



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA
SALUD

**“Análisis de la composición de las lipoproteínas de alta densidad
mediante la espectrometría de masas en pacientes con artritis
reumatoide.”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
DR. DANIEL BENJAMÍN ELÍAS LÓPEZ.

TUTOR
DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS.
DEPARTAMENTO DE ENDOCRINOLOGÍA Y METABOLISMO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRAN

MÉXICO, D.F. DICIEMBRE DE 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Marco Teórico	5
-Definición	5
-Historia	5
-Composición.	6
-Heterogeneidad	8
-Funciones e implicaciones clínicas de las HDL	12
- Métodos existentes para medir la funcionalidad o la composición de las HDL.	12
-HDLs disfuncionales y patologías inflamatorias	16
-Artritis reumatoide y HDL proinflamatorias.	18
3. Planteamiento del problema y justificación.	19
4. Objetivos.	20
5. Hipótesis.	20
6. Metodología	21
7. Resultados	28
8. Discusión.	43
9. Conclusiones.	46
10. Bibliografía.	47

1.- RESUMEN:

Antecedentes: Hallazgos recientes de la espectrometría de masas han aumentado de forma dramática nuestro entendimiento de la diversidad proteica de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés), encontrándose actualmente más de 85 proteínas diferentes asociadas, y la lista continúa incrementándose. Además de tener a las proteínas tradicionalmente involucradas con el transporte de lípidos, las HDL tienen varios constituyentes diferentes, por ejemplo proteínas asociadas a las vías del complemento, inhibidores de proteasa involucradas en la hemostasis, proteínas de respuesta de fase aguda, mediadores de la función inmunológica e incluso proteínas que unen metales. Esta diversidad en la composición de las HDL encaja perfectamente con los hallazgos de varios estudios que han corroborado una amplia variedad de funciones pleiotrópicas de éstas partículas, incluyendo una gran participación en el transporte de lípidos, oxidación, inflamación, hemostasis e inmunidad. Se sabe que el proteoma de las HDL se modifica de forma importante durante los estados de inflamación crónica, provocando que se modifique la funcionalidad de las HDL.

Objetivo: Evaluar las diferencias en la composición proteica de las HDL existentes entre casos con AR y controles sin artritis reumatoide. Evaluar si esta diferencia en la composición se traduce en un cambio en la funcionalidad de las HDL.

Metodología: Estudio comparativo, de procedimiento, observacional, transversal y prolectivo. Se incluyeron a 12 pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide con distintos grados de actividad de la enfermedad y duración de la misma; además, 12 controles sanos pareados por las principales variables confusoras. Se les realizó determinación de la composición proteica de las HDL mediante espectrometría de masas. Para evaluar la funcionalidad de las HDL se utilizó el ensayo libre de células.

Resultados: Encontramos que la composición proteica de las HDL de los pacientes con artritis reumatoide es distinta al compararse con la composición proteica de los pacientes controles sanos; sin embargo, ninguna mostró una diferencia estadísticamente significativa. Se corroboró lo ya descrito de que la cantidad de ApoA-1 y PON están disminuidos en pacientes con AR, aunque el amiloide sérico también se encontró bajo en AR, contrario de lo descrito. Sin embargo, ningunos de estos datos mostraron diferencia

estadística. Cuando se realizó estudios de funcionalidad de las HDL de los pacientes con artritis reumatoide y sus controles, tampoco se documentaron diferencias estadísticamente.

Conclusiones: En este estudio, encontramos que la composición proteica de las lipoproteínas de alta densidad se encuentra distinto en los pacientes con artritis reumatoide comparada a la de sus controles sanos, aunque sin una diferencia estadística. Tampoco dicha diferencia logró traducirse en un cambio en la funcionalidad de estas lipoproteínas entre ambos grupos; sin embargo, consideramos que la técnica de funcionalidad utilizada en este estudio tiene poca sensibilidad.

2.- MARCO TEÓRICO

Aspectos Generales de las lipoproteínas de alta densidad (HDL):

Definición:

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL por sus siglas en inglés), son complejos macromoleculares, pseudomicelares, constituidas por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y por proteínas llamadas apolipoproteínas. Dependiendo de la composición de lípidos pueden ser discoides o esféricas⁽¹⁾

Historia:

En 1951, Barr y cols reportaron que los pacientes con enfermedad arterial coronaria presentaban bajas concentraciones de C-HDL ⁽²⁾. Posteriormente en 1977, mediante los resultados del estudio Framingham, surgió la teoría de que bajas concentraciones de C-HDL representan un factor de riesgo para enfermedad coronaria. Por otro lado, estudios prospectivos han sugerido que el riesgo de enfermedad coronaria se eleva 3% en mujeres y 2% en hombres cuando la concentración de C-HDL disminuye 1mg/dl, resaltando la teoría que el C-HDL es cardioprotector. En las últimas décadas, estos hallazgos han permitido iniciar una serie de investigaciones sobre las lipoproteínas de alta densidad y su asociación con el desarrollo de aterosclerosis. ⁽²⁾

Recientemente se han descubierto los mecanismo ateroprotectoras de las HDL, entre las que destacan: protección contra la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés), acciones antiinflamatorias sobre las paredes celulares, citoprotectoras, anti-infecciosas, vasodilatadoras, antitrombóticas, entre otras.⁽³⁾

Chapman, Nichols, Fielding y cols, fueron de los primeros grupos en documentar la heterogeneidad de las propiedades de las HDL. Sin embargo, en los años 90's Fogelman, Navab y cols, desarrollaron el concepto de funcionalidad de las HDL, el cual hace referencia a que el potencial de las funciones ateroprotectoras de las partículas de HDL se origina por su composición y estructura, es decir por la presencia de proteínas específicas (apolipoproteínas) y lípidos. Sin embargo, también documentaron que las

partículas de HDL pueden perder sus funciones protectoras y adquirir funciones proaterogénicas bajo algunas condiciones patológicas que principalmente incluyen estados de inflamación aguda o crónica, a lo cual llamaron HDL disfuncionales.⁽⁴⁾

Composición:

Las proteínas forman los principales constituyentes de las partículas de HDL, además llevan un número particularmente mayor de proteínas en comparación a otras especies de lipoproteínas. La heterogeneidad del proteoma de las HDL fue originalmente demostrado en 1968-1969^(5,6), aunque la mayoría de las principales proteínas fueron descubiertas en la década de los 70's. Las proteínas de las HDL se han dividido tradicionalmente en cuatro subgrupos principales: a).-apolipoproteínas, b).-enzimas, c).-proteínas de transferencia de lípidos y d).-proteínas menores (<5% de las proteínas totales de las HDL) (**Tabla 1**). Se ha considerado que las apolipoproteínas y las enzimas son componentes fundamentales de las HDL, cuya importancia biológica es, sin lugar a dudas, clave para su estructura y funcionalidad. Sin embargo, el papel de las proteínas de menor importancia, sobre todo las que participan en la regulación del complemento, protección frente a las infecciones y de respuesta de fase aguda, han recibido cada vez más atención en los últimos años, principalmente como resultado de los avances de la proteómica. De hecho, se pensó durante mucho tiempo que las partículas de HDL sólo contenían apolipoproteínas y enzimas implicadas directamente en el metabolismo lipídico. Incluso, el posterior descubrimiento de cantidades mínimas de amiloide sérico A (SAA) como componente de las HDL en plasma normal ⁽⁶⁾ se consideró excepcional, debido a que es un reactante de fase aguda importante.

Sin embargo, el reciente desarrollo de la proteómica ha mejorado significativamente la sensibilidad en la detección de las proteínas, revelando que las proteínas cargo de las HDL es mucho más diversa de lo que previamente sabíamos. Estos estudios han permitido la identificación de más de 50 proteínas en las HDL humanas ⁽⁷⁻⁹⁾ . Numerosas proteínas implicadas en la respuesta de fase aguda

Tabla 1: Principales constituyentes proteicos de las HDL.

Proteína	Cromosoma	# de residuos de amino-ácidos.	Principal función.
<u>Apolipoproteínas</u>			
ApoA-I	11	243	Principal apolipoproteína estructural y funcional, activa LCAT.
ApoA-II	1	77	Apolipoproteína funcional y estructural.
ApoA-IV	11	376	Apolipoproteína funcional y estructural.
ApoA-V	11	343	Activador de LPL, inhibidor de la secreción de Tg.
ApoC-I	19	57	Modulador de la actividad de CETP
ApoC-II	19	79	Activador de LPL.
ApoC-III	19	79	Inhibidor de LPL.
ApoC-IV	19	101	Regula el metabolismo de Tg.
ApoD	3	169	Une pequeñas moléculas hidrofóbicas.
ApoE	19	299	Apolipoproteína funcional y estructural, ligando del R-LDL y LRP.
ApoF	12	162	Inhibidor de CETP.
ApoH	17	326	Une moléculas cargadas negativamente.
ApoJ	8	427	Une moléculas hidrofóbicas.
ApoL-I	22	371	Factor tripanolítico del suero humano
ApoM	6	188	Une pequeñas moléculas hidrofóbicas.
<u>Enzimas</u>			
LCAT	16	416	Esterificación de colesterol a ésteres de colesterol.
PON1	7	354	Lactonasa dependiente de calcio
PAF-AH	6	420	Hidrólisis de pequeñas cadenas de fosfolípidos
GSPx-3	5	206	Reducción de hidroperóxidos por glutatión.
<u>Proteínas que transfieren lípidos.</u>			
PLTP	20	476	Conversión de HDL en partículas más grandes o más pequeñas, transporte de LPS.
CETP	16	476	Heterointercambio de colesterol esterificado y Tg y homointercambio de PL entre HDL y lipoproteínas que contienen apo-B.
<u>Proteínas de fase aguda</u>			
SAA-1	11	104	Reactante de fase aguda.
<u>Componentes del complemento</u>			
C3	19	1663	Activación del complemento
Proteinasa inhibidora de alfa-1-antitripsina.	14	418	Inhibidor de la serina de proteinasas.

se encontraron de forma inesperada como componentes de las HDL normales en el plasma humano. Además, se descubrieron otras dos grandes familias de proteínas asociadas a las HDL, las cuales están involucradas en la regulación del complemento e inhibición de proteasas⁽⁹⁾, incrementando la posibilidad de que las HDL puedan jugar un papel, previamente inesperado, en los mecanismos de defensa del huésped y la inflamación⁽⁸⁾. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la cantidad de todas estas proteínas de las HDL es mucho menor en comparación con la de las principales apolipoproteínas, es decir apoA-I y apoA-II.

Además de las proteínas, las HDL contienen múltiples especies moleculares de lípidos^(10,11) (**Fig. 1.1**). Análisis lipidómicos recientes han permitido la identificación de más de 200 especies moleculares individuales de lípidos en la lipidoma de las HDL⁽¹²⁻¹⁴⁾, algunos de los cuales sólo están limitados por la sensibilidad de las tecnologías disponibles. Por último, las HDL contienen varios restos de azúcares como componentes de proteínas glucosiladas y se ha demostrado recientemente que incluso transportan microRNA⁽¹⁵⁾.

Heterogeneidad de las HDL.

Las partículas de HDL son muy heterogéneas en sus propiedades físico-químicas, metabolismo intravascular y actividad biológica⁽¹⁶⁾. El elevado grado de heterogeneidad parece representar una característica universal de las partículas de HDL, independientemente de su origen.

