

## Estructura de las lipoproteínas y apoproteínas

E. HERRERA y M.A. LASUNCIÓN

Los lípidos son insolubles en agua, por lo que para ser transportados en sangre han de ir asociados a proteínas en forma de agregados moleculares que se denominan lipoproteínas. De esta manera, triglicéridos, colesterol (tanto libre como esterificado) y fosfolípidos se unen a una o varias proteínas específicas, denominadas apolipoproteínas o, más comúnmente, apoproteínas, formando unas partículas pseudomicelares solubles en agua que son las lipoproteínas. Asociados de esta manera los diferentes lípidos circulan por la sangre o por la linfa y son transportados de unos tejidos a otros. Si bien aquéllos son los lípidos cuantitativamente más importantes, las lipoproteínas también acarrean otras moléculas biológicamente interesantes, como los ésteres de retinol, el tocoferol y los carotenos, por ejemplo.

El conocimiento de las lipoproteínas es relativamente reciente, siendo descubiertas en 1920 por Macheboeuf en el suero de caballo, de donde las separó mediante la precipitación de las proteínas plasmáticas con sulfato amónico. En la década de los años cuarenta se empezaron a aplicar las técnicas de ultracentrifugación para su separación por flotación, aprovechando la menor densidad de estas partículas con respecto a las proteínas del plasma. Aunque esta técnica continúa siendo de referencia para la separación de los diferentes tipos de lipoproteínas, su análisis en muestras de pacientes se realiza en primera instancia mediante su separación por electroforesis de zona (en gel de agarosa, papel, etc.), en gel de poliacrilamida, o mediante la precipitación selectiva con polianiones. En la actualidad se aplican multitud de técnicas y variantes para el estudio de estas partículas, desde isoelectroenfoque a la cromatografía de afinidad o de exclusión, convencional o de alta eficacia, pasando por los inmunoquímicos, permitiendo todos ellos mejorar la separación y la caracterización de las lipoproteínas.

### ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Prácticamente todas las lipoproteínas presentan una forma subesférica, y precisamente ello les permite soportar la repulsión que el medio acuoso ejerce sobre sus constituyentes hidrofóbicos (fig. 2.1). Los diferentes lípidos interactúan entre sí de una manera no covalente, situándose los neutros (triglicéridos y ésteres de colesterol) en el interior, constituyendo lo que se denomina *núcleo de la lipoproteína*. El núcleo está recubierto por una capa superficial que contiene los lípidos anfipáticos (fosfolípidos), colesterol libre y las apoproteínas (fig. 2.1). Estas presentan a lo largo de su secuencia diversas regiones con estructura en hélice  $\alpha$  anfipática, en donde los aminoácidos polares se orientan hacia el exterior de la lipoproteína y los apolares hacia el interior, para interactuar con los grupos acilo. De esta manera las apoproteínas contribuyen a estabilizar estas partículas, interponiéndose entre los lípidos apolares y el plasma (fig. 2.2).

Las lipoproteínas, aunque aparentemente son estructuras estables, en realidad se encuentran en continua reorganización. Pueden perder lípidos por procesos hidrolíticos y por captación por los tejidos, pero además intercambian continuamente componentes con otras lipoproteínas circulantes. Todo ello da lugar a que estas partículas tengan una estructura cambiante o dinámica, en la que lípidos y apoproteínas están en continua reorganización. Dentro de esta panorámica hay que considerar también la existencia de lipoproteínas con otra estructura diferente a la esférica, como las HDL discoidales y la LpX. En ambos tipos de lipoproteínas, la riqueza de fosfolípidos y apoproteínas y el escaso contenido en ésteres de colesterol determina que esos componentes se estructuren en bicapa discoidal y no en

