos con concentraciones similares de HDL-C con respecto a la habilidad de su suero para promover el flujo de colesterol *ex vivo*,^{85,86} y alguna evidencia de que aun después de la normalización, algunas partículas de HDL son más efectivas para promover este flujo que otras.⁸⁷ Así, la habilidad de analizar el suero humano o el HDL aislado sobre la base de su capacidad de flujo es un método importante para determinar la funcionalidad del HDL y estimar las diferencias entre los individuos o en respuesta a terapias novedosas. Los ensayos desarrollados se han aplicado en la investigación. Las células (a menudo los macrófagos) se marcan con 3 H-colesterol y después expuestos a suero diluido, suero sin lipoproteínas que contienen apoB, o HDL aislada por un período de tiempo definido, después del cual el conteo en el medio, así como el conteo remanente en las células-asociadas, se determinó y se usó para la cuantificación del porcentaje de flujo.⁸⁸ Otra forma se basa en la concentración en masa del colesterol en vez que como trazador, e involucra la cuantificación de la masa del colesterol que aumenta en el medio después de una incubación con el aceptor.⁸⁷ Una tercera forma es la habilidad del suero para disminuir el colesterol celular que está disponible para la esterificación por la actividad de la acilCoA:colesterol acil transferasa, como una medida indirecta del flujo de colesterol.⁸⁹ Hay múltiples variables en estos ensayos, incluyendo el tipo de célula del donador, la naturaleza del aceptor (por ej. suero total, suero apoB disminuido, o HDL aislado), la lectura (por ej. el trazador de colesterol, la masa de colesterol, o indicadores indirectos como la habilidad de la acil CoA:colesterol acil transferasa) y las vías de flujo del colesterol que son analizadas (por ej. ABCA1, ABCG1, SR-B1, o la difusión pasiva).

El uso de la cuantificación de la capacidad del flujo de colesterol va en aumento en los estudios preclínicos^{85,90-92} para estimar los efectos de la manipulación genética o del tratamiento farmacológico sobre la capacidad del flujo independiente de las concentraciones de HDL-C. La aplicación en estudios humanos ha sido menos común pero esto va en aumento. En un pequeño estudio usando fibroblastos como la célula donadora y suero de hombres que

tenían angiografía coronaria como el aceptor, la supresión de fibroblastos del *pool* disponible de acil CoA:colesterol acil transferasa, pero no del flujo total del trazador de colesterol marcado, demostró estar relacionado con los eventos cardiovasculares.⁸⁶ La HDL aislada de pacientes con deficiencia de CETP mostró ser más efectiva en promover el flujo de colesterol que HDL de individuos sanos,⁸⁷ y la HDL de individuos tratados con una alta dosis de inhibidor torcetrapid de CETP, resultó ser más efectiva en promover el flujo.⁹³

Las mediciones en suero de la capacidad del flujo del colesterol o HDL son muy atractivas desde el punto de vista conceptual y tiene la potencialidad de desarrollarse como una herramienta del laboratorio clínico para estimar el riesgo y la evaluación de la eficacia farmacológica. Sin embargo, se necesita hacer un trabajo sustancioso para relacionar las mediciones de la capacidad del flujo con la enfermedad cardiovascular prevalente y prospectivamente con los resultados cardiovasculares, y para determinar si las asociaciones son independientes de las concentraciones en plasma de HDL-C ó apoA-I.

Esterificación de colesterol por LCAT

La vía clásica TRC involucra la esterificación del colesterol expulsado antes de su transporte al hígado.⁹⁴ La LCAT es una enzima asociada a lipoproteína responsable de esterificar el colesterol libre a CE dentro del compartimiento plasmático. Una deficiencia en LCAT está asociada a una disminución marcada de las concentraciones de HDL-C, mientras que la sobreexpresión de LCAT en el ratón y en los conejos, marcadamente aumentan las concentraciones de HDL-C. El CE hidrofóbico se mueve al centro de la partícula de HDL, contribuyendo al alargamiento progresivo de la molécula. Este proceso también remueve colesterol libre de la superficie de HDL, lo que ayuda al mantenimiento del gradiente de colesterol libre de las células a HDL.⁹⁵ Aunque el aumento de la actividad de LCAT también se ha pensado sea ateroprotectora, no hay datos adecuados que apoyen esto. Los pacientes con deficiencia de LCAT no desarrollan aterosclerosis acelerada, pero se ha reportado que la función disminuida de LCAT está asociada con un aumento de IMT en la carótida.⁹⁶ Así, en teoría, la medición de la actividad de LCAT en plasma puede ser una prueba funcional que provea de una predicción adicional sobre el riesgo cardiovascular. Sin embargo, los métodos para medir la actividad de LCAT no están estandarizados. Una forma incluiría la incu-

