



Revisión monográfica

Análisis de la composición y de la función de las HDL, ¿un estudio para el clínico del futuro?

Carlos Aguilar-Salinas,* Marco Antonio Melgarejo-Hernández*

Resumen

El colesterol-HDL es un factor pronóstico de la incidencia de desenlaces cardiovasculares. Sin embargo, su capacidad pronóstica se pierde en condiciones que alteran la composición de las lipoproteínas de alta densidad HDL, sin modificar su contenido de colesterol (como los estados inflamatorios crónicos, la apoA-I Milano o la deficiencia de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol). Por ello, es deseable contar con pruebas clínicas que midan la función y/o composición de las HDL. Con tal fin se han desarrollado métodos que miden la capacidad para prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad LDL, o su acción sobre la migración de los monocitos, o bien analizan la composición proteica o lipídica de las HDL (por medio de la espectrometría de masas). Por ejemplo, el índice inflamatorio de las HDL (medido *in vitro*) es un mejor predictor del grosor de la capa íntima/media de la carótida que el colesterol-HDL en mujeres con lupus. Usando la espectrometría de masas se identificó que los casos con colesterol-HDL bajo tienen una menor cantidad de esfingomielina y cantidades mayores de plasmalógenos de etanolamina. Estos cambios tienen implicaciones funcionales ya que el contenido de fosfolípidos determina la disposición espacial de las proteínas de las HDL. La cardiopatía isquémica se asocia a enriquecimiento de las HDL3 en apoCIV, paraoxonasa-1, complemento C3, apoAIV y apoE y de varios inhibidores de proteinasas. Aunque la evidencia es preliminar, se han identificado indicadores de la función de las HDL que podrían brindar información clínica complementaria a la obtenida del colesterol-HDL.

Palabras clave: Lipoproteínas de alta densidad, paraoxonasa-1, HDL disfuncionales, espectrometría de masas.

Introducción

El factor de riesgo cardiovascular más común en adultos mexicanos es la hipoalfalipoproteinemia.¹ Esta condición se define por concentraciones de colesterol-HDL menores de 40 mg/dL. La prevalencia de la hipoalfalipoproteinemia

Abstract

HDL cholesterol is a prognostic factor for the incidence of cardiovascular events. However, its predictive power is lost in conditions in which the HDL composition is altered without changing the cholesterol content of the particle (e.g. chronic inflammatory conditions, apoA-I Milano or the cholesterol ester transfer protein deficiency). Based on that, there is a need for clinical tests that measure the HDL function or composition. It has been published methods that measure the capacity of HDL particles to prevent LDL oxidation or to diminish monocyte migration or that assess the lipid and protein composition (sing mass espectrometry). For example, the HDL inflammatory index (an in vitro assay) is a better predictor of the carotid grosor than HDL cholesterol in women with lupus. By using mass espectrometry it has been identified that low HDL cholesterol cases has a lower sphingomyelin content and higher amounts of ethanolamine plasmalogen in their HDL3 particles. These changes have functional implications, since phospholipid composition determines the protein content at the HDL surface. Cases with coronary heart disease have HDL3 enriched with apoCIV, paraoxonase 1, C3 complement, apoAIV, apoE and several proteinases inhibitors. Although the evidence is still preliminary, there are some markers of HDL function that may be useful in the future to provide complementary information to that derived from HDL cholesterol levels.

Key words: High density lipoproteins, paraoxonase-1, dysfunctional HDL, mass spectrometry.

es de 60.5% (IC 95%, 58.2-62.8%) en los individuos mayores de 20 años.² La frecuencia informada en México es una de las más altas publicadas en estudios con representación nacional. El porcentaje de la población afectada no ha cambiado en el período comprendido por las tres encuestas nacionales (1994-2006),^{3,4} debido a que el 70%

* Departamento de Endocrinología y Metabolismo, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

de la variabilidad del colesterol-HDL es debido a factores genéticos.⁵ La hipoalfalipoproteinemia es más común en los hombres (68.1 vs 54.0%) y en la región sur del país (a causa de factores étnicos, un consumo mayor de carbohidratos y menores cantidades de grasa en la dieta). Por lo anterior, la hipoalfalipoproteinemia debe de ser considerada como un tema prioritario de investigación para el país.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) son un grupo heterogéneo de partículas que protegen a los tejidos contra la inflamación, el estrés oxidativo y la acumulación anormal de colesterol en las membranas celulares. Su importancia clínica reside en que la cantidad de colesterol transportada en su interior (conocido como colesterol-HDL) es un predictor independiente de la mortalidad cardiovascular. Dado que las HDL participan en otros procesos biológicos distintos a la aterosclerosis, su importancia como factor de riesgo puede ser mayor a la reconocida en la actualidad. Las HDL regulan la concentración de receptores de la membrana que determinan la diferenciación y el crecimiento celular de precursores mieloides.⁶ Además, evitan la acumulación de colesterol en la membrana celular de las células beta; anomalías en la interacción entre el transportador ABCA1 y las HDL son causa de alteraciones en la secreción de insulina.⁷ Sus acciones antiinflamatorias y protectoras contra el depósito de colesterol en los tejidos no pueden ser evaluadas por medio de la concentración del colesterol-HDL, ya que resultan de mecanismos locales que modifican la composición de las partículas sin alterar su contenido de colesterol. Por ello, el desarrollo de métodos que evalúen la función de las HDL y que estén al alcance de laboratorios clínicos es un objetivo deseable.

El artículo revisa la información clínica que brinda la medición de la concentración del colesterol-HDL y la evidencia que sustenta la necesidad de desarrollar nuevas pruebas que midan la función de las partículas.

Generalidades de las HDL

Las HDL son una familia de partículas con una densidad entre 1.063-1.21 g/mL y un diámetro entre 70 y 100 Å. El 50% de su masa está constituido por proteínas; su contenido de fosfolípidos es mayor al del resto de las lipoproteínas. Su síntesis inicia con el transporte del colesterol de la membrana celular al espacio extracelular donde se une a la apolipoproteína A-I (apoA-I), principal proteína de las HDL. Las recién formadas son de forma discoide. Al aumentar su tiempo de residencia en el plasma acumulan colesterol y otros lípidos hasta alcanzar una forma esférica. En esta fase, las HDL pierden su capacidad para almacenar más lípidos y deben ser depuradas del plasma (mediante su interacción

con un receptor) o degradadas por enzimas lipolíticas, las cuales liberan las apolipoproteínas de la partícula. Estas proteínas formarán nuevas HDL o serán degradadas en el riñón. Por lo tanto, las HDL son una gama de partículas que difieren entre sí por su composición y función.⁸ Un panorama general de su metabolismo se muestra en la *figura 1*.