La heterogeneidad prominente de las partículas de HDL es resultado principalmente de la estructura altamente dinámica de la apoA-I, que permite diferentes conformaciones, lo que funcionalmente se traduce en mayor captación de lípidos y, por lo tanto, distintos tamaños de las partículas. ApoA-I se puede considerar como una proteína de captación de lípidos muy flexible, capaz de incorporar los fosfolípidos en partículas estables⁽¹⁷⁾. Al hacerlo, apoA-I puede adaptar conformaciones distintas. Los mecanismos por los que apoA-I puede variar en el diámetro de la HDL y acomodar distintos números de moléculas

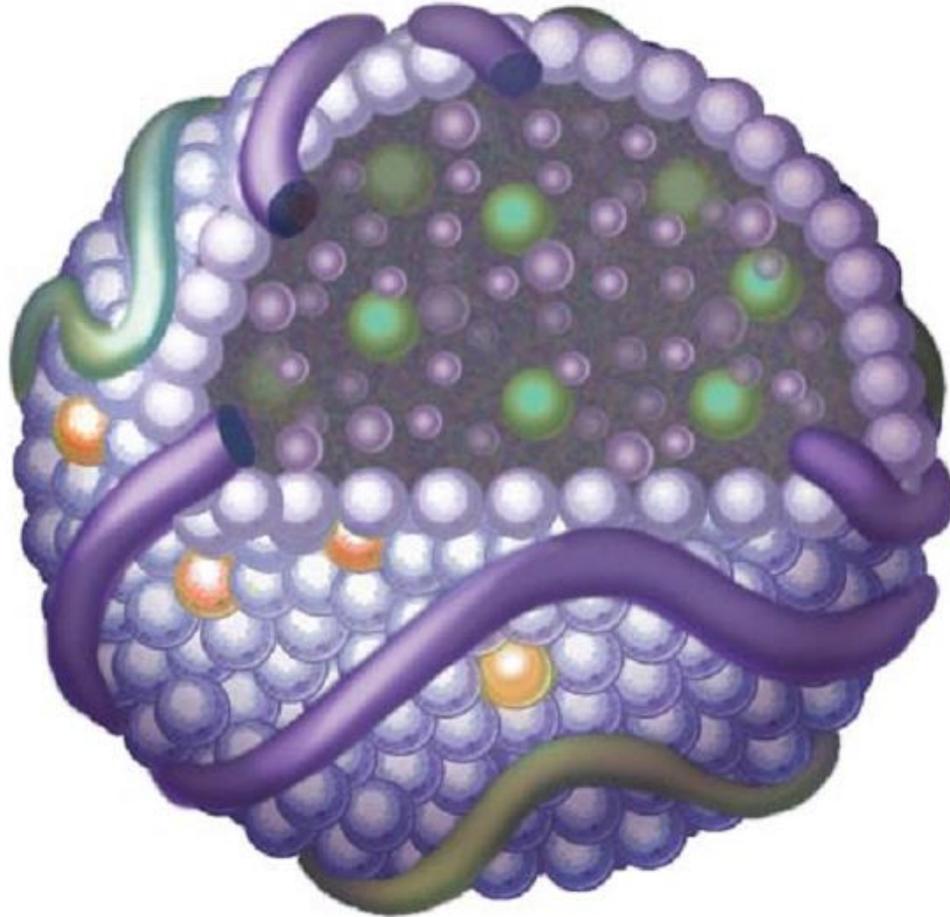
de lípidos implican movimientos específicos impulsados por interacciones proteína-fosfolípidos.

El concepto de HDL como una familia de partículas diferenciadas que contienen apoA-I, pero varían en la composición de proteínas, fue propuesta originalmente hace 40 años por Peter Alaupovic⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Los análisis posteriores han revelado que en todas las personas normolipidémicas, las partículas de HDL que contienen sólo apoA-I (LpA-I) y tanto apoA-I y apoA-II (LpA-I:A-II) se pueden inmunoseparar. Además de apoA-II, las dos subclases pueden diferir en otro contenido de proteína, como se ejemplifica para paraoxonasa-1 (PON1) que preferentemente se asocia con LpA-I⁽²⁰⁾. Las partículas LpA-I pueden además subfraccionarse de acuerdo a su tamaño. El número de moléculas de apoA-I en tales subpoblaciones se incrementan desde 2, 3 y 4 conforme se incrementa el tamaño de la partícula. Al análisis de la composición de las subpoblaciones individuales, LpA-I:A-II exhibe proporciones comparables de proteínas totales (aproximadamente 58%), fosfolípidos (aproximadamente 21%), colesterol total (aproximadamente 16%), triglicéridos (aproximadamente 5%) y el colesterol libre (aproximadamente 4%) a través de las subfracciones; sin embargo, los componentes de LpA-I muestran una variabilidad significativa.

Las subpoblaciones de HDL también pueden diferir notablemente en el contenido de proteínas minoritarias, evaluadas de forma cualitativa y semi-cuantitativa utilizando enfoques proteómicos^(21, 22). En primer lugar, el análisis del proteoma de las HDL revela que la abundancia de la mayoría de las proteínas asociadas a HDL es insuficiente para permitir una copia por partículas HDL, lo que sugiere que algunas proteínas pueden limitarse a subpoblaciones específicas de HDL, distintas en origen y en función, las cuales se distribuyen diferencialmente a través del espectro de las partículas de HDL⁽²³⁾. Por ejemplo, se estima que sólo el 5% de las partículas de HDL pueden llevar una molécula de ApoM, lo que sugiere la existencia de una subpoblación(es) que contienen ApoM.

El análisis proteómico de cinco subpoblaciones de HDL aisladas, de personas normolipídicas, mediante ultracentrifugación con gradiente de densidad isopícnica, identifica cinco distintos patrones de distribución de los componentes de las proteínas

Figura 1: partícula de HDL plurimolecular, quasi-esférica, pseudomicelar con sus principales componentes estructurales.



individuales en las subfracciones de las HDL ⁽²⁴⁾. Lo más interesante de esto es que identifica HDL3c pequeñas y densas como subpoblación en el que se presentan predominantemente siete proteínas, especialmente apoJ, apoL-I, apoF, PON1 / 3, PLTP y PAF-AH. La actividad de las enzimas asociadas a HDL (LCAT, PON1, PAF-AH) es igualmente elevada en HDL3c pequeñas y densas ⁽²⁴⁾. El proteoma de las HDL3c también contiene apoA-I, apoA-II, ApoD, ApoM, SAA 1, 2 y 4, apoC-I, apoC-II y apoE. De acuerdo

con estos datos, apoL-I, apoF, apoJ, PON1, apoA-IV, ApoM, ApoD y SAA1 / 2 se sabe que se co-aislan preferentemente con HDL3 densas. Además, las HDL pequeñas y densas se pueden representar también como portadoras preferenciales para la CETP humana. Por otro parte, apoE, apoC-I, apoC-II y apoC-III se pueden localizar preferentemente con las HDL2 grandes y ligeras ⁽²⁵⁾. El bajo contenido de estas proteínas de menos de una copia de la mayoría de las partículas de HDL sugiere una gran heterogeneidad interna de la subfracción HDL3c. Esta conclusión es coherente con el aislamiento de una partícula única que contiene el factor lítico de tripanosoma, apoL-I, más apoA-I y Hrp en el rango de densidad de la HDL3 ⁽²⁶⁾.

Así, las interacciones específicas proteína-proteína deben conducir a la formación de complejos de lipoproteínas en la circulación. En apoyo de este mecanismo, PLTP en plasma humano reside en complejos pobres en lípidos dominados por apoJ y proteínas implicadas en la defensa e inflamación del huésped. Por otra parte, apoJ, apoA-I y apoE conservan la actividad de transferencia de lípidos de PLTP recombinante en ausencia de lípidos, lo que indica que estas interacciones pueden tener un significado funcional ⁽²⁷⁾. De hecho, la apoA-I aumenta la actividad de PLTP secretada por las células espumosas derivadas de macrófagos.

Estos datos muestran que los análisis proteómicos pueden proporcionar una visión profunda de la heterogeneidad de las partículas de HDL. Las limitaciones de este enfoque implican su carácter cualitativo o semicuantitativo, los resultados dependen críticamente de la metodología de aislamiento y purificación de las HDL, la naturaleza del material biológico de partida (suero o plasma) y también la tecnología de espectrometría de masas utilizada para el análisis de las proteínas y su cuantificación. Por ejemplo, las partículas de HDL aisladas a partir de suero de las de plasma se diferencian en su contenido de varias proteínas, incluyendo C3 del complemento, que es mayor en las HDL derivadas de suero. Además, HDL aislado por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) está fuertemente contaminado por las proteínas plasmáticas de alto peso molecular que coexisten con las HDL. Por esta razón, la ultracentrifugación con gradiente de densidad sigue siendo la metodología predominante en el aislamiento de las HDL para estudiar su proteoma ^(28, 29).

Funciones e implicaciones clínicas de las HDL:

Los principales efectos cardioprotectores de las HDL se atribuyen a su papel en el transporte en reversa del colesterol y el eflujo de colesterol. Sin embargo, la HDL tiene también funciones antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, de estabilización endotelial e inhibición de activación plaquetaria. ^(30, 31)

a).- Actividad antioxidante de las HDL: El papel antiaterogénico de las HDL se debe a la capacidad antioxidante que poseen⁽³²⁾. Varios de sus elementos participan en esta propiedad, entre ellos sus apolipoproteínas y particularmente la paraoxonasa, enzima asociada físicamente a las HDL plasmáticas⁽³³⁻³⁵⁾.

b).- Regulación de respuesta inflamatoria por las HDL: Las HDL inhiben la expresión de la VCAM-1, ICAM-1 y de la E-selectina. Estas moléculas están relacionadas con la adhesión de linfocitos y monocitos circulantes, así como el anclado y rodamiento en la superficie de las células endoteliales⁽³⁶⁾.

c).- Inmunidad innata: Se ha sugerido que algunas de las proteínas asociadas a las HDL actúan como plataforma para el montaje de potentes complejos inmunomoduladores que regulan la actividad antimicrobiana ⁽³⁷⁾.

d).- Modulación del metabolismo de glucosa: Cuando la expresión del gen apo-AI se encuentra reducida, los niveles de glucosa e insulina se incrementan. ⁽³⁸⁾ Observaciones recientes indican que las infusiones de partículas rHDL (HDL reconstituido) reducen la glucosa en plasma, incrementan la secreción de insulina y absorción de la glucosa por el músculo esquelético en pacientes con DM tipo 2. ⁽³⁸⁾

e).- Funciones anti-apoptóticas

Se ha demostrado que las HDL inhiben la apoptosis de al menos seis diferentes tipos de células incluyendo células vasculares endoteliales, del músculo liso, algunos leucocitos, células β pancreáticas, cardiomiocitos, incluso los osteoblastos que forman el hueso.⁽³⁹⁾

Métodos existentes para medir la funcionalidad o la composición de las HDL:

La relación inversa existente en la población general entre los niveles de colesterol HDL y el número de eventos coronarios no aplica en condiciones que alteran la función (composición proteica y/o lipídica) de estas partículas. Por ello, es necesario contar con

pruebas bioquímicas que midan la función/composición de las partículas. Sin embargo, la mayoría de tales pruebas se limitan a centros de investigación por su complejidad o por carecer de validación en estudios epidemiológicos. Las pruebas existentes se comentan a continuación y se hará énfasis especial en algunas de ellas.

1.- Evaluación del TRC ⁽⁴⁵⁾.

2.- Subfracciones de HDL y sus funciones ⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾.

3.- Evaluación de actividad de LCAT ⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾.

4.- Evaluación de la función antioxidante de HDL: Paraoxonasa 1 ⁽⁵²⁾ y evaluación de actividad de mieloperoxidasa (MPO)^(53,54).

5.- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de las HDL: la aterosclerosis constituye una inflamación vascular crónica mediado por LDL-ox. Cuando la inflamación es localizada (sin una respuesta inflamatoria sistémica generalizada) la HDL protege contra la aterosclerosis promoviendo el TRC, inhibiendo la formación de placas, reduciendo la oxidación de LDL y reduciendo la generación de factores de inflamación (PCR, IL-6) y los factores de adherencia de macrófagos (VCAM-1, ICAM-1). Sin embargo, las HDL aisladas de pacientes con enfermedad coronaria e incluso con niveles elevados de C-HDL no son eficaces contra la aterosclerosis, y pueden ser incluso proinflamatorias, lo que sugiere que la calidad de las HDL es más importante que su cantidad. Por lo tanto, es de gran significado determinar la función antiinflamatoria de las HDL.

Actualmente los ensayos con células tales como el análisis de la actividad quimiotáctica de los monocitos (MCA) ⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾ y el ensayo libre de células (CFA) ⁽⁵⁷⁾ se utilizan para evaluar la función antiinflamatoria de las HDL. En el método de MCA, lipoproteínas y paredes arteriales de humanos (células endoteliales y células de músculo liso) se incuban y los monocitos son preparados. La inducción de MCA por un control estándar de LDL se determina en ausencia o presencia de HDL de pacientes. Los valores en ausencia de HDL se normalizan a 1.0. Los valores >1.0 después de la adición de HDL indica que las HDL son proinflamatorias, mientras que los valores <1.0 señalan HDL antiinflamatorias.