bación de un sustrato exógeno de apoA-I/fosfolípidos contenido colesterol libre marcado con plasma, seguido de una separación del colesterol libre y esterificado y la determinación del porcentaje de colesterol esterificado. Este ensayo, comúnmente llamado ensayo de actividad para LCAT, correlaciona mejor con las mediciones de la masa de LCAT. Una segunda posibilidad involucra la mezcla directa de colesterol libre marcado con plasma, seguida de una incubación, separación, y determinación del porcentaje de colesterol esterificado. Este ensayo, comúnmente llamado relación del colesterol esterificado, es mucho más dependiente del estado metabólico y de la distribución de las lipoproteínas.

Ninguno de estos ensayos ha sido aplicado en gran escala a estudios humanos para discutir la relación de la actividad de LCAT o la velocidad de esterificación del colesterol para la enfermedad cardiovascular prevalente o en otros resultados. Tal vez, los ensayos más estudiados relacionados con CLAT en humanos son conocidos como la velocidad de esterificación fraccional de HDL (FER_{HDL}). Ésta es una prueba funcional que mide la velocidad de esterificación mediada por LCAT de colesterol libre específicamente para HDL en plasma sin lipoproteínas que contienen apoB. En un modelo logístico multivariado, FER_{HDL} fue un significante predictor de la presencia definida angiográficamente de enfermedad de arterias coronarias.⁹⁷ Las partículas más pequeñas de HDL tienen la velocidad de esterificación más rápida, mientras que en las partículas más grandes, es la más lenta.⁹⁸ Por ello, FER_{HDL} actúa como una medida indirecta del tamaño de la partícula de lipoproteínas. Si un ensayo estandarizado de masa de LCAT fuera desarrollado, esta aproximación sería fácilmente aplicada a grandes estudios poblacionales para determinar si la masa LCAT predice los eventos cardiovasculares independientemente de las concentraciones de HDL-C y apoA-I. Es posible entonces, que las mediciones de la masa de LCAT o de su actividad pudieran ser otra manera más para estimar la función de HDL en predecir el riesgo cardiovascular.

Transferencia del éster de colesterol por CETP

CETP regula el transporte de ésteres de colesterol de HDL a lipoproteínas que contienen apoB en intercambio por triglicéridos. Porque las lipoproteínas que contienen apoB son principalmente catabolizadas por el hígado, la vía del CETP puede ser una ruta importante por la cual el HDL derivado del co-

lesterol es transportado de regreso al hígado en los humanos.⁹⁹ Por otro lado, la actividad de CETP resulta en la disminución de la concentración de HDL-C, y en una variación genética en la proteína de transferencia del éster de colesterol, el gen en plasma (*CETP*) es una importante fuente de variación en las concentraciones de HDL-C en los humanos. Así que hay un debate actualmente sobre si CETP es pro- o antiaterogénica, un tema claramente importante sobre el aspecto del desarrollo de inhibidores CETP. Varios estudios publicados han considerado la asociación entre las concentraciones de masa de la proteína CETP en plasma y los hallazgos en EC. Una alta concentración de proteína CETP se asoció de manera cruzada seccionalmente con EC,¹⁰⁰ mayor progresión angiográfica de enfermedad de arteria coronaria,¹⁰¹ un gran progreso del IMT de la carótida,¹⁰² y en jóvenes, un primer infarto agudo al miocardio.¹⁰³ En la investigación Prospectiva Europea de Cáncer y Nutrición de Norfolk, las altas concentraciones de masa de CETP se asociaron de manera prospectiva con un mayor riesgo con eventos cardiovasculares, pero sólo en individuos con concentraciones altas de triglicéridos.¹⁰⁴ Los resultados de otros estudios, sin embargo, no apoyan el que la masa de CETP sea un factor de riesgo positivo en la EC.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ La actividad de CETP potencialmente podría ser más informativa que la masa, porque es más fácil incluir otros factores que puedan influenciar la relación del transporte de CETP más allá de la masa de CETP por sí misma, pero los ensayos son difíciles de realizar y muy laboriosos. Sólo en un número pequeño de estudios, una alta actividad de CETP se asoció con un aumento de la aterosclerosis o el riesgo cardiovascular.^{103,108,109} Estudios adicionales de la correlación de ambas, la masa de CETP y la actividad del riesgo para EC son necesarios. Permanece factible que el ensayo para CETP pueda ayudar a refinar la valoración del riesgo cardiovascular independientemente de las concentraciones de HDL-C.