Las HDL pueden ser aisladas con diversas técnicas, dependiendo del método se les han asignado distintos nombres.⁹ Las HDL maduras son conocidas con HDL-2 (densidad 1.063-1.12 g/mL). Las HDL maduras pueden ser clasificadas en subvariedades (HDL-2a y 2b), las cuales se identifican por medio de la electroforesis en gradiente de poliacrilamida. Las HDL recién formadas son conocidas como HDL-3 (densidad 1.12-1.21 g/mL). A su vez, se clasifican en HDL-3a, 3b y 3c. También pueden ser clasificadas por el tipo de apolipoproteínas que contienen. El 60% de ellas contiene ApoA-I y ApoA-II (dos moléculas de cada apoproteína por cada HDL). El resto sólo contiene apoA-I (cuatro moléculas de apoA-I por HDL). Las HDL que contienen ApoA-I y ApoA-II están presentes en las HDL-3; las que contienen ApoA-I se encuentran en HDL-2 y -3. Además, pueden ser clasificadas usando electroforesis en gel en dos dimensiones. En la primera dimensión (realizada en gel de poliacrilamida 3-35% en condiciones no denaturantes) se separan las HDL en prebeta, alfa y prealfa. Después el gel se corre en una segunda dimensión, se utiliza un anticuerpo con la apoA-I para teñir el gel. Con este método se identifican de 8 a 12 subvariedades de HDL (prebeta-1 y 2, alfa-1, 2 y 3, así como prealfa-1, 2 y 3). Las alfa-1 son las partículas maduras y, a su vez, son las que se asociaron a protección cardiovascular en los estudios VAHIT (*Veterans Affairs HDL Intervention Trial*) y HATS (*HDL Atherosclerosis Treatment Study*).¹⁰ Las HDL pequeñas son denominadas alfa-3 y prebeta1, los casos con eventos coronarios tienen concentraciones mayores de estas subclases.

El colesterol-HDL como factor de riesgo cardiovascular

Múltiples estudios han demostrado que existe una relación inversa entre la incidencia de los desenlaces cardiovasculares y el colesterol-HDL.¹¹ Un metaanálisis reciente confirmó la independencia de tal asociación.¹² En él se incluyeron 302,430 individuos participantes de 68 estudios con seguimiento a largo plazo. La mayoría de los participantes son caucásicos de Norteamérica o Europa. Los desenlaces evaluados fueron: 8,857 infartos del miocardio no fatales; 3,928 muertes cardiovasculares y 2,534 infartos cerebrales isquémicos. La *figura 2* muestra la relación existente entre el colesterol-HDL y el riesgo de tener un desenlace coronario. La relación es lineal, por lo que la selección de un punto de

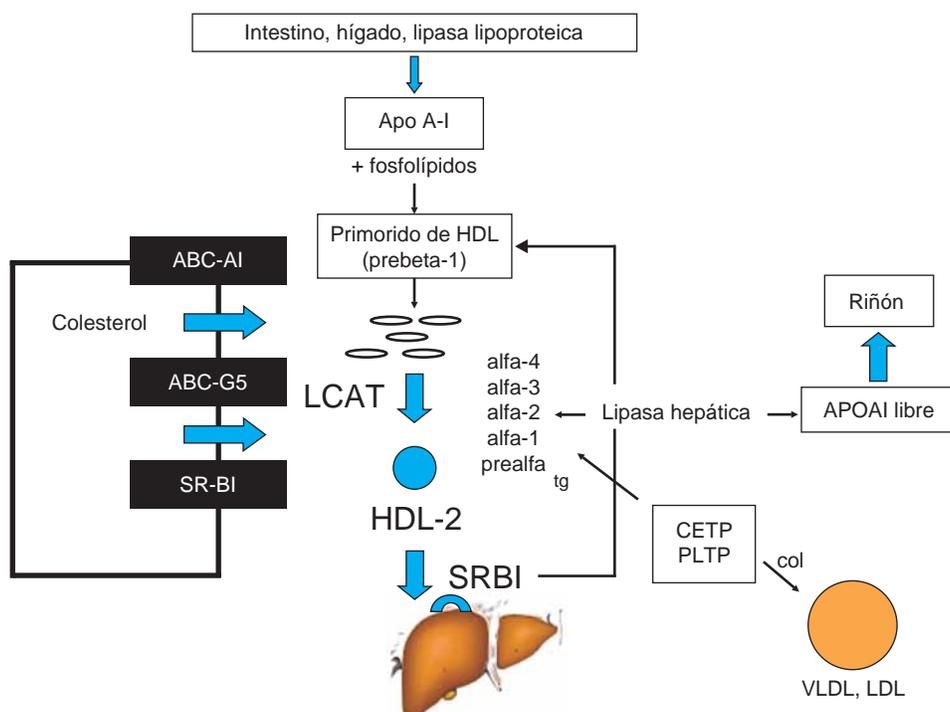
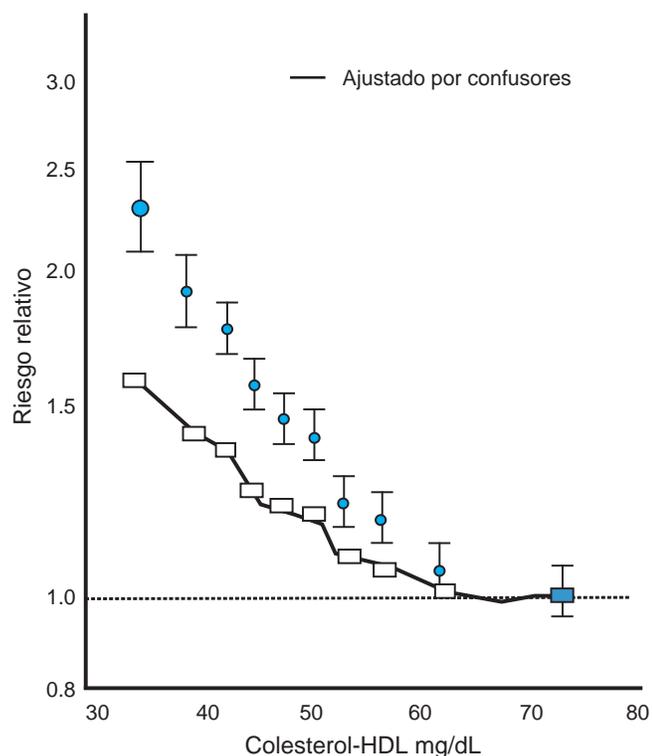


Figura 1. Panorama del metabolismo de las HDL.