Por otra parte, el CFA es una prueba rápida para medir la función de las HDL y no requiere de células. El PEIPC (1-palmitoil-2-5,6-epoxi-isoprostano-E-sn-glicero-3-

fosfocolina) o LDL's controles se utilizan como agentes inductores de fluorescencia, las cuales se mezclan con diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) y son incubados en ausencia o presencia de HDL del paciente. El cambio en la intensidad de fluorescencia como resultado de la oxidación de la DCFH por el PEIPC (o LDL) en la ausencia o presencia de la HDL del paciente se utiliza para determinar las propiedades inflamatorias de las HDL. Valores en ausencia de HDL son normalizadas a 1.0. Los valores >1.0 después de la adición de HDL indica HDL proinflamatorias, mientras que valores <1.0 muestra HDL antiinflamatorias. Esta última metodología fue descrita por un grupo de investigadores de la Universidad de California, Los Ángeles (UCLA). Sin embargo, aunque el ensayo ha demostrado resultados que se correlacionan con el ensayo basado en células, no ha tenido una amplia utilización debido a dificultades técnicas en obtener resultados consistentes entre otros investigadores⁽⁵⁷⁾.

Recientemente éste mismo grupo desarrolló un ensayo libre de células alternativo para cuantificar la actividad redox de las HDL, que se describe a continuación:

5a.- Método fluorimétrico para evaluación de las propiedades oxidativas de las HDL:

El nuevo ensayo mide los ciclos de productos de redox. Esto a través de la tasa de oxidación del fluorocromo dihidrorodamina-123 (DHR). La tasa de oxidación de DHR en la presencia de HDL refleja la actividad oxidante/antioxidante de las HDL. En este ensayo cuando el índice proinflamatorio es mayor a 1, se considera pro-inflamatorio y un valor menor a 1 es considerado anti-inflamatorio⁽⁵⁸⁾. Este ensayo proporciona una lectura que se correlaciona ampliamente, desde el punto de vista teórico, al ensayo basado en células previamente validado cuando se utiliza HDL purificada (MCA). Otra ventaja, también teórica, es que es reproducible, y susceptible de aplicación de alto rendimiento.

Recientemente el mismo grupo de UCLA describió una nueva modificación del CFA inicial⁽⁵⁹⁾. Nosotros utilizamos las 3 metodologías en este estudio.

6.- Análisis del proteoma y lipidoma de las HDL: 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 (e incluso semicuantitativo) de los componentes de las partículas.

6a: Lipidoma: Yetukuri y colaboradores ⁽⁶⁰⁾ describieron las diferencias en la composición de fosfolípidos de las HDLs existentes entre pacientes con colesterol HDL alto o bajo, usando cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas. Las personas con C-HDL alto tienen concentraciones mayores de lisofosfatidilcolina, esfingomiélin y ésteres de colesterol; en contraste, su contenido de triglicéridos, plasmalógenos de etanolamina y compuestos con numerosas dobles ligaduras es menor. Los cambios en composición determinan una distribución distinta de los lípidos en la superficie de la partícula. Los casos con C-HDL bajo tienen un mayor número de moléculas de triglicéridos y una cantidad menor de colesterol en la superficie de las HDLs.

Estas anomalías aumentan la afinidad de la partícula por la lipasa hepática y por ende, la probabilidad de ser degradada. La menor cantidad de esfingomiélin de las HDL de pacientes con colesterol HDL bajo disminuye los precursores de moléculas antiinflamatorias. Lo opuesto ocurre con el acúmulo de plasmalógenos de etanolamina, los cuales son precursores de 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 ⁽⁶⁰⁾.

6b.- Proteoma: Davidson y cols ⁽⁶¹⁻⁶²⁾ aislaron las HDLs y sus subclases 2b, 2a, 3a, 3b y 3c usando ultracentrifugación y un gradiente de densidades isopícnico con sales neutras. Identificaron 28 proteínas distintas y dieron a conocer 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. El mismo grupo demostró que la composición proteica es distinta entre las subclases de HDL. Por ejemplo, las proteínas encontradas exclusivamente en las HDL3 son apoL-I, apoF, PON1/2, PLTP, apoJ, PON3, A1AT, apoA-IV, albumina, fibrinógeno, Hrp, PBP y transtiretina. En contraste, la apoD, la apoM y el péptido amiloide sérico se encuentran preferentemente en las HDL3 de mayor densidad. Por el contrario, las apo E, CII y CIII fueron identificadas en forma exclusiva en las HDL2. Las apoAI, CI y CIV fueron encontradas en todas las subclases de HDLs. Estos datos sugieren que la composición proteica de las subclases de HDL no está determinada al azar y que resulta de la

interacción de las proteínas que comparten funciones. Por ende, cada variedad de HDL puede tener una función específica. ⁽⁶¹⁻⁶²⁾

La proteómica de las HDL mediante espectrometría de masas descrito previamente ha sido empleada para comparar la composición de las HDL entre individuos sanos y casos con diversas entidades que se caracterizan por tener un estado de inflamación crónica (cardiopatía isquémica, diabetes, infección por VIH, enfermedad renal crónica, etc). Los estudios son prometedores pero aún con limitaciones debidas a un tamaño de muestra insuficiente o el empleo de más de un método de preparación y análisis de las HDL. Vaisar y cols ⁽⁶³⁾ reportaron que las HDLs de pacientes con cardiopatía isquémica contienen varios inhibidores de proteinasas que participan en la aterosclerosis y cuya presencia ha sido documentada en las placas de ateroma. Además se encontró un enriquecimiento en las HDL3 de apoC-IV, paraoxonasa 1, C3, apoA-IV y apoE. También probaron el efecto de la combinación estatina/niacina en estos mismos pacientes. Informaron que la niacina incrementa 16% la concentración de las HDL2, sin cambios en las HDL3. Reportaron 27 proteínas en las HDL3, 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 HDL3. Replicaron el hallazgo de enriquecimiento en apoE de las HDL3 e identificaron que además tienen menor cantidad de apoJ y PLTP que las HDL3 de los sujetos sanos.

HDLS disfuncionales y patologías inflamatorias:

La inflamación crónica y/o respuesta de fase aguda modifican la estructura y composición de las HDL, lo cual repercute en sus funciones biológicas⁽⁴⁰⁾. Las modificaciones estructurales de las HDL se han documentado en infecciones, diabetes, enfermedad coronaria, tabaquismo y enfermedades reumáticas o de la colágena. Estas modificaciones reducen la eficiencia del transporte en reversa del colesterol, los efectos antiinflamatorios y antioxidativos e incluso promueven la formación de LDL oxidadas, las cuales pueden de forma subsecuente, promover reacciones inflamatorias dentro de las lesiones ateroscleróticas (HDL proinflamatorias). Las HDL's de los pacientes con enfermedad coronaria tienen mayor contenido de lípidos hidroperóxidos, lo cual las hace

ineficaces como antioxidantes y promueven la actividad de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP) en las paredes de las arterias ⁽⁴¹⁾.

Los oxidantes acumulados inhiben la actividad de las enzimas antioxidantes asociadas a HDL, lo que finaliza en la incapacidad de la ApoA-I para promover el eflujo de colesterol mediado por ABCA1 y se promueve la formación de lípidos oxidados derivados de LDL y oxidación de LDL. El contacto continuo de las LDL-ox en el endotelio acelera el desarrollo de aterosclerosis ⁽⁴²⁾. Además, las HDL 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 paraoxonasa en las HDL disminuye. La proteína amiloide A desplaza a la ApoA-I y disminuyen la capacidad de las HDL para captar lípidos oxidados. Como resultado, las HDL tienen acciones proinflamatorias y aportan lípidos (en vez de removerlos) a los tejidos periféricos.

La relevancia clínica de las HDL proinflamatorias ha sido evaluada en varias colagenopatías, como el lupus eritematoso generalizado (LEG). Las mujeres con LEG tienen un incremento alarmante de riesgo de enfermedad coronaria (7 a 50 veces más de lo normal). Se ha reportado la presencia de HDL proinflamatorias en un 44.7% de las mujeres con LEG, y en mujeres con artritis reumatoide se encuentran en un 20.1%; a diferencia de las mujeres sanas que solo se encuentran en un 4.1% de ellas. Las mujeres con lupus o artritis reumatoide tendrán HDL proinflamatorias, sin importar la ocurrencia de periodos de actividad ⁽⁴³⁾. 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. ⁽⁴⁴⁾ Metabólicamente, varios pasos en el metabolismo de las HDL están afectados por la inflamación. Específicamente, las citosinas proinflamatorias tales como el interferón gamma (INF- γ) y la interleucina-1-beta (IL-1 β) así como proteínas inflamatorias tales como proteína C reactiva, inhiben la expresión de ABCA-1. Además, la actividad de sPLA y lipasa endotelial están elevadas, mientras que las de LCAT, CETP y lipasa hepática están disminuidas durante los estados de respuesta inflamatoria. Las enzimas sPLA pertenecen a una familia de enzimas proaterogénicas que hidrolizan fosfolípidos de las lipoproteínas, incrementando su afinidad para

proteoglucanos de la íntima. Estas enzimas también contribuyen a la carga de colesterol de los macrófagos por las vías mediadas por el receptor no scavenger y activan las vías inflamatorias. La actividad elevada de sPLA2 reduce los niveles de HDL, incrementa los lípidos bioactivos proinflamatorios y puede acelerar la aterogénesis en ratones transgénicos.

Artritis reumatoide y HDL proinflamatorias.

Los pacientes con artritis reumatoide (AR) tienen un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, incluyendo infarto del miocardio y muerte súbita, lo cual no se explica por los factores de riesgo tradicionales, tal como lo hemos comentado previamente para las enfermedades que se caracterizan por tener inflamación crónica. De hecho, varios estudios previos han demostrado que la inflamación sistémica contribuye a la enfermedad cardiovascular en AR, y los pacientes con enfermedad activa y una carga inflamatoria elevada tienen todavía mayor riesgo ⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾. Aunque algunos datos han sugerido que la tasa de mortalidad en pacientes con AR ha disminuido como respuesta a las nuevas terapias, las tendencias en la supervivencia aún no se emparejan a la de la población general ⁽⁶⁷⁾ y la enfermedad cardiovascular persiste como la primera causa de muerte ⁽⁶⁸⁾. La enfermedad cardiovascular causa 50% de las muertes prematuras en AR. De hecho, se reconoce que la artritis reumatoide eleva el riesgo cardiovascular en la misma extensión que la diabetes ⁽⁶⁹⁾. Los factores de riesgo asociados con esta mayor mortalidad incluyen el sexo femenino, la elevación de los marcadores de inflamación, la sinovitis persistente, erosiones, características extra-articulares que incluyen nódulos reumatoideos, vasculitis y enfermedades pulmonares, así como la positividad al factor reumatoide y a los anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados. Además, los pacientes con AR tienen una mayor carga de factores de riesgo tradicionales que la población general. El tabaquismo se asocia tanto al desarrollo de enfermedad cardiovascular como al desarrollo de AR. La incapacidad causada por esta enfermedad autoinmune puede limitar la capacidad para realizar actividad física. Los niveles elevados de TNF- α en pacientes con AR puede promover la resistencia a la insulina, lo cual en conjunto con la inactividad física pueden generar el desarrollo de síndrome metabólico. Ciertamente, los pacientes con AR pueden tener dislipidemias, la cual se caracteriza por una elevación de las cifras

de triglicéridos así como disminución del CT, C-LDL y C-HDL ⁽⁷⁰⁾. Esto quiere decir, que la inflamación se asocia a una inversión paradójica de la relación habitual entre el riesgo cardiovascular y los niveles de lípidos. Interesantemente, varios estudios han mostrado una elevación en las cifras de lípidos con una exitosa reducción de la actividad de AR después de terapia antiinflamatoria. Estas observaciones implican que la interpretación tradicional del perfil de lípidos para predecir riesgo cardiovascular en la población general puede confundirse en la actividad de la enfermedad de la AR. El mecanismo que se ha implicado mayormente en esta disparidad ha sido que las HDL pierden su capacidad protectora y se convierten en proinflamatorias. Como hemos mencionado en el apartado previo, en AR existe un mayor aumento en la cantidad de HDL proinflamatorias ⁽⁷¹⁾. Sabemos que éstas HDL promueven la oxidación y el desarrollo de células espumosas.