Evaluación por el laboratorio de las funciones antioxidantes y antiinflamatorias de HDL

En la pasada década, se ha descubierto que HDL tiene propiedades más allá de la promoción del flujo de colesterol que puede contribuir a sus efectos antiaterogénicos (*Figura 2*). En particular, los estudios de varios laboratorios han identificado los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de HDL como una función potencialmente importante.

Actividad paraoxonasa y capacidad antioxidante de HDL

La paraoxonasa (PON1) es una esterasa/lactonasa asociada a HDL, la cual deriva su nombre de uno de sus sustratos más comúnmente usados *in vitro*, paraoxon. La PON1 hidroliza una variedad de lípidos oxidados y modificados. Se cree que su actividad corresponde por lo menos con algo de la actividad antioxidante de HDL. La PON1 protege ambos, HDL y LDL contra la peroxidación de lípidos.^{110,111} La actividad de PON1 puede ser medida usando varios ensayos diferentes, pero es más comúnmente cuantificada a través de monitorear la formación del *p*-nitrofenol del sustrato paraoxon.¹¹² Una disminución del tamaño de la lesión se observó en ratones transgénicos con PON1 humana, y una acelerada aterosclerosis fue vista en ratones PON1 knockout.^{113,114} En humanos, la actividad PON1 está inversamente relacionada con el riesgo de enfermedades cardiovasculares. En el estudio prospectivo *Caerphilly*, la actividad de PON1 predijo los eventos coronarios independientemente de cualquier otro factor de riesgo coronario, incluyendo HDL-C.¹¹⁵ El D-4F, un péptido que semeja la apoA-I, aumentó la actividad de paraoxonasa en ratones sin receptores LDL después de una dieta occidental y después de una infección por influenza.¹¹⁶ Así, la actividad de PON1 podría desarrollarse como un biomarcador de la función de HDL y del riesgo cardiovascular independiente de las concentraciones de HDL-C.

HDL tiene la habilidad para inactivar los fosfolípidos oxidados, en parte debido a la actividad de PON1, pero potencialmente también debido a otras enzimas o propiedades de HDL. Por ello, un ensayo integrado de la capacidad antioxidante de HDL sería de interés para la investigación y tendría una aplicación potencial en la clínica. Así, el ensayo de célula-libre usa diclorofluoresceína como resultado de la fluorescencia de los productos de oxidación de los lípidos.¹¹⁷ Los fosfolípidos oxidados y la diclorofluoresceína se agregan al HDL y se incuban, el grado de fluorescencia es proporcional a la habilidad de la HDL para inactivar los fosfolípidos oxidados. Este enfoque, el cual requiere de la estandarización y de más validación, tiene el potencial para permitir una estimación global de la función antioxidante de HDL.

Propiedades antiinflamatorias de HDL estimadas por la inhibición de la adhesión endotelial de la expresión molecular

Las citocinas inducen a las células endoteliales para que regulen la adhesión de moléculas designadas

para unir los leucocitos circulantes y promover la entrada a su área. Se ha mostrado que la HDL inhibe la regulación de la estimulación de las citocinas a la adhesión endotelial de las moléculas.³⁴ Este método básico involucra la incubación de células endoteliales con HDL, seguida de la estimulación con una citocina proinflamatoria, y la cuantificación de la adhesión de las moléculas, como por ejemplo, la adhesión celular vascular de la molécula-1.

Los modelos preclínicos demuestran una utilidad potencial en este método para conocer la eficacia de las intervenciones terapéuticas.³⁴ Lo limitado de la información sugiere que hay sustancialmente una variabilidad interindividual entre los humanos en su habilidad para aislar HDL e inhibir la adhesión de la expresión molecular endotelial que es independiente de las concentraciones de HDL-C. Un estudio en humanos mostró que una dieta en grasa saturada significativamente disminuía, y una dieta en grasa poliinsaturada aumentaba la habilidad de HDL aislada para suprimir la expresión endotelial inducida del factor de la necrosis tumoral α de la molécula-1 de adhesión intracelular y la molécula-1 de adhesión a células vasculares.¹¹⁸ Este ensayo basado en células será difícil de estandarizar, y claramente necesita ser validado con relación a la correlación con la enfermedad aterosclerótica y la predicción de los eventos cardiovasculares independientes de las concentraciones de HDL-C. Sin embargo, parece ser una medida robusta de la función antiinflamatoria de HDL y puede proveer también información valiosa.