Las HDL nacientes se generan en el espacio extracelular. Las HDL pueden ser sintetizadas *in vitro* al incubar fosfolípidos y la apoproteína A-I. La apoA-I es liberada de los quilomicrones, VLDL y HDL por la acción de enzimas lipolíticas (por ejemplo, lipasa lipoproteica), de la CETP, de la PLTP o en forma espontánea al interaccionar las lipoproteínas con las superficies celulares. La apoA-I libre interacciona con fosfolípidos adquiridos de las superficies celulares para hacer la forma inicial de las HDL (conocido como prebeta-1-LpA-I), la cual contiene una apoA-I por partícula. La incorporación de colesterol a las HDL es un proceso complejo y que no puede suceder de manera pasiva. El principal es mediado por el transportador ABC-A1, el cual reconoce a la apoA-I libre. La LCAT rápidamente lo esterifica para mantener un gradiente que facilite la continua incorporación de moléculas adicionales de colesterol. Varios transportadores celulares facilitan este proceso (ABC-A1, ABC-G1 y SR-BI). Cada uno de ellos transfiere colesterol a diversas subclases de HDL. Las HDL nacientes (alfa4-LpA-I) inician su proceso de maduración por la acción de las enzimas que transfieren lípidos (CETP y PLTP) o que esterifican el colesterol libre (LCAT). Inicialmente tienen forma de disco (llamados HDL-3) y se convierten progresivamente en formas esféricas (HDL-2) al incorporar mayores cantidades de colesterol. Su movilidad en la electroforesis se modifica convirtiéndose progresivamente en partículas alfa-3, alfa-2 y alfa-1 y prealfa. Es indispensable mantener un gradiente en la superficie de la HDL que le permita continuar aceptando colesterol en su superficie; por ello, el colesterol libre es rápidamente esterificado y trasladado al interior de la partícula. Además, el contenido de colesterol es regulado al transferirlo a otras lipoproteínas (VLDL y LDL) por medio de la CETP. A cambio, las HDL reciben moléculas de triglicéridos. Además, la transferencia de fosfolípidos de las lipoproteínas que contienen apoB por la PLTP aumenta la vida media de la HDL y permite la fusión de partículas para formar HDL de mayor tamaño. Durante el proceso de fusión se libera apoA-I, la cual es utilizada para formar nuevas HDL. Los cambios en la composición de las HDL resultantes de su proceso de maduración las hacen susceptibles a la acción de la lipasa hepática, la cual hidroliza los triglicéridos de las HDL y disminuye el tamaño de la partícula. Su movilidad electroforética disminuye de alfa-1 a alfa-2. Como resultado, disminuye la concentración del colesterol-HDL, ya que libera la apoA-I de la superficie de las partículas. La afinidad de la apoA-I por las HDL disminuye al perderse los fosfolípidos; como resultado, la apoA-I es liberada al plasma, filtrada por el glomérulo y catabolizada por las células tubulares por medio del receptor cubulina/megalina. El catabolismo de las HDL ocurre en el hígado, riñón y en los tejidos esteroideogénicos. Su eliminación es debida a su interacción con el receptor SR-BI, el cual puede endocitar la partícula completa o transferir colesterol al interior de la célula en forma selectiva liberando a la lipoproteína nuevamente a la circulación en forma de una HDL naciente (alfa-4). El colesterol que adquiere el hígado por esta vía es destinado preferentemente a la síntesis de bilis. Las subclases alfa-2,-1 y prealfa pueden ser eliminadas por su interacción con SR-BI.

corte para identificar sujetos en riesgo puede ser variable entre las poblaciones. Ante la falta de un punto de inflexión, la concentración de colesterol-HDL asociada a un riesgo estadísticamente significativo dependerá del riesgo basal de la población. Contrario a lo descrito en otros estudios (como MRFIT), los casos con colesterol-HDL mayor de 60 mg/dL no tuvieron una incidencia menor de eventos car-

diovasculares comparado contra los individuos con valores considerados como referencia (40-60 mg/dL). Tomando en cuenta el efecto de confundidores, la razón de momios para sufrir cardiopatía isquémica es 0.71 (IC 95%, 0.68-0.75) por cada desviación estándar (15 mg/dL) del colesterol-HDL. El riesgo es mayor en sujetos de menor edad y en normotensos. La magnitud del riesgo no es modificado



Modificado de: The Emerging Risk Factors Collaboration. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 2009; 302: 1993-2000.

Figura 2. Relación entre el colesterol-HDL y el riesgo de sufrir cardiopatía isquémica.

por el sexo, el índice de masa corporal, la diabetes o las concentraciones de proteína C reactiva o fibrinógeno. El tamaño de muestra del metaanálisis permitió detectar que el colesterol-HDL es un factor de riesgo para infarto cerebral isquémico [razón de momios 0.93 (IC 95% 0.84-1.02)].

El paradigma colesterol-HDL bajo/aterosclerosis es roto por varias condiciones clínicas. La ApoA-I Milano, la deficiencia de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol y los estados inflamatorios crónicos son ejemplos de ello. La mutación ApoA-I Milano (Arg₁₇₃→Cys) se asocia a niveles bajos de colesterol-HDL y es causa de longevidad.¹³ Fue descrita en los residentes de Limone sul Garda, Italia. Las concentraciones de HDL son 67% por debajo de casos controles, mientras que la apoA-I y A-II son 40% más bajas. La concentración promedio de triglicéridos es discretamente alta. Los casos con la mutación son longevos, lo que sugiere que la mutación protege contra la aterosclerosis. La cisteína resultante de la mutación causa la dimerización de la apoA-I, fenómeno que aumenta su

capacidad para extraer lípidos de los tejidos periféricos. Las HDL están compuestas sólo por HDL-3 (HDL pequeñas). En las subclases más pequeñas existen sólo monómeros de apoA-I Milano; en las subclases de mayor tamaño se encuentran dímeros de apoA-I Milano y complejos apoA-I Milano con ApoA-II. La infusión intravenosa de la ApoA-I Milano induce disminución del volumen de las placas del ateroma.