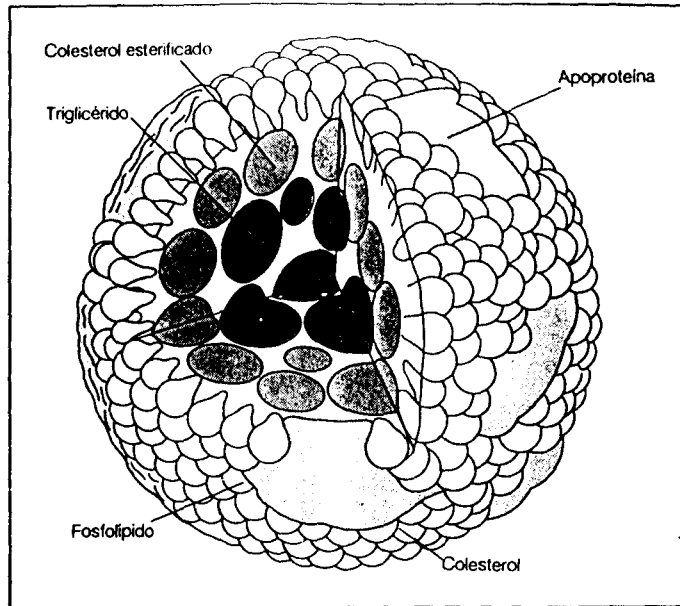


Figura 2.1. Esquema de distribución de los componentes en una lipoproteína plasmática.

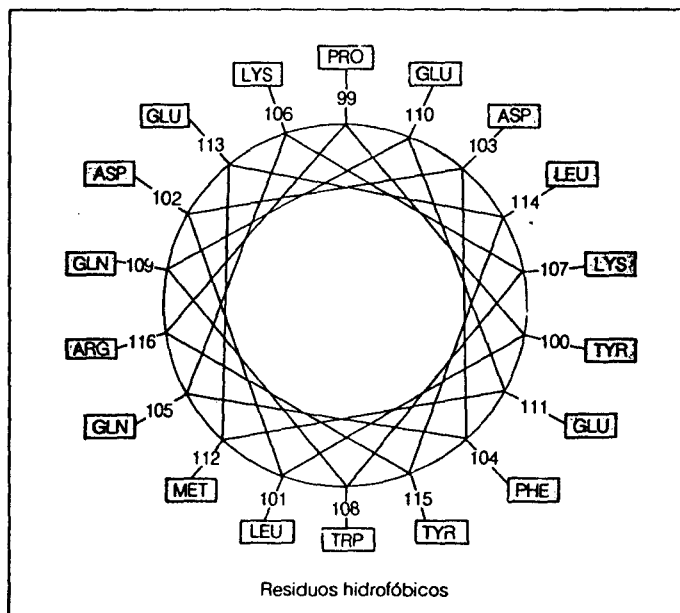


Figura 2.2. Esquema de hélice  $\alpha$  antipática de las apoproteínas. Representación de Edmunson del segmento de la apo A-I comprendido entre los residuos 99 y 116 que configuran una hélice  $\alpha$  antipática en donde los residuos hidrofílicos se exponen hacia una cara, mientras que los hidrofóbicos se exponen hacia la otra. Una configuración similar se aprecia en las otras apoproteínas.

esfera. Estas lipoproteínas, como se verá en otros capítulos, representan estadios intermedios en su devenir metabólico (como es el caso de las HDL discoidales nacientes) o son consecuencia de una alteración en el metabolismo (en el caso de la LpX).

### CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS

La nomenclatura de las distintas lipoproteínas se ha ido estableciendo a medida que se han ido descubriendo y en función de sus características fisicoquí-