Otras propiedades potencialmente antiaterogénicas de HDL

Se ha mostrado que HDL tiene propiedades adicionales que pueden contribuir con sus efectos antiaterogénicos (*Figura 2*). Éstos incluyen la habilidad para estimular la producción de óxido nítrico endotelial y así aumentar la función endotelial.^{35,119} Datos observacionales son consistentes con la asociación inversa entre las concentraciones de HDL-C y la medición de la función endotelial.^{120,121} El mecanismo de este efecto parece ser dependiente de la SR-BI endotelial y podría involucrar al flujo del colesterol como el mecanismo principal.³⁵ La variación interindividual en la promoción de la producción de óxido nítrico por el HDL no se conoce, pero el concepto de establecer un ensayo basado en el endotelio para estimular la producción de óxido nítrico por el HDL es muy atractiva. Algunos datos sugieren que el efecto promotor de óxido nítrico de la HDL es parcialmente dependiente de un

receptor lisofosfolípido endotelial esfingosina-1 fosfato,^{3,122} lo que sugiere que el contenido en HDL de lisofosfolípidos esfingosina-1-fosfato podría servir como un sucedáneo cuantitativo para la función de promoción de óxido nítrico de HDL. Este es un ejemplo potencial de una de las direcciones que tiene este campo, lo cual llevaría a la identificación y a la medición confiable de sucedáneo basados en masa confiables de la función de HDL. Por otro lado, la HDL también ha mostrado tener propiedades antitrombóticas³⁵ que involucran efectos sobre el sistema de la coagulación así como de las plaquetas. Las mediciones de las propiedades anticoagulantes de HDL serían muy laboriosas y potencialmente serían objeto de una sustancial variación en los ensayos. Idealmente, ésta y otras funciones de HDL tendrían uno o más sucedáneos basados en masa que correlacionarían mucho con la función y podrían ser medidos como un perfil para ganar más información en un intervalo de las propiedades funcionales de HDL.

Las concentraciones de HDL-C plasmáticas, mientras que epidemiológicamente predicen eventos cardiovasculares ateroscleróticos en grandes poblaciones, son insuficientes para capturar la variación funcional de las partículas de HDL y el riesgo cardiovascular asociado a HDL. Más aún, las concentraciones de HDL-C son claramente inadecuadas para estimar la potencial eficacia terapéutica de nuevas terapias para HDL. Se ha tenido sustancial progreso en el desarrollo de métodos robustos y reproducibles para estimar las subclases de HDL, y muchos de estos ensayos están al acceso en el mercado. Sin embargo, se carece de una información convincente para indicar que cualquier subfracción específica de HDL sea claramente más predictiva que el mismo HDL-C. La única excepción podría ser apoA-I, donde los datos sugieren que pudiera ser más predictiva que HDL-C. En contraste con lo robusto de la química clínica con respecto a las subfracciones de HDL, la estimación de la función de HDL por el laboratorio permanece en su etapa primaria. Los ensayos *in vitro* para la función de HDL han sido desarrollados por varios laboratorios de investigación, pero son laboriosos, no están estandarizados, y su validación es muy pobre con relación a los resultados obtenidos en humanos. Hay una gran necesidad de investigación en esta área y en particular en desarrollar métodos estandarizados que puedan usarse para aplicarlos en los grandes estudios poblacionales para probar si pueden predecir el riesgo independientemente de las concentraciones de HDL-C. La esperanza es que eventualmente los ensayos basados en masa puedan

ser desarrollados para que fielmente reflejen la multifuncionalidad de la partícula HDL. Finalmente, un panel de ensayos que reflejan la heterogeneidad y función puedan ser usados para predecir el riesgo cardiovascular; pero esta herramienta tendría que ser incorporada en las guías nacionales para estimar el riesgo de EC antes de que fueran aceptadas y usadas. Por otro lado, los ensayos para la función de HDL serán usados mucho antes para estimar tempranamente la eficacia potencial de nuevas terapias para HDL. Los ensayos robustos de laboratorio para medir la función de HDL y su validación con respecto a la predicción del riesgo cardiovascular y en respuesta a la intervención terapéutica, son críticamente importantes y de gran interés para las comunidades cardiovasculares, los químicos clínicos y los farmacéuticos.