Por otra parte, las mutaciones del gen de la CETP han sido identificadas en pacientes con colesterol-HDL alto y aterosclerosis.¹⁴ La sustitución G→A en la posición + 1 del intrón 14 es común en japoneses (2%), en especial en los residentes de Omagari (27%). La sustitución D→G en la posición 442 del exón 15 (D442G) causa deficiencia parcial de CETP y se ha informado en 7% de los japoneses. La mayoría de las mutaciones se han informado en asiáticos; sin embargo, se han descrito mutaciones en alemanes y otras poblaciones caucásicas. Los casos con deficiencia homocigota de CETP tienen concentraciones altas de colesterol-HDL, apoA-I, apoA-II y apoE. Las HDL contienen una mayor proporción de partículas maduras, de mayor tamaño, enriquecidas en colesterol y apoE. Un menor catabolismo de las HDL es la explicación de los niveles altos de colesterol-HDL. La capacidad de las HDL resultantes para aceptar colesterol de los tejidos periféricos es menor; no obstante, existen suficientes HDL inmaduras para mantener la función. Los casos deficientes de CETP tienen concentraciones menores (-40%) de colesterol-LDL y apoB, debido a la combinación de menor producción de lipoproteínas en el hígado más aumento de su catabolismo (por aumento en la cantidad de receptores LDL en el hígado). La composición de las LDL es anormal, lo que disminuye su afinidad por el receptor LDL. La deficiencia de CETP se asocia al aumento en la frecuencia de complicaciones cardiovasculares (en especial con lesiones vasculares cerebrales). En Omagari, Japón, (una región donde la prevalencia de la deficiencia de CETP es muy alta) se observó que la enfermedad no se asocia con longevidad y que los casos con mutaciones del gen tienen un grosor de la capa íntima y media de la carótida mayor comparada contra sujetos control. En el estudio de Honolulu se observó que los casos con la mutación D442G tuvieron una mayor tasa de complicaciones cardiovasculares, si su colesterol-HDL se encontraba en rango normal; sin embargo, el mayor riesgo no fue evidente, si la mutación coexistía con el colesterol-HDL mayor de 60 mg/dL. Más aún, la actividad sérica de la CETP por debajo del percentil 50 se asoció a un incremento en la incidencia de desenlaces cardiovasculares en el estudio de Framingham.¹⁵ Esta observación es acorde con el aumento de eventos coronarios ocurridos durante el tratamiento con torcetrapib (un inhibidor de la CETP).

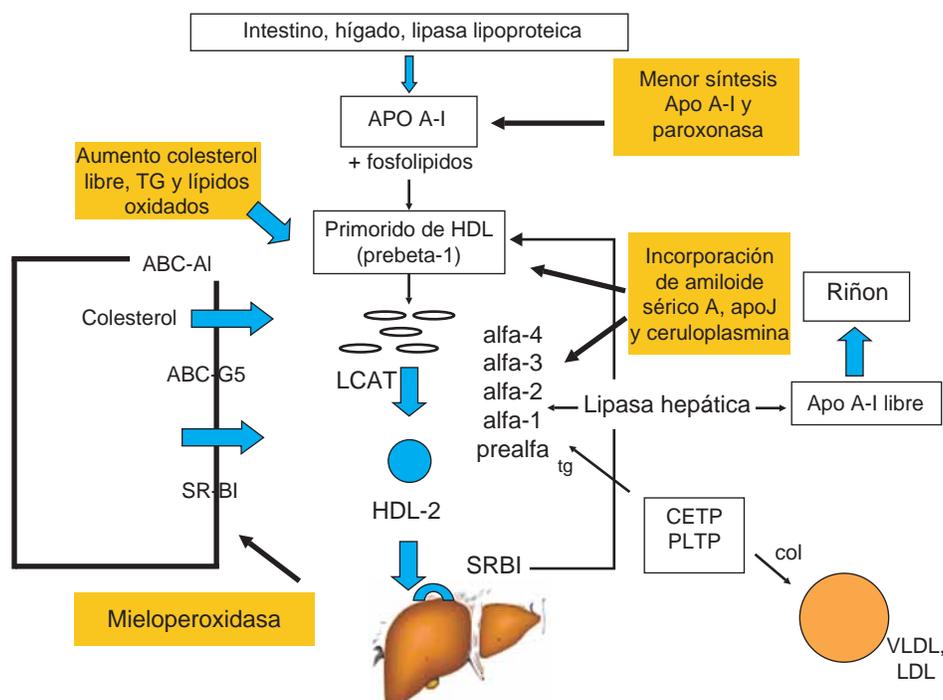


Figura 3. Anormalidades asociadas a la génesis de las HDL proinflamatorias.

Por todo lo anterior, el empleo de medicamentos o condiciones que disminuyan la actividad de CETP no parecen ser protectores contra la aterosclerosis, pese al incremento en la concentración de colesterol-HDL al que se asocian. Durante la deficiencia de CETP, las HDL son disfuncionales e incapaces de continuar aceptando el colesterol de los tejidos periféricos.