Por lo tanto, el investigar los mecanismos que precipitan la aterosclerosis acelerada en pacientes con AR, específicamente en lo que concierne a la calidad de las HDL, es importante tanto para el tratamiento apropiado como para la prevención primaria agresiva.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:

Actualmente existen limitaciones en nuestra capacidad para predecir completamente el riesgo cardiovascular. Esto ha llevado a grandes esfuerzos para identificar nuevos marcadores y, por lo tanto, refinar la medición los factores de riesgo tradicionales, tal como el colesterol de baja densidad (C-LDL) y el colesterol de alta densidad (C-HDL). Varios estudios epidemiológicos a gran escala han demostrado que el C-HDL es uno de los mejores predictores de enfermedad cardiovascular y ha sido reconocido como factor de riesgo independiente asociado a aterosclerosis. En la práctica, la concentración plasmática de las HDL se estima generalmente por la medición del colesterol contenido en estas lipoproteínas (C-HDL). Este método no garantiza una medida precisa de la cantidad de partículas HDL. Por lo tanto, parece que la relación entre HDL y el riesgo de enfermedad coronaria es más compleja y no solamente está condicionada a las concentraciones en plasma de C-HDL. Por lo tanto, desde una perspectiva epidemiológica, los niveles de C-HDL parecen no ser el parámetro adecuado para evaluar la contribución de las HDL sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Es necesario entender qué formas de HDL son cardioprotectoras y cómo funcionan en la pared arterial.

Desde hace algunos años el enfoque se ha venido cambiando hacia la evaluación de la calidad de las HDL (en vez de solamente la cantidad); esto quiere decir, evaluar su funcionalidad. Ya que el C-HDL es un marcador imperfecto de la función de las HDL, la capacidad pronóstica de este indicador se pierde en condiciones que alteran la composición de las HDL, sin modificar su contenido de colesterol. Aunque la evidencia es preliminar, se han encontrado indicadores de la función de las HDL que podrían brindar información clínica complementaria a la obtenida del C-HDL. La mayoría de los métodos vigentes implican el empleo de cultivo de tejidos y técnicas limitadas a centros de investigación. Sin embargo, tal metodología está fuera del alcance del clínico.

La composición de los componentes proteicos y lipídicos de las HDL (proteoma y lipidoma), puede modificarse por condiciones metabólicas asociadas con una aterogénesis acelerada, lo cual es típico en las dislipidemias, estados de resistencia a la insulina, estados inflamatorios agudos y crónicos y en enfermedades infecciosas. Tales cambios en las proteínas asociadas a HDL pueden promover el desarrollo de aterosclerosis, incluso en ausencia de disminución de las concentraciones plasmáticas de las HDL.

Como he mencionado previamente, la funcionalidad (naturaleza antiinflamatoria o proinflamatoria) de las HDL puede ser un marcador más sensible de enfermedad cardiovascular que los niveles de HDL. De esta manera, existe la necesidad de mayor investigación sobre biomarcadores (proteínas o lípidos) asociados a las HDL que tengan mayor valor predictivo en la funcionalidad de las mismas ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. Los cambios moleculares y mecanismos que promueven la conversión de HDL antiinflamatorias a proinflamatorias se desconocen actualmente. El conocer los perfiles moleculares que distinguen a las HDL proinflamatorias de las antiinflamatorias puede facilitar nuestro entendimiento de las alteraciones en las proteínas cargo de las HDL, lo cual puede afectar adversamente sus funciones antioxidantes y antiinflamatorias normales. Los niveles de HDL proinflamatorias están elevadas en pacientes con AR comparado con los controles sanos ⁽⁷¹⁾. E incluso se ha reportado que los niveles de HDL proinflamatorias se correlacionan positivamente

con actividad de la enfermedad en este mismo grupo de pacientes ⁽⁷⁵⁾. Sin embargo, actualmente desconocemos la diferencia en la composición proteica de las HDL proinflamatorias con respecto a las antiinflamatorias en pacientes con AR, que pueda explicar la pérdida de su funcionalidad normal. Por lo tanto, nosotros planteamos evaluar las HDL con distintas propiedades inflamatorias (tanto antiinflamatorias como proinflamatorias) del suero de pacientes con AR y sus controles sanos pareados, someterlas al análisis de espectrometría de masas, evaluar la composición proteica de las mismas e identificar proteínas distintivas las cuales puedan servir como marcadores que distingan HDL proinflamatorias de las antiinflamatorias.

4.- OBJETIVO GENERAL

-Comparar la composición proteica de las HDL de los pacientes con artritis reumatoide con o sin actividad inflamatoria y contra controles sanos.

Objetivos específicos.

- ✓ Describir la concentración de los lípidos sanguíneos en sujetos con y sin artritis reumatoide (AR con y sin actividad).
- ✓ Describir las concentraciones de las HDLs totales en sujetos con y sin artritis reumatoide (AR con y sin actividad).
- ✓ Describir las diferencias existentes en el índice inflamatorio entre sujetos con y sin artritis reumatoide (AR con y sin actividad).
- ✓ Comparar el porcentaje de HDL proinflamatorias entre los pacientes con AR y controles sanos.
- ✓ Identificar las diferencias en la composición proteica de las HDLs totales entre sujetos con y sin artritis reumatoide (con y sin actividad).
- ✓ Correlacionar los cambios en la composición proteica de las HDLs totales con el índice inflamatorio en sujetos con y sin artritis reumatoide (AR con y sin actividad).
- ✓ Identificar una proteína o grupo de proteínas que puedan servir como marcadores que logren distinguir HDL proinflamatorias de las antiinflamatorias

5.- HIPÓTESIS

Hipótesis nula: La composición proteica de las HDL y el índice inflamatorio no se modifican por la existencia de la artritis reumatoide y/o por la actividad de la enfermedad.

Hipótesis alterna: La composición proteica de las HDL y el índice inflamatorio se modifican por la existencia de la artritis reumatoide y/o por la actividad de la enfermedad

6.- METODOLOGÍA

Diseño del estudio

Estudio comparativo, de procedimiento, observacional, transversal y prolectivo.

Evaluación clínica

Se invitaron a participar sujetos con y sin AR pareados para edad (± 5 años) y sexo. Los pacientes con AR fueron identificados de la consulta de Reumatología y de la base de datos de la clínica de Artritis Reumatoide del INCMNSZ y después de su inclusión en el estudio, se clasificaron acorde a su grado de actividad. Se utilizaron los criterios de actividad de la enfermedad DAS-28 (anexo 1), evaluados por el reumatólogo del estudio. Se consideró remisión de la AR cuando el valor de DAS-28 fue < 2.6 . Se consideró AR activa cuando el valor de DAS-28 fue ≥ 2.6 . Dentro de los pacientes con actividad, se dividió a los mismos con actividad leve cuando el DAS-28 fue ≥ 2.6 y < 3.2 . Actividad moderada un DAS-28 ≥ 3.2 y < 5.1 . Actividad alta un DAS-28 ≥ 5.1 . Los controles sin AR fueron detectados de la consulta externa del Instituto. Después de la evaluación por el reumatólogo (los casos), ese mismo día se les citó al Departamento de Endocrinología y Metabolismo por la mañana, previo ayuno de 9 a 12 horas. A su llegada se entregó consentimiento informado del estudio. Después de que aceptaron participar, se les aplicó cuestionario estandarizado (ver anexo 2), que incluyó su historia clínica, variables demográficas (antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, cerebrovascular, pancreatitis, dislipidemia, obesidad), toxicomanías. Las mediciones antropométricas de peso, talla, IMC, perímetro de cintura y cadera, relación cintura/cadera, presión arterial se realizarón en 2 ocasiones. Se tomó el promedio de éstas mediciones por personal

estandarizado para dicha evaluación. Se determinó la ingestión alimentaria habitual por medio del recordatorio de 24 horas de 3 días, dos días entre semana y un día de fin de semana. Dicho cuestionario lo realizó personal de Nutriología del departamento de Endocrinología, estandarizados para llevar a cabo este tipo de cuestionarios. Aplicaron los cuestionarios y posteriormente convirtieron cada alimento preparado notificado en cantidad de gramos o mililitros de alimento para calcular las Kcal y el contenido de nutrimentos de la dieta. Después se obtuvo una muestra sanguínea (40 ml) a los sujetos en estudio, donde se llevó a cabo la medición de la concentración de los lípidos sanguíneos y el futuro aislamiento de las partículas de HDL (para ello se guardaron a -80°C hasta su procesamiento). Además sirvió para el análisis de VSG, proteína C reactiva (PCR), factor reumatoide (FR) y anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (antiCCP). Los parámetros sanguíneos fueron medidos en el Laboratorio de Endocrinología del INCMNSZ, el cual está certificado por el Colegio Americano de Patólogos para llevar a cabo este tipo de mediciones.

Criterios de selección:

Casos:

a.- AR con actividad

Individuos mayores de 18 años de edad hasta 65 años, con diagnóstico de AR, definido según los criterios de la ACR de 1987 para clasificación de la AR; con actividad de la enfermedad (evaluado por el reumatólogo del estudio mediante la escala de actividad DAS-28, la cual debió ser un puntaje ≥ 2.6) y que firmaron el consentimiento informado (ver anexo 1 para criterios ACR 1987 y escala DAS-28). Los pacientes tenían permitido tomar medicamentos modificadores de la enfermedad que no interfirieran en el perfil de lípidos como metotrexate, azulfidina, leflunomida.

b.- AR sin actividad

Individuos mayores de 18 años de edad hasta 65 años, con diagnóstico de AR, definido según los criterios de la ACR de 1987 para clasificación de la AR; sin actividad de la enfermedad (evaluado por el reumatólogo del estudio mediante la escala de actividad DAS-28, la cual debe tener un puntaje < 2.6) y que firmaron el consentimiento informado (ver anexo 1 para criterios ACR 1987 y escala DAS-28). Los pacientes tenían

permitido tomar medicamentos modificadores de la enfermedad que no interfirieran en el perfil de lípidos como metotrexate, azulfidina, leflunomida.

c.- Controles:

Individuos mayores de 18 años de edad hasta 65 años, sin artritis reumatoide, pareados por edad (\pm 5 años) y género.

Criterios de exclusión:

1. Enfermedad coronaria existente (excluidos mediante uso de cuestionario).
2. Diabetes Mellitus.
3. Alcoholismo (consumo de más de 2 raciones al día).
4. Obesidad extrema con IMC $>40\text{kg/m}^2$
5. Nivel de triglicéridos $> 1000 \text{ mg/dl}$.
6. Enfermedad aguda en las seis semanas previas.
7. Uso de estatinas, fibratos, esteroides, antipalúdicos u otros medicamentos que alteren el perfil de lípidos.

Criterios de eliminación. Retiro voluntario del paciente.

Variables a medir (definiciones operacionales).

La glucemia plasmática se midió empleando el método de glucosa-oxidasa (Beckman-Coulter). En la determinación del colesterol total, triglicéridos, C-HDL (método directo), creatinina, apolipoproteína A y apolipoproteína B se emplearon métodos enzimáticos comerciales de la marca Beckman-Coulter. El coeficiente de variación que se obtiene con éste tipo de metodologías fue de 2.5%. La determinación de LDL se estimó por la fórmula de Friedewald. El aislamiento de las subpoblaciones de HDL se hizo por ultracentrifugación por gradiente de densidad.

Índice pro-inflamatorio de las HDL: Para determinar las propiedades proinflamatorias de HDL, se evaluaron el cambio en la intensidad de fluorescencia como un resultado de la oxidación de la diclorofluoresceína (DCFH), en incubaciones con un control LDL estándar normal, en presencia o ausencia del HDL de prueba. El diacetato de DCFH (sondas moleculares, Eugene, OR), se disolvió en metanol fresco a una concentración de 2mg/ml y se incubó a temperatura ambiente en campo oscuro, dando como resultado la liberación de DCFH. Veinticinco microlitros de colesterol LDL (100 $\mu\text{g/ml}$) se mezclaron

con 50 µl de HDL prueba (100 µg/ml) en placas oscuras de microtitulación de poliestireno con fondo plano y se incubarán a 37 grados C por 30 minutos, con rotación. Veinticinco microlitros de solución de DCFH (0.2 mg/ml) se adicionaron a cada pozo, mezcladas e incubadas a 37°C por 1 hora, con agitación. La fluorescencia se determinó con un lector de placas (SpectraMax, Gemini XS; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm, y un punto de corte de 515 nm. Las lecturas con DCFH y colesterol LDL se normalizaron a 1.0. Lecturas >1.0 después de la adición del colesterol HDL prueba indicó HDL proinflamatoria, y lecturas <1.0 indicó HDL antiinflamatorias. Estas lecturas constituyen el índice pro-inflamatorio. Este análisis se realizó en el departamento de Endocrinología del INNSZ.