REFERENCIAS

- Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, et al. Heart disease and stroke statistics—2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2006; 113: e85-151.
- Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoproteins—the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*. 1989; 321: 1311-6.
- Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis*. 1988; 8: 737-41.
- Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001; 285: 2486-97.
- Alsheikh-Ali AA, Lin JL, Abourjaily P, Ahearn D, Kuvin JT, Karas RH. Prevalence of low high density lipoprotein cholesterol in patients with documented coronary heart disease or risk equivalent and controlled low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol*. 2007; 100: 1499-501.
- Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and CV events. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1301-10.
- Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, Kastelein J. The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. [Review] *J Lipid Res*. 1997; 38: 191-205.
- Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, Weisgraber KH, Mahley RW. A-I Milano apoprotein: decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest*. 1980; 66: 892-900.
- Bruckert E, von Eckardstein A, Funke H, Beucler I, Wiesbusch H, Turpin G, Assmann G. The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of apolipoprotein A-I Milano. *Atherosclerosis*. 1997; 128: 121-8.
- Hobbs HH, Rader DJ. ABC1: connecting yellow tonsils, neuropathy, and very low HDL. *J Clin Invest*. 1999; 104: 1015-7.
- Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest*. 2006; 116: 3090-100.
- Manninen V, Elo MO, Frick MH, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, et al. Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *JAMA*. 1988; 260: 641-51.
- Robins SJ, Collins D, Wittes JT, Papademetriou V, Deedwania PC, Schaefer EJ, et al. Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001; 285: 1585-91.
- Goldenberg I, Goldbourt U, Boyko V, Behar S, Reicher-Reiss H. Relation between on-treatment increments in serum high-density lipoprotein cholesterol levels and cardiac mortality in patients with coronary heart disease (from the Bezafibrate Infarction Prevention trial). *Am J Cardiol*. 2006; 97: 466-71.
- Keech A, Simes RJ, Barter P, Best J, Scott R, Taskinen MR, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on CV events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomized controlled trial. *Lancet*. 2005; 366: 1849-61.
- The Coronary Drug Project Research Group. Clofibrate and niacin in coronary heart disease. *JAMA*. 1975; 231: 360-81.
- Canner PL, Berge KG, Wenger NK, Stamler J, Friedman L, Prineas RJ, Friedewald W. Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: long-term benefit with niacin. *J Am Coll Cardiol*. 1986; 8: 1245-55.
- Taylor AJ, Sullenberger LE, Lee HJ, Lee JK, Grace KA. Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. *Circulation*. 2004; 110: 3512-7.
- Brown BG, Zhao XQ, Chait A, Fisher LD, Cheung MC, Morse JS, et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *N Engl J Med*. 2001; 345: 1583-92.
- Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, Grasso AW, Schoenhagen, P Hu, T al. Statins, high-density lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis. *JAMA*. 2007; 297: 499-508.
- Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med*. 2004; 350: 1505-5.
- Clark RW, Sutphin TA, Ruggeri RB, Willauer AT, Sugarman ED, Magnus-Aryitey G, et al. Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 490-7.
- Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2109-22.
- Nissen SE, Tardif JC, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, et al. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2007; 356: 1304-16.
- Kastelein JJ, van Leuven SI, Burgess L, Evans GW, Kuivenhoven JA, Barter PJ, et al. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 2007; 356: 1620-30.