Los estados inflamatorios crónicos alteran la función de las HDL sin alterar la concentración del colesterol-HDL.¹⁶ Los cambios resultantes se muestran en la *figura 3*. Las HDL (en especial, las subclases HDL-2) tienen una menor resistencia a la oxidación *in vitro* que las LDL; las HDL oxidadas (o sus componentes) están presentes en las placas del ateroma. La oxidación de las HDL no es un proceso patogénico al inicio, aumenta la capacidad de las HDL para remover el colesterol de los tejidos ya que se producen heterodímeros entre la apoA-I y la ApoA-II que tienen una mayor capacidad para remover lípidos. Sin embargo, estados avanzados de oxidación alteran la función de la partícula, convirtiéndola en prooxidante. Su afinidad por los receptores tisulares cambia; pierde la afinidad por SR-BI y es reconocida por CD36 (el cual no se une a HDL nativas). La oxidación afecta los radicales metionina y lisina de la apoA-I (lo que altera su capacidad como aceptor de lípidos). Shao y colaboradores reportaron que la modificación de las lisinas de la región carboxiterminal altera su capacidad para interactuar con ABC-A1 y, con ello, unir lípidos a su

superficie.¹⁷ Los autores postulan que dicha alteración juega un papel crítico en la génesis de las HDL disfuncionales. La oxidación también afecta a los fosfolípidos de las HDL. El fosfolípido más abundante en las HDL es la fosfatidilcolina (90% del total), seguido de fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. La oxidación de las HDL disminuye el contenido de la fosfatidilcolina y de la fosfatidiletanolamina e incrementa la concentración de la lisofosfatidilcolina (producto del metabolismo de la fosfatidilcolina por la fosfolipasa A2). La oxidación de los lípidos de las HDL altera la función de la LCAT y por ende la capacidad para acumular lípidos en el interior de las partículas. A su vez, se producen metabolitos anormales como el HNE (4-hidroxi-2-noneal) que resultan de los procesos oxidativos de los radicales lisina, histidina y cisteína. El HNE participa en el reconocimiento de las LDL oxidadas por los receptores *scavengery* su existencia ha sido demostrada en las HDL. Las partículas se depletan de ésteres de colesterol y se enriquecen con colesterol libre, triglicéridos y ácidos grasos libres. Se incorpora a las HDL, la proteína amiloide A (SAA, por sus siglas en inglés) y la apolipoproteína J (también llamada clusterina); la cantidad de las enzimas paraoxonasa 1, lecitina colesterol acil transferasa (LCAT), CETP, proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) y de la apolipoproteína A-I disminuye en las HDL.¹⁸ La proteína amiloide A desplaza a la apoA-I y disminuye la capacidad de la HDL para captar lípidos oxidados. Como resultado, las

HDL tienen acciones proinflamatorias: aportan lípidos (en vez de removerlos) a los tejidos periféricos y su capacidad para transferir colesterol al hepatocito (vía receptor SR-BI) disminuye. Además tienen la capacidad de oxidar las LDL, en vez de protegerlas. Las HDL proinflamatorias han sido descritas en ratones con sobreexpresión de la ApoA-II; esta apolipoproteína desplaza a la paraoxonasa.

La relevancia clínica de las HDL proinflamatorias ha sido evaluada en varias colagenopatías.¹⁹ Las HDL proinflamatorias se encontraron presentes en el 45% de los casos con lupus eritematoso generalizado (LEG) (n = 154), en el 20% de las participantes con artritis reumatoide (n = 48) y en el 4% de las mujeres sanas (n = 72). En pacientes con LEG, las HDL proinflamatorias son predictores de la presencia de aterosclerosis carotídea.²⁰ La fortaleza de la asociación es mayor a la observada para factores de riesgo cardiovascular tradicionales como la edad. En contraste, el colesterol-HDL carece de poder predictivo, lo que sugiere que la calidad de las partículas es un mejor indicador de la capacidad protectora contra la aterosclerosis de las HDL. La velocidad de sedimentación globular está asociada a la presencia de las HDL proinflamatorias, lo que apoya que la magnitud del proceso inflamatorio determine la severidad de los cambios en la función de las HDL. Sin embargo, las HDL proinflamatorias no tienen una correlación significativa con la actividad del LEG (medida con el índice SELINA-SLEDAI). Las mujeres que tienen HDL proinflamatorias las tendrán, sin importar la ocurrencia de períodos de actividad lúpica. Esta observación sugiere que existen factores genéticos o ambientales distintos a los mediadores de inflamación que determinan la aparición de las HDL proinflamatorias. Hallazgos similares han sido reportados en la artritis reumatoide, excepto que la presencia de las HDL proinflamatorias es modificada por el tratamiento con agentes moduladores de la actividad de la enfermedad (como el metotrexato). Además, las HDL proinflamatorias han sido detectadas en pacientes con síndrome metabólico, intolerancia a la glucosa, diabetes, insuficiencia renal crónica o que tienen un trasplante.

Los datos antes mencionados muestran que el colesterol-HDL es un predictor independiente de la incidencia de los desenlaces cardiovasculares. Su magnitud depende del número de las HDL-3, por ser la subclase de HDL más abundante. Sin embargo, la concentración del colesterol-HDL no es un marcador de la función o de la composición de las HDL. La relación inversa existente en la población general entre el colesterol-HDL y el número de eventos coronarios no aplica en condiciones que alteran la composición proteica o lipídica de las HDL, sin modificar su contenido de colesterol. Tal es el caso de los estados inflamatorios crónicos, la apoA-I Milano o la deficiencia de CETP. Debido a

que varias condiciones inflamatorias crónicas son patologías frecuentes que explican un porcentaje significativo de la mortalidad general (como la diabetes), es deseable contar con pruebas clínicas que midan la función/composición de las partículas. Diversos grupos han desarrollado estrategias para cumplir con este fin. Empero, tales pruebas se limitan a estudios de investigación por su complejidad o por carecer de validación en estudios epidemiológicos. Las pruebas existentes se describen a continuación

Estrategias para medir la funcionalidad o la composición de las HDL

Los aspectos cualitativos de las HDL han sido evaluados midiendo su capacidad para prevenir la oxidación de las LDL, o bien por su efecto sobre la migración de los monocitos en cultivos de tejidos, o bien analizando su composición proteica o lipídica por medio de la espectrometría de masas.

La capacidad de las HDL para prevenir la oxidación de las LDL es la opción más usada.²¹ Las partículas son incubadas con LDLs y un sustrato que contiene un fluorocromo (diclorofluoresceína). En ausencia de las HDL, las LDL oxidan *in vitro* al fluorocromo, lo que genera una señal fluorescente. La adición de las HDL previene la liberación del reactivo. Los resultados del paciente son comparados contra los controles sanos. Su división es conocida como índice inflamatorio. Valores mayores a 1 son compatibles con la presencia de HDL proinflamatorias. El índice proinflamatorio es significativamente mayor en pacientes con aterosclerosis en cohortes de casos con LEG. A su vez, se asocia a un perfil con alto riesgo cardiovascular en pacientes con artritis reumatoide o con diabetes. Su capacidad de distinguir anomalías en la función de las HDL ha sido demostrada en varios modelos animales en que se elimina la expresión de PON-1, ApoA-I o LCAT. Pese a lo anterior, la experiencia clínica disponible se limita a los resultados publicados por investigadores de la Universidad de California en Los Ángeles (UCLA). Aún menos experiencia existe con otros métodos basados en la detección de cambios en la generación de marcadores de oxidación al incubar LDL y HDL con cobre.