También utilizamos la técnica descrita en 2014 que tiene algunas variantes de las descritas originalmente y que propuso el mismo grupo de UCLA. Para desarrollar el método anterior es necesario contar con los siguientes reactivos: LDL control (a una concentración de 50 µg/ml), placas de polipropileno de fondo plano y negro, HDL del paciente (a una concentración de 50 µg/ml) y DCFH-DA. El procedimiento incluyó la incubación de 12.5 microlitros de LDL y 12.5 microlitros de una solución que contiene HDL del paciente en estudio mezclados con 75 µl de buffer Tris-HCl (pH 7,4) se incubaron a 37°C durante 60 min. Además, 25 µl de solución de DCFH (50 microgramos/ml) se añadieron a cada pocillo, se mezclaron, y se incubó a 37 ° C durante 2 h. La intensidad de fluorescencia se determinó con un lector de placas (SynergyMx, BioTek, Vermont, EE.UU.) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y longitud de onda de emisión de 530 nm. Los datos de fluorescencia de DCF se convirtieron en un índice inflamatorio de las HDL (IIH) que iguala la relación de la fluorescencia en presencia de HDL dividido por la fluorescencia en ausencia de HDL

Proteómica de las HDL: Esta se realizó en la unidad de servicios de apoyo a la investigación (Bio-USAI) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Análisis para la identificación proteínas en solución.

Las muestras se cuantificaron para determinar la cantidad de proteína utilizando un nanodrop 2000 de Thermo Scientific y se procesaron 4ul con una cantidad no menor a 200ng por microlitro. Posteriormente se evaporaron hasta sequedad en una DNAspeedVac y se reconstituyeron en un buffer 6 M de Urea en 100mM Tris-HCl, pH 8.5, se incubaron por 15 minutos y se procedió a la reducción y alquilación durante 1 hora. Posteriormente la muestra se purificó y digirió con tripsina porcina durante 18 horas. Los péptidos se resuspendieron en 30 µl de ácido fórmico al 1% (v/v), y fueron desalados y concentrados por Ziptip C18 y eluidos en 12 µl de fase móvil (3% acetonitrilo 0.1% de ácido fórmico) para posteriormente ser analizados por espectrometría de masas.

Análisis de espectrometría de masas LC/MS/MS de péptidos trípticos: se llevó a cabo utilizando un sistema de nano- LC_ESI_MS/MS integrado (espectrómetro de masas cuadrupolo/tiempo de vuelo , SYNAPT G2S de alta resolución, Waters Corporation), equipado con una fuente de iones NanoLockSpray . El instrumento se acopló en línea a un nanoACQUITY cromatógrafo de líquidos Ultra Performance (UPLC), (Waters Corporation). El sistema de disolventes binario utilizado fue agua grado LCMS con ácido fórmico al 0,1% (fase móvil A) y de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 % (fase móvil B). Las muestras se concentraron y desalaron mediante inyección en una columna de trampa 2G nano Acquity UPLC (5 µm , 180 µm x 20 mm , Waters Corporation) y se lavó con 95 % de fase móvil A y 5% de la fase móvil B a una velocidad de flujo de 5 µL/min. Después de 3 min en la columna de trampa, la muestra pasa a la columna analítica. Los péptidos se separaron en una columna nanoACQUITY UPLC 1.7um, BEH130 C18, 100 umX100mm. Num. de lote: 0223331961 , Waters Corporation) utilizando el siguiente gradiente:

0 min 95%A 5%B
10 min 85%A 15%B
90 min 60%A 40%B
91 min 20%A 80%B
92 min 10%A 90%B
105 min 10%A 90%B

110 min 95%A 5%B

Dando un tiempo de análisis total de 110 min , a una velocidad de flujo de 0,45 μ L / min. El espectrómetro de masas se calibró con una solución [Glu1]-Fibrinopéptido B y operado en el modo ESI positivo con una resolución de 20,000. Los espectros se adquirieron en modo automatizado mediante la adquisición de datos MS^E. La solución de [Glu 1] fibrinopéptido B (100 fmol / uL) fue infundido a través del atomizador de referencia de la fuente de NanoLockSpray a un caudal de 0.5uL / min y se tomaron muestras a intervalos de 30 s durante la adquisición. El barrido de masas se hace de 50-2000Da . Se utiliza una rampa de energía de colisión de 15-45V.

Proceso de Datos y de identificación de proteínas:

Los archivos de datos crudos fueron procesados utilizando la versión 2.5.3 del servidor ProteinLynx Global software (PLGS, Waters Corporation). Se realizaron búsquedas en la base de datos UNIPROT utilizando a la tripsina como proteasa específica, las pérdidas de ruptura se dejaron con tolerancias de masa de 50 ppm y 0,05 Da para el ion precursor y el fragmento, respectivamente. Variables de modificaciones incluyen la oxidación de metionina y la desaminación -glutamina asparagina. Los péptidos identificados coinciden con las puntuaciones PLGS que excedan el nivel del 95 % de confianza son aceptados como correctos. Estas muestras se procesaron en la unidad de servicios de apoyo a la investigación (USAI)-Facultad de Química de la UNAM

VARIABLES Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Desenlace principal: Tipo de proteínas contenidas en las HDL

Desenlace secundario: índice proinflamatorio y antiinflamatorio de las HDL

Variables principales:

Variable	Escala
Colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL, subpoblación de HDL, índice inflamatorio de las HDL.	Dimensional (numéricas).
Proteínas presentes en HDL	Nominales (ApoA-1, PON-1, ApoE, etc.)
Proteínas presentes en HDL	Dimensionales (numéricas).

Variables secundarias:

Variable	Escala
Tratamientos empleados.	Nominales (categórica).
Peso	Dimensional (numérica).
Talla	Dimensional (numérica).
Contenido calórico de dieta.	Dimensional (numérica).

Estrategia de análisis estadístico: Se realizó estadística descriptiva, se presentan los datos en medias con DE o mediana e intervalo intercuartilar. Se utilizó la prueba de Chi cuadrada para comparar entre los grupos el tipo de proteínas identificadas en las HDL. Se consideró una p significativa <0.05. El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 18.0 IL.

7.- RESULTADOS:

Se invitaron a participar a 25 pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide, con distintos grados de actividad y duración de la enfermedad. Se lograron incluir 11 pacientes activos y 14 pacientes en remisión. De los pacientes activos, 8 tenían actividad moderada y 3 actividad alta, no hubo ninguno con actividad baja. La actividad de la enfermedad varió desde un DAS-28 de 1 hasta 7 para el más activo. En cuanto a la duración de la enfermedad, ésta varió desde un diagnóstico reciente de 1 mes hasta un diagnóstico previo de 16 años con la enfermedad. Los pacientes fueron excluidos del estudio si tomaban algún tratamiento farmacológico que incluyera medicamentos que modifican el perfil de lípidos como la prednisona o los antipalúdicos. Solamente se incluyeron a los pacientes que tomaban metotrexate, azulfidina o leflunomida. Dichos pacientes se parearon con 25 controles sanos, pareados por sexo, edad ± 5 años y con un IMC que no fuera ≥ 2 Kg/m² en un intento de que no hubiera una variación importante en las cifras de lípidos.

El índice inflamatorio de las HDL (IIH) en los pacientes con AR fue de 0.9925 y en los controles de 1.0100, por lo tanto, no se encontró diferente en los pacientes que en sus controles sanos; de hecho, al contrario de lo esperado, el valor del IIH fue ligeramente

mayor en los pacientes sanos, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (**tabla 3**). El perfil de lípidos para ambos grupos tampoco mostró diferencia significativa, incluyendo los valores de C-HDL. Como era de esperarse por la selección de los pacientes, las demás características antropométricas y bioquímicas no fueron diferentes estadísticamente (**tabla 3**), lo cual nos permitió asegurar una población homogénea para estudio.

También hicimos comparaciones para saber si el valor del IIH era mayor en los pacientes con AR comparado con sus controles sanos (**tabla 4**). Sin embargo, al contrario de lo que esperábamos, 10 pacientes con la enfermedad (55.6%) tuvieron HDL antiinflamatorias contra 8 controles (44.4%). En el caso de la presencia de HDL proinflamatorias, los pacientes con AR las tuvieron en un 60% (15 pacientes) vs 68% (17 personas) en el grupo de controles sanos. Por lo tanto, por lo menos en nuestra población de estudio, el IIH no tiene la capacidad de predecir la presencia de HDL proinflamatorias en los pacientes con AR como lo han descrito otros grupos de investigación. Incluso, al menos en los datos mostrados, los pacientes controles tuvieron una ligera mayor frecuencia de HDL proinflamatorias, aunque no se alcanzó significancia estadística.

Después realizamos comparaciones para saber si la remisión y la actividad (moderada y alta) de la AR predecían la presencia de HDL proinflamatorias (**tabla 5**). Encontramos que los pacientes en remisión el 42.9% tenían HDL antiinflamatorias y el 57.1% tuvo HDL proinflamatorias. Dentro de lo grupo de pacientes con actividad moderada el 50% tuvo HDL antiinflamatorias y el restante 50% HDL proinflamatorias. Finalmente, los pacientes con actividad alta, el 100% tuvieron HDL proinflamatorias. Sin embargo, esto no tuvo ninguna diferencia significativa.

De la misma forma evaluamos si alguna de las variables clínicas y bioquímicas de los pacientes con AR era diferente en presencia de HDL antiinflamatorias y proinflamatorias (**tabla 6**). No encontramos diferencia estadísticamente significativa en ninguna de las variables a pesar de que nuestra población de estudio abarca un espectro amplio de actividad de la enfermedad evaluado por DAS-28 y reactantes de fase aguda sensibles como la VSG y PCR.

De los 25 pacientes con AR antes descritos, se eligieron a 12 de ellos para

realizarles espectrometría de masas y evaluar la composición proteica de sus HDL: 10 con actividad de la enfermedad presente (7 con actividad moderada y 3 con actividad alta) y 2 en remisión; además, se incluyeron a sus respectivos 12 controles pareados (total de 24 pacientes a quienes se les realizó espectrometría de masas). De las características antropométricas y bioquímicas en este grupo no existió diferencia estadística entre los casos y los controles (**tabla 7**). Nuevamente encontramos que la media de IIH entre los pacientes con AR y sus controles no fue diferente desde el punto de vista estadístico, teniendo valores de la media de IIH en los pacientes de 0.98 y en los controles de 0.99. Al evaluar la proporción de HDL antiinflamatorias y proinflamatorias, encontramos que los pacientes con AR 58.3% tuvieron HDL proinflamatorias y 41.7 HDL antiinflamatorias; en el grupo control la proporción fue exactamente la mitad para HDL proinflamatorias y antiinflamatorias (**tabla 8**).

Identificamos 33 proteínas distintas mediante espectrometría de masas en las HDL de los 24 pacientes. Cabe señalar que en los pacientes con AR fueron 29 distintas y en los controles sanos fueron 23. Aunque muchas de las proteínas se encontraban en ambos pacientes, existen proteínas que se encontraron exclusivamente en los pacientes con AR y otras identificadas únicamente en los pacientes sanos. Como era de esperar, la ApoA-I se encontró en los 24 pacientes evaluados, además, fue la proteína que más péptidos tuvo tanto en casos como en controles (**Tabla 9**). Sin embargo, el número de péptidos de las distintas proteínas no mostró diferencia estadística significativa entre los casos y los controles. Por ejemplo, se sabe que en AR la apoA-I y la PON1 se encuentran disminuidas y que amiloide sérico aumentado. También llama la atención que solamente se documentó a una proteína relacionada con activación/inhibición del complemento que fue la clusterina. Después realizamos una prueba de Chi cuadrada para ver si alguna proteína (o proteínas) mostraba alguna diferencia entre los casos y los controles (**tabla 10**). Sorprendentemente no se encontró diferencia estadísticamente significativa en cuanto a las proteínas en ambos grupos. Sin embargo, llama la atención que en los pacientes con AR, de forma exclusiva se aislaron las siguientes proteínas: Clusterin, Ribosomal_protein_50_s, Osmotically_Inducible, Chaperonin 60KDa, Glycerol_Kinasa, Glutamate_Decarboxylasa, tRNA_Met_cytidine, ATP-Depent-RNA, ApoA_IV,

6_7dimethyl_8_ribityllumazine_synthase. Además, las siguientes proteínas se encontraron específicamente en los controles sanos: Apo_L1, Keratin-Like-Protein, UBP3-associated_protein y Urease_accesory_protein

Tabla 3: índice inflamatorio de las HDL, características antropométricas y bioquímicas de los pacientes con AR y sus controles.