26. Rader DJ. Illuminating HDL: is it still a viable therapeutic target? *N Engl J Med.* 2007; 357: 2180-3.
27. TK, Krishna R, Anderson MS, Bergman AJ, Jin B, Fallon M, Cote J, et al. Effect of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor, anacetrapib, on lipoproteins in patients with dyslipidaemia and on 24-h ambulatory blood pressure in healthy individuals: two double-blind, randomized placebo-controlled phase I studies. *Lancet.* 2007; 370: 1907-14.
28. Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem.* 2001; 47: 1579-96.
29. Langlois MR, Blaton VH. Historical milestones in measurement of HDL-cholesterol: impact on clinical and laboratory practice. *Clin Chim Acta.* 2006; 369: 168-78.
30. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med.* 2006; 84: 276-94.
31. Linsel-Nitschke P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic CV disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 193-205.
32. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res.* 2005; 96: 1221-32.
33. Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E, Kluckman KD, Brumham LR, Mulya A, et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest.* 2005; 115: 1333-42.
34. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004; 95: 764-72.
35. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 2006; 98: 1352-64.
36. Lindgren FT, Elliott HA, Gofman JW. The ultracentrifugal characterization and isolation of human blood lipids and lipoproteins, with applications to the study of atherosclerosis. *J Phys Colloid Chem.* 1951; 55: 80-93.
37. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955; 34: 1345-53.
38. Kirstein P, Carlson K. Determination of the cholesterol content of high density lipoprotein subfractions HDL2 and HDL3, without contamination of Lp(a), in human plasma. *Clin Chim Acta.* 1981; 113: 123-34.
39. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg2-precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem.* 1982; 28: 1379-88.
40. Gidez LI, Miller GJ, Burstein M, Slagle S, Eder HA. Separation and quantitation of subclasses of human plasma high density lipoproteins by a simple precipitation procedure. *J Lipid Res.* 1982; 23: 1206-23.
41. Salonen JT, Salonen R, Seppanen K, Rauramaa R, Tuomilehto J. HDL, HDL2, and HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern Finnish men. *Circulation.* 1991; 84: 129-39.
42. Lamarche B, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Associations of HDL2 and HDL3 subfractions with ischemic heart disease in men: prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1098-105.
43. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1991; 325: 373-81.
44. Sweetnam PM, Bolton CH, Yarnell JW, Bainton D, Baker IA, Elwood PC, Miller NE. Associations of the HDL2 and HDL3 cholesterol subfractions with the development of ischemic heart disease in British men: the Caerphilly and Speedwell Collaborative Heart Disease Studies. *Circulation.* 1994; 90: 769-74.
45. Yu S, Yarnell JW, Sweetnam P, Bolton CH. High density lipoprotein subfractions and the risk of coronary heart disease: 9-years follow-up in the Caerphilly Study. *Atherosclerosis.* 2003; 166: 331-8.
46. Kulkarni KR. Cholesterol profile measurement by vertical auto profile method. *Clin Lab Med.* 2006; 26: 787-802.
47. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 1981; 665: 408-19.
48. Warnick GR, McNamara JR, Boggess CN, Clendenen F, Williams PT, Landolt CC. Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of lipoprotein subclasses. *Clin Lab Med.* 2006; 26: 803-46.
49. Asztalos BF, Sloop CH, Wong L, Roheim PS. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1169: 291-300.
50. Asztalos BF, Batista M, Horvath KV, Cox CE, Dallal GE, Morse JS, et al. Change in alpha1 HDL concentration predicts progression in coronary artery stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 847-52.
51. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 2181-7.
52. Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Bloomfield HE, et al. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent CV events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2185-91.
53. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Ottos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab Med.* 2006; 26: 847-70.
54. Rosenson RS, Ottos JD, Freedman DS. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial. *Am J Cardiol.* 2002; 90: 89-94.
55. Ottos JD, Collins D, Freedman DS, Shalaurova I, Schaefer EJ, McNamara JR, et al. Low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclasses predict coronary events and are favorably changed by gemfibrozil therapy in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Circulation.* 2006; 113: 1556-63.
56. Mora S, Szklo M, Ottos JD, Greenland P, Psaty BM, Goff DC Jr, et al. LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* 2007; 192: 211-7.
57. van der Steeg, WA, Holme I, Boekholdt SM, Larsen ML, Lindahl C, Stroes ES, et al. High density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for CV risk: the IDEAL and EPIC-Norfolk studies. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51: 634-42.
58. Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet.* 2001; 358: 2026-33.