Otra alternativa es medir el efecto de las HDL sobre la migración de monocitos o la protección de las LDL contra la oxidación o la capacidad para aceptar colesterol en cultivos de tejidos.²² Existen múltiples variantes metodológicas entre los reportes. Se han empleado diversos tipos celulares (macrófagos, fibroblastos o células de músculo liso) o condiciones experimentales que impiden su implementación con fines clínicos.

Una opción que ha ganado popularidad en los años recientes es el empleo de la espectrometría de masas

para describir el contenido lipídico o proteico de las HDL. Con este abordaje es posible hacer un análisis cualitativo de los componentes de las partículas. Yetukuri y colaboradores²³ describieron las diferencias en la composición de fosfolípidos de las HDL existentes entre pacientes con colesterol-HDL alto o bajo, usando cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas. Las personas con colesterol-HDL alto tienen concentraciones mayores de lisofosfatidilcolina, esfingomielina y ésteres de colesterol; en contraste, su contenido de triglicéridos, plasmalógenos de etanolamina y compuestos con numerosas dobles ligaduras es menor. Los cambios en la composición determinan una distribución distinta de los lípidos en la superficie de la partícula. Los casos con colesterol-HDL bajo tienen un mayor número de moléculas de triglicéridos y una cantidad menor de colesterol en la superficie de las HDL. Estas anomalías aumentan la afinidad de la partícula por la lipasa hepática y, por ende, la probabilidad de ser degradada. La menor cantidad de esfingomielina de las HDL de pacientes con colesterol-HDL baja disminuye los precursores de moléculas antiinflamatorias. Lo opuesto ocurre con el acúmulo de plasmalógenos de etanolamina, los cuales son precursores de los mediadores de inflamación. Este reporte demuestra que cambios en la composición de los fosfolípidos alteran las moléculas dispuestas en la superficie de la partícula y, con ello, la función y el destino de las HDL. Además permite, identificar potenciales indicadores indirectos de la función/composición de las HDL.

Varios grupos han desarrollado métodos y plataformas para medir la composición proteica de las HDL usando espectrometría de masas. Con este abordaje se describió que las HDL contienen un mayor número de proteínas de lo originalmente descrito. La composición original que incluye 13 proteínas: apoA-I (6 isoformas), apoA-II, apoA-IV (6 isoformas), apoE (6 isoformas), apoM (2 isoformas), apoC-II, apoC-III (3 isoformas) y otras proteínas como el péptido amiloide sérico (SAA (2 isoformas), alfa-amilasa y alfa-1-antitripsina fueron descartadas. Las HDL transportan más de 50 proteínas, las cuales han sido clasificadas por módulos funcionales: transporte y metabolismo de lípidos, marcadores de inflamación, factores del sistema inmune y del complemento, factores de crecimiento, proteínas transportadoras de hormonas y proteínas homeostáticas. Proteínas como el fibrinógeno, el inhibidor de la proteína alfa-1, la transtiretrina y la apolipoproteína L fueron identificadas como constituyentes de las HDL; empero, el papel que cumplen en las HDL aún se desconoce. Las HDL sirven como una matriz de transporte para múltiples péptidos pequeños (más de 100 con un peso molecular entre 1,000 y 5,000 Da), lo que extiende la vida media de los péptidos.

Davidson y cols²⁴ aislaron las HDL y sus subclases 2b, -2a, -3a, -3b y 3c usando ultracentrifugación y un gradiente de densidad isopícnico con sales neutras. Identificaron 28 proteínas distintas. Identificaron asociaciones entre la abundancia de las proteínas y las propiedades de las HDL. El contenido de las paraoxonasas 1, 2, 3 y apoL-1 determinaron la capacidad antioxidante de la partícula. En el cuadro I se muestran las proteínas identificadas en las HDL-3 por dos grupos que trabajan en forma independiente.^{25,26} Davidson y colaboradores demostraron que la composición proteica es distinta entre las subclases de HDL.²⁶ Por ejemplo, las proteínas encontradas exclusivamente en las HDL-3 son apoL-I, apoF, PON1/2, PLTP, apoJ, PON3, A1AT, apoA-IV, albúmina, fibrinógeno, Hrp, PBP y transtiretrina. En contraste, la apo D, la apo M y el péptido amiloide sérico se encuentran preferentemente en las HDL-3 de mayor densidad. Por el contrario, las apo E, C-II y C-III fueron identificadas en forma exclusiva en las HDL-2. Las apoA-I, C-II, C-I y C-IV fueron encontradas en todas las subclases de HDL. Estos datos sugieren que la composición proteica de las subclases de HDL no está determinada al azar y que

Cuadro I. Proteínas encontradas en las HDL usando espectrometría de masas.

ApoA-I	Fracciones 3, C4B, C4A y C9 del complemento
ApoA-II	Alfa-1-glicoproteína ácida 2
ApoA-IV	Alfa 2-glicoproteína HS
ApoE	Alfa-1 antitripsina
ApoC-I	Alfa-1B glicoproteína
ApoC-II	Cadena alfa del fibrinógeno
ApoC-III	Serotransferrina
ApoC-IV	Proteína relacionada a la haptoglobina
ApoL-1	Transtiretrina
ApoM	Proteína de unión a vitamina D
ApoF	ApoB-100
ApoD	Albúmina
ApoH	Vitronectina
ApoJ	Alfa-2-antiplasmina
LCAT	Alfa-1 microglobulina/bikunina
CETP	Cadena pesada H4 del inhibidor de alfa antitripsina
PLTP	Angiotensinógeno
SAA	Inhibidor de serpina peptidasa
SAA1	Kininógeno 1
SAA2	Proteína de unión a retinol
SAA4	Oxidasa de prenilecisteína
PON-1	Hemopexina
PON-3	Subunidad alfa de PAF-AH IB
	HPTR
	PAFA
	Proteína básica de las plaquetas
	Protrombina

resulta de la interacción de las proteínas que comparten funciones. Por ende, cada variedad de HDL puede tener una función específica.