	GRUPO	N	Media	Desviación estandar	Valor de p
IIH	CASO	25	.9925	.04590	
	CONTROL	25	1.0100	.05179	0.22
Edad	CASO	25	47.400	11.3615	
	CONTROL	25	47.280	10.9412	0.97
Peso	CASO	25	63.4560	8.34032	
	CONTROL	25	63.7800	8.49549	0.89
Talla	CASO	25	1.57	.066	
	CONTROL	25	8.12	32.684	0.44
TA_sistólica	CASO	25	111.00	15.138	
	CONTROL	25	114.00	11.916	0.44
TA_diastólica	CASO	25	76.52	7.343	
	CONTROL	25	74.92	9.912	0.52
Cintura	CASO	25	83.78	6.624	
	CONTROL	25	85.13	8.596	0.53
Cadera	CASO	25	98.7000	7.63763	
	CONTROL	25	100.3800	8.03544	0.45
IMC	CASO	25	25.6988	2.91263	
	CONTROL	25	25.4468	3.25973	0.77
TG	CASO	25	116.880	43.1155	
	CONTROL	25	148.960	76.9364	0.75
CT	CASO	25	183.960	39.8293	
	CONTROL	25	187.800	41.5201	0.74
C-HDL	CASO	25	50.760	15.0036	
	CONTROL	25	48.800	8.1292	0.56
C-LDL	CASO	25	110.080	28.7647	
	CONTROL	25	109.440	31.3330	0.94
no-HDL	CASO	25	133.200	30.7110	
	CONTROL	25	138.680	40.6875	0.59
ApoA	CASO	25	134.160	28.4146	
	CONTROL	25	144.040	26.0504	0.20
ApoB	CASO	25	82.64	18.021	
	CONTROL	25	90.60	28.268	0.24
Glu	CASO	25	93.160	8.2446	

	CONTROL	25	90.720	6.2485	0.24
Creat	CASO	25	.68	.199	
	CONTROL	25	.64	.157	0.39
Duración años AR	CASO	25	6.62	5.902	
	CONTROL	0ª	.	.	
DAS-28	CASO	25	2.8608	1.73065	
	CONTROL	0ª	.	.	
VSG	CASO	24	29.542	29.4234	
	CONTROL	0ª	.	.	
PCR	CASO	25	2.0928	2.75690	
	CONTROL	0ª	.	.	
Títulos-FR	CASO	22	184.814	210.7794	
	CONTROL	0ª	.	.	
Títulos-APCC	CASO	24	635.083	652.4652	
	CONTROL	0ª	.	.	

Tabla 4: Proporción de HDL antiinflamatorias y proinflamatorias entre los pacientes con AR y sus controles.

			GRUPO		Total
			CASO	CONTROL	
IIH	Antiinflamatorio	Recuento	10	8	18
		% dentro de IIH	55.6%	44.4%	100.0%
		% dentro de GRUPO	40.0%	32.0%	36.0%
	Proinflamatorio	Recuento	15	17	32
		% dentro de IIH	46.9%	53.1%	100.0%
		% dentro de GRUPO	60.0%	68.0%	64.0%
Total	Recuento	25	25	50	
	% dentro de IIH	50.0%	50.0%	100.0%	
	% dentro de GRUPO	100.0%	100.0%	100.0%	

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.347 ^a	1	.556	
Estadístico exacto de Fisher				.769

Tabla 5: Comparación del grado de actividad de la AR vs el índice inflamatorio de las HDL.

			IIH		Total
			Antiinflamatorio	Proinflamatorio	
ACTIVIDAD	Remisión	Recuento	6	8	14
		% dentro de ACTIVIDAD	42.9%	57.1%	100.0%
		% dentro de IIH	60.0%	53.3%	56.0%
	Moderada	Recuento	4	4	8
		% dentro de ACTIVIDAD	50.0%	50.0%	100.0%
		% dentro de IIH	40.0%	26.7%	32.0%
	Alta	Recuento	0	3	3
		% dentro de ACTIVIDAD	0.0%	100.0%	100.0%
		% dentro de IIH	0.0%	20.0%	12.0%
Total		Recuento	10	15	25
		% dentro de ACTIVIDAD	40.0%	60.0%	100.0%
		% dentro de IIH	100.0%	100.0%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2.381 ^a	2	.304

Figura 2: Proporción de HDL proinflamatorias en pacientes con AR.

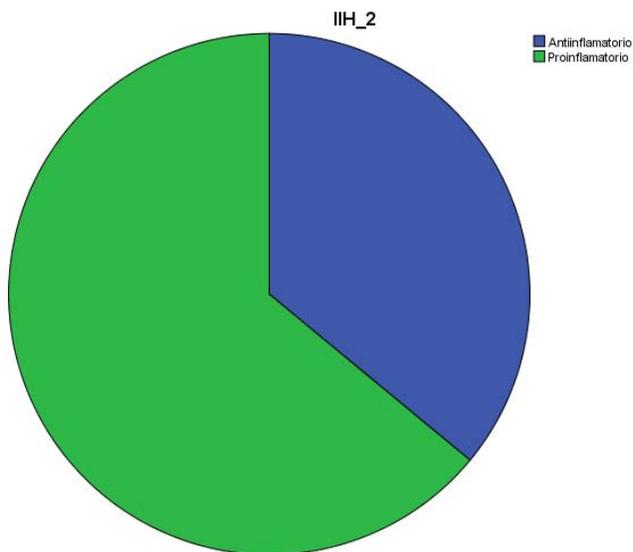


Tabla 6: Datos clínicos y bioquímicos de los pacientes con AR con HDL proinflamatorias comparado con HDL antiinflamatorias.

	IIH	N	Media	Desviación estándar	Valor de p.
Edad	Antiinflamatorio	10	45.700	11.2650	.53
	Proinflamatorio	15	48.533	11.6733	
DAS-28	Antiinflamatorio	10	2.5280	1.34037	.44
	Proinflamatorio	15	3.0827	1.96156	
VSG	Antiinflamatorio	10	25.800	25.1387	.61
	Proinflamatorio	14	32.214	32.7982	
PCR	Antiinflamatorio	10	1.0420	1.07138	.12
	Proinflamatorio	15	2.7933	3.31316	
Títulos FR	Antiinflamatorio	9	221.100	300.0349	.51
	Proinflamatorio	13	159.692	126.7428	
Títulos APCC	Antiinflamatorio	10	618.700	517.7889	.92
	Proinflamatorio	14	646.786	753.1370	
TG	Antiinflamatorio	10	122.400	52.2753	.61
	Proinflamatorio	15	113.200	37.3329	
CT	Antiinflamatorio	10	175.100	31.3987	.37
	Proinflamatorio	15	189.867	44.6348	
C-HDL	Antiinflamatorio	10	48.400	10.9463	.53
	Proinflamatorio	15	52.333	17.3850	
C-LDL	Antiinflamatorio	10	103.000	23.7159	.32
	Proinflamatorio	15	114.800	31.5780	
noHDL	Antiinflamatorio	10	126.700	25.0823	.39
	Proinflamatorio	15	137.533	34.0899	
ApoA	Antiinflamatorio	10	123.700	20.9393	.13
	Proinflamatorio	15	141.133	31.1766	
ApoB	Antiinflamatorio	10	82.89	19.017	.95
	Proinflamatorio	15	82.47	18.004	

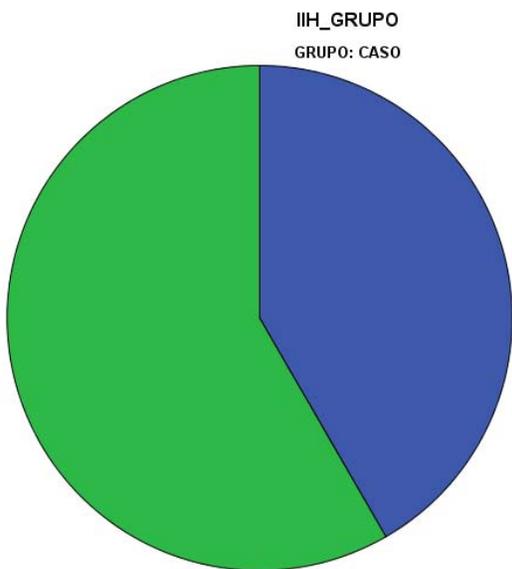
Tabla 7: Características antropométricas, bioquímicas e IIH en el subgrupo de pacientes con espectrometría de masas.

	GRUPO	N	Media	Desviación estándar	Valor de p
IIH	CASO	12	.9892	.05071	
	CONTROL	12	.9900	.04671	.96
Edad	CASO	12	46.333	11.9189	
	CONTROL	12	45.917	11.8664	.93
PESO	CASO	12	62.4083	7.96418	
	CONTROL	12	66.1833	7.69047	.25
TALLA	CASO	12	1.57	.074	
	CONTROL	12	1.60	.073	.21
TA_SISTOLICA	CASO	12	107.50	8.660	
	CONTROL	12	114.42	12.810	.13
TA_DIASTOLICA	CASO	12	74.83	7.697	
	CONTROL	12	75.00	10.331	.96
CINTURA	CASO	12	83.21	5.549	
	CONTROL	12	84.39	6.988	.65
CADERA	CASO	12	102.4583	5.65468	
	CONTROL	12	101.5417	6.43661	.71
IMC	CASO	12	25.4275	2.29690	
	CONTROL	12	25.7758	3.17171	.76
TG	CASO	12	118.583	35.9582	
	CONTROL	12	152.500	44.7711	.053
CT	CASO	12	173.167	38.3520	
	CONTROL	12	190.167	23.5752	.20
C-HDL	CASO	12	44.917	13.2147	
	CONTROL	12	49.167	9.2818	.37
C-LDL	CASO	12	104.333	24.3099	
	CONTROL	12	108.417	19.0285	.65
NO-HDL	CASO	12	128.250	27.9224	
	CONTROL	12	140.333	22.1906	.25
ApoA	CASO	12	125.500	31.2133	
	CONTROL	12	147.667	23.2392	.06
ApoB	CASO	12	86.58	14.523	
	CONTROL	12	92.33	20.004	.43

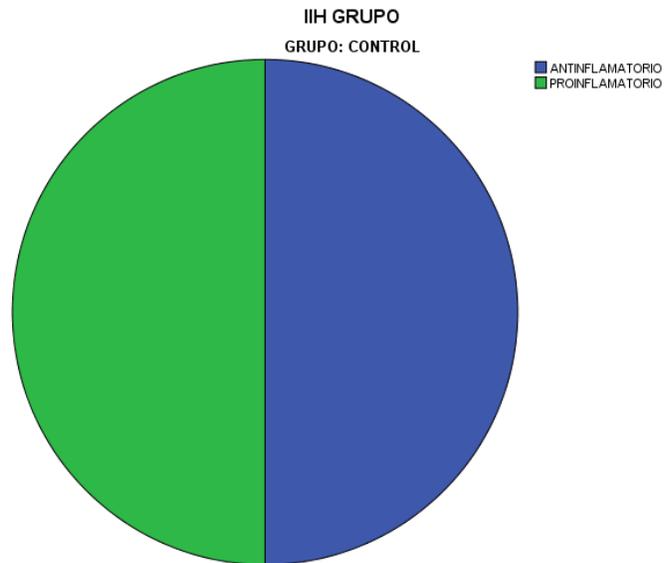
Glucosa	CASO	12	93.833	7.9639	
	CONTROL	12	91.167	6.0277	.36
Creatinina	CASO	12	.58	.174	
	CONTROL	12	.64	.155	.37

Tabla 8: Proporción de HDL proinflamatorias y antiinflamatorias en el subgrupo de pacientes de espectrometría de masas.

GRUPO		Frecuencia	Porcentaje	
CASO	ANTINFLAMATORIO	5	41.7	
	PROINFLAMATORIO	7	58.3	
	Total	12	100.0	X²= 0.168
CONTROL	ANTINFLAMATORIO	6	50.0	p=0.68
	PROINFLAMATORIO	6	50.0	
	Total	12	100.0	



■ ANTINFLAMATORIO
■ PROINFLAMATORIO



■ ANTINFLAMATORIO
■ PROINFLAMATORIO

Tabla 9: Numero de péptidos de las proteínas identificadas en los pacientes con AR y sus controles mediante espectrometría de masas.