59. Birjmohun RS, Dallinga-Thie GM, Kuivenhoven JA, Stroes ES, Ottos JD, Wareham NJ, et al. Apolipoprotein A-II is inversely associated with risk of future coronary artery disease. *Circulation*. 2007; 116: 2029-35.
60. Warden CH, Hedrick CC, Qiao J-H, Castellani LW, Lusis AJ. Atherosclerosis in transgenic mice over-expressing apolipoprotein A-II. *Science (Wash DC)*. 1993; 261: 469-72.
61. Fruchart JC, Ailhaud G. Apolipoprotein A-containing lipoprotein particles: physiological role, quantification, and clinical significance. *Clin Chem*. 1992; 38: 793-7.
62. Cheung MC, Albers JJ. Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition: particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II. *J Lipid Res*. 1982; 23: 747-53.
63. James RW, Hochstrasser D, Tissot JD, Funk M, Appel R, Barja F, et al. Protein heterogeneity of lipoprotein particles containing apolipoprotein A-I without apolipoprotein A-II and apolipoprotein A-I with apolipoprotein A-II isolated from human plasma. *J Lipid Res*. 1988; 29: 1557-71.
64. Atmeh RF, Shepherd J, Packard CJ. Subpopulations of apolipoprotein A-I in human high-density lipoproteins: their metabolic properties and response to drug therapy. *Biochim Biophys Acta*. 1983; 751: 175-88.
65. Puchois P, Kandoussi A, Fievet P, Fourrier JL, Bertrand M, Koren E, Fruchart JC. Apolipoprotein A-I containing lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1987; 68: 35-40.
66. Genest JJ Jr, Bard JM, Fruchart JC, Ordovas JM, Wilson PF, Schaefer EJ. Plasma apolipoprotein A-I, A-II, B, E and C-III containing particles in men with premature coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1991; 90: 149-57.
67. Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, Cambou JP, Amouyel P, Bingham A, et al. A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12: 701-7.
68. Buring JE, O'Connor GT, Goldhaber SZ, Rosner B, Herbert PN, Blum CB, et al. Decreased HDL2 and HDL3 cholesterol, Apo A-I and Apo A-II, and increased risk of myocardial infarction. *Circulation*. 1992; 85: 22-9.
69. Asztalos BF, Demissie S, Cupples LA, Collins D, Cox CE, Horvath KV, et al. LpA-I, LpA-I:A-II HDL and CHD-risk: the Framingham Offspring Study and the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Atherosclerosis*. 2006; 188: 59-67.
70. Blanckhorn DH, Alaupovic P, Wickham E, Chin HP, Azen SP. Prediction of angiographic change in native human coronary arteries and aortocoronary bypass grafts: lipid and nonlipid factors. *Circulation*. 1990; 81: 470-6.
71. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the anti-inflammatory properties of HDL. *J Clin Invest*. 2007; 117: 746-56.
72. Shiflett AM, Bishop JR, Pahwa A, Hajduk SL. Human high density lipoproteins are platforms for the assembly of multi-component innate immune complexes. *J Biol Chem*. 2005; 280: 32578-85.
73. Tall AR. Role of ABCA1 in cellular cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 710-1.
74. Haghpassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1315-20.
75. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 9774-9.
76. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, et al. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab*. 2005; 1: 121-31.
77. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, et al. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport *in vivo*. *J Clin Invest*. 2007; 117: 2216-24.
78. Yvan-Charvet L, Ranalletta M, Wang N, Han S, Terasaka N, Li R, et al. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*. 2007; 117: 3900-8.
79. Jian B, de la Llera-Moya M, Ji Y, Wang N, Phillips MC, Swaney JB, et al. Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J Biol Chem*. 1998; 273: 5599-606.
80. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med*. 2002; 8: 1243-8.
81. Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, et al. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport *in vivo*. *Circulation*. 2006; 113: 90-7.
82. Terasaka N, Hiroshima A, Koeyama T, Ubukata N, Morikawa Y, Nakai D, Inaba T. T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett*. 2003; 536: 6-11.
83. Joseph SB, McKilligan E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 7604-9.
84. Levin N, Bischoff ED, Daige CL, Thomas D, Vu CT, Heyman RA, et al. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 135-42.
85. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res*. 1999; 40: 781-96.
86. Chirinos JA, Zambrano JP, Chakko S, Schob A, Goldberg RB, et al. Ability of serum to decrease cellular acylCoA: cholesterol acyl transferase activity predicts CV outcomes. *Circulation*. 2005; 112: 2446-53.
87. Matsuura F, Wang N, Chen W, Jiang XC, Tall AR. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1435-42.
88. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Favari E, Yancey PG, Kellner-Weibel G. Cellular cholesterol flux studies: methodological considerations. *Atherosclerosis*. 2002; 163: 1-8.
89. Mendez AJ. Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an active cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion. *J Lipid Res*. 1997; 38: 1807-21.
90. Yancey PG, Kawashiri MA, Moore R, Glick JM, Williams DL, Connelly MA, et al. *In vivo* modulation of HDL phospholipid has opposing effects on SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2004; 45: 337-46.
91. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR, et al. Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. *Circulation*. 2004; 109: 3215-20.