La metodología antes mencionada ha sido empleada para comparar la composición de las HDL entre individuos sanos y casos con cardiopatía isquémica o diversas dislipidemias.²⁶ Los estudios son prometedores pero aún con limitaciones debidas al tamaño de muestra insuficiente o el empleo de más de un método de preparación y análisis de las HDL. Vaisar y asociados reportaron que las HDL de pacientes con cardiopatía isquémica contienen varios inhibidores de proteinasas que participan en la aterosclerosis y cuya presencia ha sido probada en las placas de ateroma.²⁵ Además se encontró un enriquecimiento de las HDL-3 de: apoC-IV, paraoxonasa 1, complemento C3, apoA-IV y apoE. El mismo grupo informó el efecto de la combinación estatina/niacina en pacientes con cardiopatía isquémica. Informaron que la niacina incrementa 16% la concentración de las HDL-2, sin cambios en las HDL-3.²⁷ Reportaron 27 proteínas en las HDL-3, lo cual no fue acorde con su reporte inicial en que se encontraron siete proteínas más. Los autores modificaron el método de análisis espectrométrico, lo que puede explicar la diferencia en el número de proteínas identificadas en las HDL-3. Replicaron el hallazgo de enriquecimiento en apoE de las HDL-3 e identificaron que además tienen menor cantidad de apoI y PLTP que las HDL-3 de los sujetos sanos. El tratamiento con niacina y una estatina disminuye el contenido de la apoE en las HDL-3 al nivel encontrado en los controles. Un contenido alto de apoE en las HDL puede ser causa de una eliminación mayor de las HDL; su corrección podría explicar el incremento de las HDL resultado del tratamiento. Además, el tratamiento aumentó la concentración de apoI y PLTP en las HDL-3. Un abordaje similar fue aplicado en la comparación de casos con síndrome metabólico. Sus HDL tuvieron concentraciones menores de apoC-I y mayores de todas las isoformas de apoC-III y de la isoforma IV del péptido amiloide sérico.

Algunos retos analíticos quedan por ser resueltos.²⁴ Los procesos de aislamiento de las HDL pueden alterar la composición de las partículas, lo que impide que la descripción basada en la espectrometría de masas represente condiciones fisiológicas. Las HDL pueden ser aisladas por ultracentrifugación, electroforesis, cromatografía o precipitación. Procedimientos que se requiera el empleo de soluciones con fuerza iónica alta pueden causar la disociación de las proteínas transportadas en la superficie de la partícula. Lo mismo aplica para procedimientos que requieren la elusión de las columnas de cromatografía con ácido acético o isotiocianato. Los gradientes de densidad isotópico generan subclases heterogéneas. Sin embargo,

estos problemas no invalidan los resultados de estudios comparativos ya que casos y controles son analizados por igual. Por otra parte, existen diferencias importantes en los procesos de preparación e identificación de las proteínas. Se requiere la fragmentación de las proteínas, la separación de los péptidos [por medio de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) u otros métodos] y su análisis empleando espectrometría de masas en tándem (MS/MS) u otras variantes (MALDI-TOF-MS o *shotgun*). Pese a los avances en espectrometría de masas ocurridos en los últimos años, su capacidad para cuantificar proteínas de las HDL que tienen una concentración baja es cuestionable ya que la señal emitida por los péptidos derivados por proteínas abundantes impide su detección. Algunos péptidos pueden tener secuencias iguales pero su origen es distinto. Tal efecto sobreestima la proteína más abundante e infraestima la de menor concentración. Además, péptidos muy abundantes impiden la detección de la señal generada por otros fragmentos proteicos que son analizados en forma simultánea. Para resolver estas limitaciones, se ha usado el marcaje con isótopos de péptidos que son usados como estándares internos o herramientas complementarias de la espectrometría de masas (SELDI-TOF-MS). Por lo anterior, el análisis de las HDL usando la espectrometría de masas permite la detección de diferencias cualitativas de su composición entre poblaciones que difieren por la existencia de una patología.

Perspectivas y conclusiones

El colesterol-HDL es un marcador imperfecto de la función de las HDL. Su concentración está determinada por el contenido de colesterol de la subclase más abundante de HDL (HDL-3) y su cantidad no se altera por cambios en la composición de las partículas. Por ello, el colesterol-HDL tiene una capacidad predictiva limitada en algunos de los fenómenos biológicos de los que las HDL participan. En consecuencia, es deseable el desarrollo de pruebas de fácil acceso para el clínico que permitan detectar la presencia de HDL proinflamatorias o disfuncionales. Diversos grupos intentan identificar un marcador que cumpla con tal objetivo al comparar la composición de las HDL (y sus subclases) de casos y controles. Se describieron los avances recientes ocurridos en el campo en los párrafos previos. Las HDL proinflamatorias están asociadas a la aterosclerosis carotídea en pacientes con diversas colagenopatías, pese a que el colesterol-HDL no es un determinante del fenómeno. Otros grupos han optado por comparar la composición proteica y lipídica de las HDL de casos con cardiopatía isquémica o síndrome metabólico *versus* controles. Existen diferencias altamente significativas en el contenido de

algunos fosfolípidos. Los casos con colesterol-HDL bajo tienen una menor cantidad de esfingomielina y cantidades mayores de plasmalógenos de etanolamina. Un modelo que predice la disposición espacial de las proteínas de las HDL demostró que el cambio en la composición de los fosfolípidos de las HDL altera la concentración de las proteínas en la superficie de la partícula. Por ello, modificaciones en las concentraciones de los fosfolípidos de las HDL pueden tener consecuencias funcionales. Finalmente, el estudio de la composición proteica de las subclases de las HDL demostró que la distribución de las proteínas entre las subclases de HDL no está determinada al azar y que resulta de la interacción de las proteínas que comparten funciones. Algunas, como la apoL-I, apoF, PON1/2, PLTP, apoJ, PON3, A1AT y apoA-IV se localizan en forma exclusiva en las HDL-3. Estas proteínas tienen en común su capacidad antioxidante o antiinflamatoria. Además, con el mismo abordaje, se identificó que las HDL-3 de pacientes con cardiopatía isquémica están enriquecidas en apoC-IV, paraoxonasa 1, complemento C3, apoA-IV y apoE y contienen varios inhibidores de proteinasas (cuya presencia ha sido probada en las placas de ateroma). Aunque ninguno de los estudios ha postulado algún marcador de la función de las HDL, los estudios han permitido identificar candidatos que deberán ser validados al estudiar fenotipos extremos (por ejemplo, LEG activo vs sanos) y en estudios longitudinales. De ser exitosa la propuesta, será posible identificar los casos con HDL disfuncionales midiendo la concentración sérica de un compuesto, en vez de emplear técnicas *in vitro* o que requieren de la espectrometría de masas.