	GRUPO	N	Media	Desviación estándar	Valor de p.
keratin_Typell	CONTROL	12	57.2500	150.55118	.41
	CASO	12	20.3333	27.89700	
Keratin_Typel	CONTROL	12	38.9167	121.39452	.44
	CASO	12	11.6667	16.82170	
Apo_AI	CONTROL	12	101.0000	23.17130	.53
	CASO	12	94.0000	30.90160	
Serum_Albumin	CONTROL	12	58.8333	38.83493	.07
	CASO	12	29.6667	36.64407	
Trypsin	CONTROL	12	20.3333	2.26969	.15
	CASO	12	21.7500	2.49089	
Apo_All	CONTROL	12	16.6667	9.59482	.67
	CASO	12	14.9167	10.25545	
Apo_CIII	CONTROL	12	7.5833	4.10007	.36
	CASO	12	9.2500	4.61470	
Apo_CI	CONTROL	12	7.7500	5.46268	.21
	CASO	12	5.0000	5.18740	
Keratin_Like_Protein	CONTROL	12	.5833	2.02073	.32
	CASO	12	.0000*	.00000	
Dermcidin	CONTROL	12	.2500	.86603	1
	CASO	12	.2500	.86603	
50_s Ribosomal_protein	CONTROL	12	.0000*	.00000	.32
	CASO	12	.2500	.86603	
Osmotically_Inducible	CONTROL	12	.0000*	.00000	.32
	CASO	12	.3333	1.15470	
Chaperonin_60_KDa	CONTROL	12	.0000*	.00000	.32
	CASO	12	.4167	1.44338	
Glycerol_Kinasa	CONTROL	12	.0000*	.00000	.32
	CASO	12	.1667	.57735	
Glutamate_Decarboxylasa	CONTROL	12	.0000*	.00000	.32
	CASO	12	.1667	.57735	
tRNA_Met_cytidine	CONTROL	12	.0000*	.00000	.32
	CASO	12	.1667	.57735	

ATP_Depent_RNA	CONTROL	12	.0000*	.00000	.32
	CASO	12	.1667	.57735	
Apo_CII	CONTROL	12	1.6667	2.34844	.70
	CASO	12	1.2500	2.92715	
Apo_E	CONTROL	12	6.0833	8.05050	.84
	CASO	12	7.0000	13.34166	
Serum_PON	CONTROL	12	1.0833	3.75278	.80
	CASO	12	.7500	2.59808	
Serum_amiloide	CONTROL	12	9.0833	9.33671	.54
	CASO	12	6.5833	10.59553	
Apo_L1	CONTROL	12	.5000	1.73205	.33
	CASO	12	.0000*	.00000	
Apo_D	CONTROL	12	2.4167	3.39675	.91
	CASO	12	2.2500	4.39266	
Alpha_1_Antitripsina	CONTROL	12	7.8333	6.65833	.68
	CASO	12	6.5833	8.08431	
Apo_M	CONTROL	12	1.7500	3.27872	.64
	CASO	12	1.0833	3.75278	
Transthyretin	CONTROL	12	.9167	2.39159	.71
	CASO	12	.5833	2.02073	
Apo_F	CONTROL	12	.2500	.86603	.60
	CASO	12	.5833	2.02073	
Clusterin	CONTROL	12	.0000*	.00000	.32
	CASO	12	.6667	2.30940	
Apo_IV	CONTROL	12	.0000*	.00000	.33
	CASO	12	1.9167	6.63953	
Platelet_basic_protein	CONTROL	12	.1667	.57735	.53
	CASO	12	.5000	1.73205	
6_7dimethyl_8_ribityllumazine_synthase_OS	CONTROL	12	.0000*	.00000	.32
	CASO	12	.0833	.28868	
UBP3_associated_protein.	CONTROL	12	.8333	2.88675	.32
	CASO	12	.0000*	.00000	
Urease_accesory_protein.	CONTROL	12	.1667	.57735	.32
	CASO	12	.0000*	.00000	

*Los números en negritas y subrayados corresponden a las proteínas que no se encontraron en casos o controles.

Tabla 10: Número de pacientes en quienes se encontraron las distintas proteínas. Casos y controles

PROTEÍNA		GRUPO		Valor de p
		Caso	Control	
keratin_Typell	Si	9	9	
	No	3	3	1.0
Keratin_Typel	Si	6	5	
	No	6	7	0.68
Apo_AI	Si	12	12	
	No	0	0	-
Serum_Albumin	Si	11	12	
	No	1	0	.30
Trypsin	Si	12	12	
	No	0	0	-
Apo_All	Si	11	11	
	No	1	1	1.0
Apo_CIII	Si	12	12	
	No	0	0	-
Apo_CI	Si	7	10	
	No	5	2	.17
Keratin_Like_Protein	Si	0	1	
	No	12	11	0.30
Dermcidin	Si	1	1	
	No	11	11	1.0
Ribosomal_protein_50_s	Si	1	0	
	No	11	12	0.30
Osmotically_Inducible	Si	1	0	
	No	11	12	1.0
Chaperonin_60_KDa	Si	1	0	
	No	11	12	0.30
Glycerol_Kinasa	Si	1	0	
	No	11	12	0.30
Glutamate_Decarboxylasa	Si	1	0	
	No	11	12	0.30
tRNA_Met_cytidine	Si	1	0	

	No	11	12	0.30
ATP_Depent_RNA	Si	1	0	
	No	11	12	0.30
Apo_CII	Si	3	5	
	No	9	7	0.30
Apo_E	Si	4	7	
	No	8	5	.21
Serum_PON	Si	1	1	
	No	11	11	1
Serum_amiloide	Si	8	9	
	No	4	3	.65
Apo_L1	Si	0	1	
	No	12	11	0.30
Apo_D	Si	4	4	
	No	8	8	0.67
Alpha_1_Antitripsina	Si	6	8	
	No	6	4	0.40
Apo_M	Si	1	9	
	No	11	3	0.27
Transthyretin	Si	1	2	
	No	11	10	0.5
Apo_F	Si	1	1	
	No	11	11	1
Clusterin	Si	1	0	
	No	11	12	0.30
ApoA_IV	Si	1	0	
	No	11	12	0.30
Platelet_basic_protein	Si	12	11	
	No	0	1	0.30
6_7dimethyl_8_ribityllumazine_synthase	Si	1	0	
	No	11	12	0.30
UBP3_associated_protein	Si	0	1	
	No	12	11	0.30
Urease_accesory_protein	Si	0	1	
	No	12	11	0.30

8.- DISCUSIÓN:

Durante muchos años se han realizado diversas investigaciones dirigidas a evaluar la asociación entre la concentración de C-HDL y el riesgo de desarrollar aterosclerosis. Granes estudios epidemiológicos, de hecho, han confirmado dicha asociación; sin embargo, cada vez surge mayor evidencia de que el C-HDL no es el mejor parámetro para establecer dicha asociación de forma completa, sobre todo en algunas entidades biológicas donde su capacidad predictiva es limitada. En los últimos años, el paradigma de las HDL ha cambiado, por lo que existe una mayor tendencia a evaluar la calidad de las HDL (funcionalidad) sobre la cantidad de las HDLs (concentración), ya que este enfoque podría predecir con mayor precisión el riesgo de desarrollar aterosclerosis. Recientemente se han desarrollado diferentes metodologías en un intento de estimar la funcionalidad de estas lipoproteínas y detectar la presencia de HDL's disfuncionales/proinflamatorias.

Se reconoce que existe un mayor riesgo de aterosclerosis en varias enfermedades con inflamación crónica. La inflamación cambia dramáticamente la composición de las HDL con la incorporación de proteínas cargo, como la proteína de fase aguda amiloide sérico A1. Las HDL en fase aguda tienen una menor capacidad de promover el eflujo de colesterol desde los macrófagos y proteger contra la oxidación. La hipótesis de que las HDL son disfuncionales en ciertas enfermedades, tiene sustento en el hecho de que hay pacientes con enfermedad coronaria, que a pesar de tener niveles elevados de HDL, éstas tienen menor actividad antioxidante. Lo mismo se ha demostrado en LEG, enfermedad renal terminal y síndrome metabólico. Aunque estos datos son interesantes, se necesita una herramienta o ensayo que evalúe las distintas propiedades funcionales de las HDL. Actualmente no existe una herramienta que cumpla con esta característica. El ensayo libre de células (CFA), que evalúa la capacidad antiinflamatoria de las HDL, no logró demostrar en nuestros pacientes con AR la presencia de HDL proinflamatorias, aun cuando se sabe que estos pacientes tienen niveles elevados de las mismas. Este ensayo ha tenido recientemente varias críticas, la más importante es que durante varios años no ha podido ser validado por otros centros de investigación, solamente por el grupo de

UCLA que la describió. Decidimos hacer esta metodología por varias razones: a).- la relativa facilidad de su implementación (requiere poco armamentarium) y bajo costo; b).- la posibilidad de poder incluir varias muestras en un solo análisis y; c).- que en los estudios previos se ha demostrado una correlación alta con el ensayo de la actividad quimiotáctica del monocito, el cual es el ensayo más ampliamente utilizado para evaluar la capacidad antiinflamatoria de las HDL, pero también técnicamente complejo y logísticamente difícil para estudios a gran escala. Consideramos que las condiciones de la metodología del CFA no son robustas y son fácilmente susceptibles a alteraciones, en parte debido a 1).- la inestabilidad oxidativa de DCFH-DA, lo que resulta en una tendencia para que variaciones menores en las condiciones experimentales causen inconsistencia y; 2).- la sensibilidad del ensayo para cualquier grado de hemólisis. En conclusión, este abordaje no permitió evaluar bioquímicamente las propiedades funcionales de las HDL. Ello condujo a que ninguno de nuestros análisis mostrara una diferencia significativa, a pesar de que contamos con una muestra de pacientes con un espectro de actividad de la AR amplio.

Por otro lado, sabemos que las HDL están enriquecidas con proteínas involucradas en la respuesta de fase aguda, metabolismo de lípidos, proteínas del complemento, etc, y que esto se explica en gran parte por las características bioquímicas de su lipoproteína más importante, la ApoA-1; pero también tiene un gran peso el hecho de que éstas partículas circulen libremente por el plasma. Estas características hacen que las HDL tengan la capacidad de que se les unan varias sustancias, incluyendo proteínas. Estudios proteómicos han demostrado que la inflamación altera las proteínas cargo de las HDL. La función protectora de las HDL se altera justamente en estos estados de inflamación crónica. Los cambios moleculares y mecanismos que promueven la conversión de HDL antiinflamatoria a proinflamatoria se desconocen actualmente. El entendimiento de los perfiles moleculares que distinguen las HDL proinflamatorias de las antiinflamatorias puede facilitar a mejorar nuestro entendimiento de las alteraciones en las proteínas cargo de las HDL que afectan de forma adversa sus funciones normales antioxidantes y antiinflamatorias. En nuestros pacientes encontramos que el número de péptidos de la ApoA-I se encontraron disminuidos en los pacientes con respecto a sus controles sanos,

aunque esta diferencia no logró significancia estadística. Sin embargo, a diferencia de lo reportado, la cantidad de amiloide sérico también se encontró disminuido en los pacientes con respecto a los controles. Se ha sugerido que el amiloide sérico específicamente en la artritis reumatoide y otras entidades inflamatorias reemplaza a la apoA-I y por ello suele encontrarse disminuido en estas enfermedades, aunque en nuestros pacientes se documentó el caso contrario. Al igual que lo reportado, también los péptidos de paraoxonasa se encontraron menores en los pacientes que en los casos, aunque sin diferencia estadística. Llama la atención el hecho de que solamente se documentó una proteína asociada al sistema del complemento, la clusterina, la cual exclusivamente se encontró en el grupo de pacientes con AR. Sin embargo, las otras proteínas del complemento como complemento C3, complemento factor B, complemento C9 y el inhibidor de de las proteínas que se han reportado en valores elevados en los pacientes con AR no fueron evidenciadas en nuestros pacientes. De hecho C3, el cual se produce por los macrófagos derivados de monocitos, contribuyen a la inmunidad innata y se ha sugerido que también puede contribuir a la enfermedad vascular.