92. Morehouse LA, Sugarman ED, Bourassa PA, Sand TM, Zimmetti F, Gao F, et al. Inhibition of CETP activity by torcetrapib reduces susceptibility to diet-induced atherosclerosis in New Zealand White rabbits. *J Lipid Res.* 2007; 48: 1263-72.
93. Yvan-Charvet L, Matsuura F, Wang N, Bamberger MJ, Nguyen T, Rinninger F, et al. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by torcetrapib modestly increases macrophage cholesterol efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 1132-8.
94. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation.* 2006; 113: 2548-55.
95. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res.* 1968; 9: 155-67.
96. Hovingh GK, Hutten BA, Holleboom AG, Petersen W, Rol P, Stalenhoef A, Zwinderman AH, et al. Compromised LCAT function is associated with increased atherosclerosis. *Circulation.* 2005; 112: 879-84.
97. Frohlich J, Dobiasova M. Fractional esterification rate of cholesterol and ratio of triglycerides to HDL-cholesterol are powerful predictors of positive findings on coronary angiography. *Clin Chem.* 2003; 49: 1873-80.
98. Dobiasova M, Adler L, Ohta T, Frohlich J. Effect of labeling of plasma lipoproteins with [³H]cholesterol on values of esterification rate of cholesterol in apolipoprotein B-depleted plasma. *J Lipid Res.* 2000; 41: 1356-7.
99. Schwartz CC, VandenBroek JM, Cooper PS. Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output *in vivo* in humans. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1594-1607.
100. Zhuang Y, Wang J, Qiang H, Li Y, Liu X, Li L, Chen G. Cholesteryl ester transfer protein levels and gene deficiency in Chinese patients with cardio-cerebrovascular diseases. *Chin Med J. (Engl).* 2002; 115: 371-4.
101. Klerkx AH, de Groot GJ, Zwinderman AH, Jukema JW, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ. Cholesteryl ester transfer protein concentration is associated with progression of atherosclerosis and response to pravastatin in men with coronary artery disease (REGRESS). *Eur J Clin Invest.* 2004; 34: 21-8.
102. de Groot GJ, Smilde TJ, Van Wissen S, Klerkx AH, Zwinderman AH, Fruchart JC, et al. The relationship between cholesteryl ester transfer protein levels and risk factor profile in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2004; 173: 261-7.
103. Zeller M, Masson D, Farnier M, Lorgis L, Deckert V, Pais de Barros JP, et al. High serum cholesteryl ester transfer rates and small high-density lipoproteins are associated with young age in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50: 1948-1955.
104. Boekholdt SM, Kuivenhoven JA, Wareham NJ, Peters RJ, Jukema JW, Luben R, et al. Plasma levels of cholesteryl ester transfer protein and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the prospective EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition)-Norfolk population study. *Circulation.* 2004; 110: 1418-23.
105. Goto A, Sasai K, Suzuki S, Fukutomi T, Ito S, Matsushita T, Okamoto, et al. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis in Japanese subjects: a study based on coronary angiography. *Atherosclerosis.* 2001; 159: 153-63.
106. Borggreve SE, Hillege HL, Wolffenbuttel BH, de Jong PE, Zuurman MW, van der Steege G, et al. An increased coronary risk is paradoxically associated with common cholesteryl ester transfer protein gene variations that relate to higher high-density lipoprotein cholesterol: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 3382-8.
107. Marschang P, Sandhofer A, Ritsch A, Fiser I, Kvas E, Patsch JR. Plasma cholesteryl ester transfer protein concentrations predict CV events in patients with coronary artery disease treated with pravastatin. *J Intern Med.* 2006; 260: 151-9.
108. Hibino T, Sakuma N, Sato T. Higher level of plasma cholesteryl ester transfer activity from high-density lipoprotein to apo B-containing lipoproteins in subjects with angiographically detectable coronary artery disease. *Clin Cardiol.* 1996; 19: 483- 6.
109. de Vries R, Perton FG, Dallinga-Thie GM, van Roon AM, Wolffenbuttel BH, et al. Plasma cholesteryl ester transfer is a determinant of intima-media thickness in type 2 diabetic and nondiabetic subjects: role of CETP and triglycerides. *Diabetes.* 2005; 54: 3554-9.
110. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1581-90.
111. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, et al. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1451-7.
112. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1983; 35: 1126-38.
113. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, et al. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2000; 275: 17527-35.
114. Tward A, Xia YR, Wang XP, Shi YS, Park C, Castellani LW, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation.* 2002; 106: 484-90.
115. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation.* 2003; 107: 2775-9.
116. Van Lenten BJ, Wagner AC, Anantharamaiah GM, Garber DW, Fishbein MC, Adhikary L, et al. Influenza infection promotes macrophage traffic into arteries of mice that is prevented by D-4F, an apolipoprotein A-I mimetic peptide. *Circulation.* 2002; 106: 1127-32.
117. Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, Fogelman AM. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res.* 2001; 42: 1308-17.
118. Nicholls SJ, Lundman P, Harmer JA, Cutri B, Griffiths KA, Rye KA, et al. Consumption of saturated fat impairs the anti-inflammatory properties of high-density lipoproteins and endothelial function. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48: 715-20.
119. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner, LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, et al. 2001. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 7: 853-7.

120. Kuhn FE, Mohler ER, Satler LF, Reagan K, Lu DY, Rakeley CE. Effects of high density lipoprotein on acetylcholine induced coronary vasoreactivity. *Am J Cardiol.* 1991; 68: 1425-30.
121. Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1724-31.
122. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, et al. HDL induces NO dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 2004; 113: 569-81.