El estudio de la hipoalfalipoproteinemia en nuestra población ofrece oportunidades únicas. Gracias al esfuerzo conjunto de investigadores clínicos y básicos se han identificado genes de susceptibilidad específicos para poblaciones amerindias.²⁸ Debido a la prevalencia alta de hipoalfalipoproteinemia de nuestra población, se requieren de herramientas clínicas que permitan una estimación más precisa del riesgo cardiovascular asociado a esta anomalía. El estudio de la composición/función de las HDL podría ofrecer la respuesta. Empero, el o los marcadores deberán demostrar su consistencia en diversas situaciones clínicas asociadas a la hipoalfalipoproteinemia y su reproducibilidad como analitos de laboratorio. Finalmente, deberá brindar información complementaria a la obtenida del colesterol-HDL, ya sea como factor predictor o como objetivo terapéutico.

Bibliografía

1. Córdova-Villalobos JA, Barriguete-Meléndez JA, Lara-Esqueda A et al. Chronic non-communicable diseases in Mexico: epidemiologic synopsis and integral prevention. *Salud Publica Mex* 2008; 50: 419-427.
2. Aguilar-Salinas CA, Gómez PFJ, Rull JA, Villalpando S, Barquera S, Rojas R. Prevalence of dyslipidemias in the 2006. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. *Salud Publica Mex* 2010; 52: S44-S53.
3. Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V et al. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001; 42: 1298-1307.
4. Barquera S, Flores M, Olaiz-Fernández G et al. Dyslipidemias and obesity in Mexico. *Salud Publica Mex* 2007; 49: S338-S347.
5. Holleboom AG, Vergeer M, Hovingh K, Kastelein J, Kuivenhoven JA. The value of HDL genetics. *Cur Opin Lipidol* 2008; 19: 385-394.
6. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier E et al. ATP-Binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science* 2010; 328: 1689-1693.
7. Gertz G, Reardon C. High-Density lipoprotein function in regulating insulin secretion: possible relevance to metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1497-1499.
8. Pérez-Méndez O, Luc G, Posadas-Romero C. Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma y enfermedad arterial coronaria. *Arch Inst Cardiol Méx* 2000; 70: 312-321.
9. Warnick GR, McNamara J, Boggess C et al. Polycrylamide gradient gel electrophoresis of lipoprotein subclasses. *Clin Lab Med* 2006; 26: 803-846.
10. Vittone F, Chait A, Morse JS et al. Niacin plus simvastatin reduces coronary stenosis progression among patients with metabolic syndrome despite a modest increase in insulin resistance: A subgroup analysis of the HDL-Atherosclerosis Treatment Study (HATS). *J Clin Lipidol* 2007; 1: 203-210.
11. Saks FM. The role of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol in the prevention and treatment of coronary heart disease: expert group recommendations. *Am J Cardiol* 2002; 90: 139-142.
12. The emerging risk factors collaboration. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 2009; 302: 1993-2000.
13. Calabresi L, Sirtori CR, Paoletti R, Franceschini G. Recombinant apolipoprotein A-I Milano for the treatment of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep* 2006; 8: 163-167.
14. Shah P. The Yin and Yang of cholesteryl ester transfer protein in cardiovascular disease. *Circulation* 2009; 120: 2408-2410.
15. Vasan R, Pencina M, Robins S et al. Association of circulating cholesteryl ester transfer protein activity with incidence of cardiovascular disease in the community. *Circulation* 2009; 120: 2414-2420.
16. Navab M, Reddy S, Van Lenten B et al. The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009; 50: S145-S149.
17. Shao B, Pennathur S, Pagani I, Oda M, Witztum J, Oram J, Heinecke JW. Dysfunctional HDL: modifying apolipoprotein

- A-I by malondialdehyde, but not by an array of other reactive carbonyls blocks cholesterol efflux by the ABCA1 pathway. *J Biol Chem* 2010; 285: 18473-18484.
18. Tzouanidou E, Brinkmeier M, Fotiadou E, Giakoumi SM, Kypreos K. HDL biogenesis and functions: Role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010; 208: 3-9.
 19. Hahn B, Grossman J, Ansell BJ et al. Altered lipoprotein metabolism in chronic inflammatory states: proinflammatory high-density lipoprotein and accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2008; 10: 213-225.
 20. McMahon M, Grossman J, Skaggs B et al. Dysfunctional proinflammatory high-density lipoproteins confer increased risk of atherosclerosis in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism* 2009; 60: 2428-2437.
 21. Navab M, Hama S, Hough G et al. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res* 2001; 42: 1308-1317.
 22. Navab M, Imes S, Hama SY et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in co-cultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991; 88: 2039-2046.
 23. Yetukuri L, Söderlund S, Koivuniemi A et al. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol *J Lipid Res* 2010; 51: 2341-2351.
 24. Davidsson P, Hulthe J, Fagerberg B, Camejo G. High-Density lipoproteins proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 156-163.
 25. Vaisar T, Pennathur S, Green PS et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* 2007; 117: 746-756.
 26. Davidson WS, Silva G, Chantepie G, Lagor W, Chapman J, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 870-876.
 27. Davidson W, Gangani R, Silva D, Chantepie S, Lagor W, Chapman J, Kontush A. Proteomic analysis of Defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: Relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 870-876.
 28. Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S, Rojas-Martínez R et al. Hypoalphalipoproteinemia in populations of Native American ancestry: an opportunity to assess the interaction of genes and the environment. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 92-97.

Correspondencia:

Dr. Carlos Aguilar-Salinas

Departamento de Endocrinología y Metabolismo

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

«Salvador Zubirán». Vasco de Quiroga Núm. 15,

Del. Tlalpan 14000, México, D.F. Teléfono: 55731200

ext 2405 E-mail: caguilasalinas@yahoo.com