Como se puede ver previamente, evaluamos las HDL con distintas propiedades inflamatorias (antiinflamatorias y proinflamatorias) del suero de pacientes con AR y sin AR, y las sometimos a análisis de espectrometría de masas para distinguir las diferencias en la composición proteica de sus proteínas cargo, con el objetivo final de identificar una proteína o grupo de proteínas que pudieran servir como marcadores que a su vez lograrán distinguir HDL proinflamatorias de las antiinflamatorias. Lamentablemente, con los resultados ya comentados no podemos proponer este último objetivo, primero porque el ensayo libre de células para evaluar el estado antioxidante de las HDL no mostró resultados confiables; y segundo porque ninguna de las proteínas identificadas entre los pacientes y sus controles mostró una diferencia estadísticamente significativa.

Las fortalezas de nuestro estudio es que incluimos pacientes con AR con un espectro amplio clínico de actividad y duración de la enfermedad; además, pudimos parearlos por las principales variables para eliminar la mayoría de los confusores que pudieran sesgar nuestros resultados. También, para el aislamiento de las HDL, utilizamos ultracentrifugación secuencial, el cual es el estándar actualmente. Además, durante la

realización del ensayo libre de células disecamos cada uno de los pasos para ver si algún factor estuviera influyendo en los resultados negativos; por ejemplo, realizamos pruebas con HDL de plasma y suero, obtenido de muestras frescas y muestras que hubieran estado guardadas durante algunos meses a -80°C , obtenidas tanto por ultracentrifugación secuencial como por precipitación con dextrán sulfato, utilizamos todas las soluciones con una preparación reciente. Sin embargo, siempre obtuvimos prácticamente los mismos resultados.

Las debilidades que consideramos al estudio fueron el haber utilizado el ensayo libre de células, el cual hasta este momento no ha podido ser validado por otros grupos de investigación distintos; sin embargo, en el momento del inicio del estudio aún no lo sabíamos. También aceptamos que el tamaño de la muestra fue pequeño y no logramos tener el suficiente poder para poder sacar conclusiones robustas.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio en población mexicana que evalúa la proteoma de las HDL en personas sanas y en pacientes con artritis reumatoide.

9.- CONCLUSIONES:

En este estudio, encontramos que la composición proteica de las lipoproteínas de alta densidad es distinta en los pacientes con artritis reumatoide comparada a la de sus controles sanos. Sin embargo, ninguna de ellas mostró una diferencia estadísticamente significativa. Tampoco logramos demostrar que esta diferencia pudiera traducirse en un cambio en la funcionalidad de las HDL entre ambos grupos, en gran parte debido a que el ensayo libre de células utilizado en este estudio tuvo muy poca sensibilidad y no fue reproducible. Este es el primer estudio en México donde se evalúa la composición proteica de las HDL en pacientes con artritis reumatoide y pacientes sanos mediante la espectrometría de masas.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Aguilar Salinas C, Gómez Díaz R, Gómez Pérez FJ. Dislipidemias de lo clínico a lo molecular. México: Intersistemas S.A de C.V; 2008.
2. Kontush AM, Chapman J. High-density lipoproteins Structure, Metabolism, Function and Therapeutics. Canada: John Wiley & Sons, Inc.2012
3. Tsompanidi E, Brinkmeier M, Fotiadou E, Giakoumi S. HDL biogenesis and functions: Role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2010; 208:3-9.
4. Navab M. Mechanisms of Disease: proatherogenic HDL—an evolving field. *Nature clinical practice endocrinology & metabolism*. 2006, 2: 504-511.
5. Shore B, Shore V. Heterogeneity in protein subunits of human serum high-density lipoproteins. *Biochemistry*. 1968; 7: 2773–2777.
6. Benditt EP, Eriksen N, Hanson RH. Amyloid protein SAA is an apoprotein of mouse plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*1979; 76: 4092–4096.
7. Davidsson P, Hulthe J, Fagerberg B, Camejo G. Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 156–163.
8. Hoofnagle AN, Heinecke JW. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *J Lipid Res* 2009; 50: 1967–1975.
9. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, Byun J, Vuleti, S, Kassim S, Singh P et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* 2007; 117: 746–756.
10. Skipski VP, Barclay M, Barclay RK, Fetzter VA, Good JJ, Archibald FM. Lipid composition of human serum lipoproteins. *Biochem J* 1967; 104: 340–352.
11. Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Negre-Salvayre A, de Souza JA, Chantepie S, Chapman MJ. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance

- to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1843–1849.
12. Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G. Lipid profiling of FPLC separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry *J Lipid Res* 2009; 50: 574–585.
 13. Yetukuri L, Soderlund S, Koivuniemi A, M, Taskinen M-R, Vattulainen I, Jauhiainen M, Oresic M. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol. *J Lipid Res* 2010; 51: 2341–2351.
 14. Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, Milne SB, Myers DS, Merrill AH, Bandyopadhyay S, Jones KN, Kelly S, Shaner RL et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res* 2010; 51: 3299–3305.
 15. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 423–433.
 16. Alaupovic P. The concept of apolipoprotein-defined lipoprotein families and its clinical significance. *Curr Atheroscler Rep* 2003; 5: 459–467.
 17. Duriez P, Fruchart JC. High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein A-I. *Clin Chim Acta* 1999; 286: 97–114.
 18. Moren X, Deakin S, Liu ML, Taskinen MR, James RW. HDL subfraction distribution of paraoxonase-1 and its relevance to enzyme activity and resistance to oxidative stress. *J Lipid Res* 2008; 49: 1246–1253.
 19. Gauthamadasa K, Rosales C, Pownall HJ, Macha S, Jerome WG, Huang R, Silva RA. Speciated human high-density lipoprotein protein proximity profiles. *Biochemistry* 2010; 49: 10656–10665.
 20. Hoofnagle AN, Heinecke JW. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *J Lipid Res* 2009; 50: 1967–1975.
 21. Dahlback B, Nielsen LB. Apolipoprotein M affecting lipid metabolism or just catching a ride with lipoproteins in the circulation? *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 559–564.

22. Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, 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.
23. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21: 312–318.
24. 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: 32578–32585.
25. Cheung MC, Vaisar T, Han X, Heinecke JW, Albers JJ. Phospholipid transfer protein in human plasma associates with proteins linked to immunity and inflammation. *Biochemistry* 2010; 49: 7314–7322.
26. Gordon A Francis. The complexity of HDL. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010, 1801: 1286–1293.
27. Saemann M, et al. The versatility of HDL: a crucial anti-inflammatory regulator. *European Journal of Clinical Investigation*. 2010, 1-13.
28. Nofer, J.R. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 2002, 1-16.
29. Lewis GF and Rader DJ. HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res* 2005; 96: 1221-32.
30. Krimbou L, Marcil M and Genest J. New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17: 258-67.
31. Eggerman TL, Hoeg JM, Meng MS et al. Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II. *J Lipid Res* 1991; 32: 821-8.
32. Barter PJ, Nicholls S, Rye K-A et al. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circ. Res* 2004; 95: 764-72.
33. Rader Daniel J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J. Clin. Invest.* 2006; 116:3090–3100
34. Furlong CE. Human PON1, a biomarker of risk of disease and exposure. *Interact Chem Biol* 2010; 187

35. Fuhrman, B. et al. Paraoxonase 1 (PON1) deficiency in mice is associated with reduced expression of macrophage SR-BI and consequently the loss of HDL cytoprotection against apoptosis. *Atherosclerosis* 2010; 211: 61-68.
36. Gustavsson C. Vascular Cellular Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) Expression in Mice Retinal Vessels Is Affected by Both Hyperglycemia and Hyperlipidemia. *PLoS ONE* 2010; 5: e12699.
37. Saemann M, Poglitsch M, Kopecky C, et al. The versatility of HDL: a crucial anti-inflammatory regulator. *Eur J Clin Invest* 2010; 10: 1-13.
38. Drew, B.G. et al. High-Density Lipoprotein Modulates Glucose Metabolism in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation* 2009; 119: 2103-2111.
39. Kellner-Weibel G , De la Llera-M. Update on HDL Receptors and Cellular Cholesterol Transport. *Curr Atheroscler Rep* 2011; 13:233–241.
40. Grossman J, Ansell BJ. 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(4):213
41. Gordon S, Hofmann S, Askew D. High density lipoprotein: It's not just about lipid transport anymore. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2011; 22: 9-13.
42. Ansell B. High-density Lipoprotein: Is It Always Atheroprotective? *Curr Ather Reports* 2006; 8: 405–411.
43. McMahon M¹, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2541-9.
44. Navab M, Anantharamaiah FM, Reddy S, et al. HDL as a Biomarker, Potential Therapeutic Target, and Therapy. *Diabetes* 2009; 58: 2711-2715.
45. Zhang, Y.Z., Da Silva, J.R., Reilly. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J. Clin. Invest* 2005; 115:2870–2874.

46. Havel, R.J., Eder, H.A., Bragdon, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest* 1955; 34:1345–1353.
47. Asztalos, B.F., Sloop, C.H., Wong, L., Roheim, P.S. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I containing subpopulations. *Biochim. Biophys Acta* 1993; 1169: 291–300.
48. Jeyarajah, E.J., Cromwell, W.C., Otvos, J.D. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin. Lab. Med* 2006; 26: 847–870.
49. Pauls, B., Albers, J.J. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986;. 129: 78–100.
50. Dobiasova, M., Adler, L., Ohta, T., Frohlich, J., Effect of labeling of plasma lipoproteins with [(3)H] cholesterol on values of esterification rate of cholesterol in apolipoprotein B-depleted plasma. *J. Lipid. Res* 2000; 41: 1356–1357.
51. 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: 1873–1880.
52. Farid, A.S., Nakahara, K., Murakami, N., Hayashi, T., Horii, Y. Decreased serum paraoxonase-1 activity during intestinal nematode (*nippostrongylus brasiliensis*) infection in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2008; 78: 770–776.
53. Shao, B., Oda, M.N., Oram, J.F., Heinecke, J.W. Myeloperoxidase an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr. Opin. Cardiol* 2006; 21: 322–328.
54. Feng, H., Li, X.A. Dysfunctional high density lipoprotein. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes* 2009; 16:156–162.
55. Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Naak, D.P., Hama, S., Navab, M., Fogelman, A.M. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection. *Circulation* 2001; 103: 2283–2288.

56. Ansell, B. J., M. Navab, S. Hama, N. Kamranpour, G. Fonarow, G. Hough, S. Rahmani, R. Mottahedeh, R. Dave, S. T. Reddy. Inflammatory/anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation*. 2003 108 : 2751 – 2756
57. 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.
58. Kelesidis T¹, Currier JS, Huynh D, Meriwether D, Charles-Schoeman C, Reddy ST, Fogelman AM, Navab M, Yang O. A biochemical fluorometric method for assessing the oxidative properties of HDL. *J Lipid Res.* 2011; 52(12):2341-51.
59. Breton CV, Yin F, Wang X, Avol E, Gilliland FD, Araujo JA. HDL anti-oxidant function associates with LDL level in young adults. *Atherosclerosis*. 2014 Jan;232(1):165-70.
60. Yetukuri L, Söderlund S, Koivuniemi A. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol *J. Lipid Res.* 2010. 51: 2341–2351.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Del Rincon I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, O’Leary DH, Escalante A. Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in

- rheumatoid arthritis patients and healthy subjects. *Arthritis Rheum* 2003;48:1833–40.
65. Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, et al. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population based cohort study. *Arthritis Rheum* 2005;52:402–11.
66. Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2005;52:722–32.
67. Bjornadal L, Baecklund E, Yin L, Granath F, Klareskog L, Ekbom A. Decreasing mortality in patients with rheumatoid arthritis: results from a large population based cohort in Sweden, 1964-95. *J Rheumatol* 2002;29:906–12.
68. Gonzalez A, Maradit Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Davis JM III, Thorneau TM. The widening mortality gap between rheumatoid arthritis patients and the general population. *Arthritis Rheum* 2007; 56:3583–7.
69. Stamatelopoulos KS, Kitas GD, Sfrikakis PP. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis versus diabetes: a comparative study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1702–1708.
70. Robertson J, Peters MJ, McInnes IB, Sattar N. Changes in lipid levels with inflammation and therapy in RA: a maturing paradigm. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:513–523.
71. McMahon M, Grossman J, FitzGerald J, Dahlin-Lee E, Wallace DJ, Thong BY. Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:2541–9.
72. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000;41:1495–508.

73. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000;41:1481–94.
74. Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Luscis AJ, Castellani LW. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:481–8.
75. Charles-Schoeman C, Watanabe J, Lee YY, Furst DE, Amjadi S, Elashoff D, et al. Abnormal function of high-density lipoprotein is associated with poor disease control and an altered protein cargo in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2870–9.