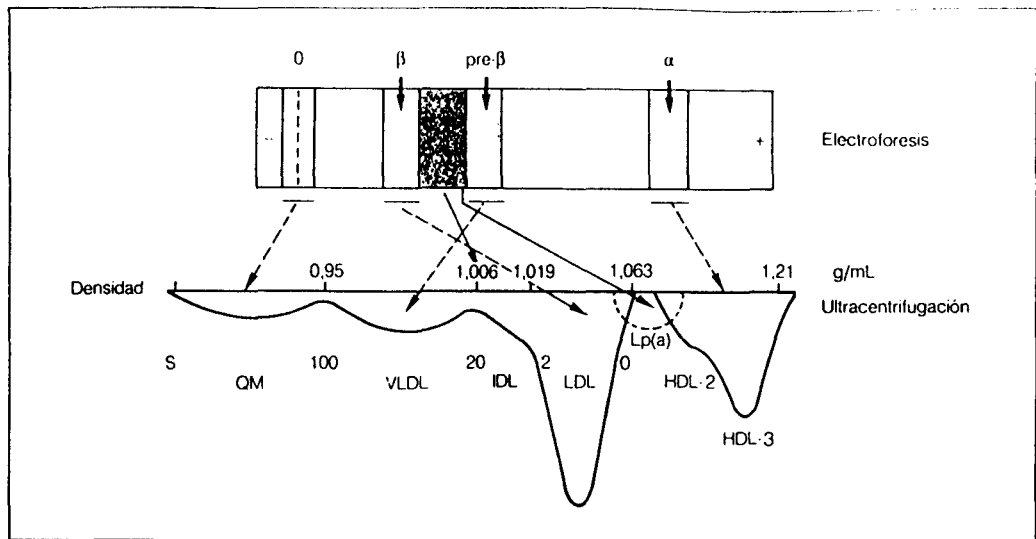


Figura 2.3. Características generales de las lipoproteínas en electroforesis zonal y en ultracentrifugación en gradiente de densidad.

micas y comportamiento en los procesos de purificación. Así, al someter una muestra de suero o de plasma a electroforesis de zona, y después de teñir los lípidos, aparecen varias bandas, a saber, las β-lipoproteínas, pre-β-lipoproteínas y las α lipoproteínas, según que su movilidad corresponda con las respectivas bandas del proteinograma clásico (fig. 2.3). Su diferente movilidad viene determinada por la carga neta que adquieren las apoproteínas al pH básico en que se realiza este tipo de electroforesis. Así, en la banda α, la que más migra hacia el ánodo, se concentran lipoproteínas ricas en apoproteínas, y en la banda β se localizan lipoproteínas con apoproteínas menos ácidas que en la banda pre-β (fig. 2.3). Aparte, otras lipoproteínas (quilomicrones) no migran en esas condiciones y permanecen en el origen, debido no tanto a su escaso contenido en apoproteínas como a su gran tamaño, que les impide

de penetrar a través de los poros del soporte electroforético.

Como se esquematiza en la fig. 2.3, cada una de esas bandas en la electroforesis se corresponde unívocamente con las diferentes clases de lipoproteínas separadas por ultracentrifugación. Existe, no obstante, una importante excepción, como es la lipoproteína (a) que, teniendo una composición cualitativa más próxima a las β que a las pre-β, migra en esta última posición (fig. 2.3 y tabla 2.1). Por otra parte, la LpX, lipoproteína que aparece en ciertas patologías hepáticas y de las vías biliares, migra en posición catódica. Este tipo de electroforesis (lipidograma) se utiliza ampliamente en clínica, porque permite una visión rápida del espectro de lipoproteínas del paciente, aunque no sea cuantitativo.

A medida que se ha ido avanzando en las características funcionales de las lipoproteínas se ha acre-

TABLA 2.1  
Características fisicoquímicas y vida media de las lipoproteínas del plasma humano

	OM	VLDL	IDL	LDL	HDL-2	HDL-3	Lp (a)
Densidad (g/mL)	< 0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,125	1,125-1,215	1,05-1,11
Peso molecular (D)	> 4 x 10 <sup>6</sup>	5-10 x 10 <sup>5</sup>	3-5 x 10 <sup>5</sup>	2-4 x 10 <sup>5</sup>	3 x 10 <sup>5</sup>	1,8 x 10 <sup>5</sup>	4,6-5,6 x 10 <sup>6</sup>
Diámetro (nm)	100-5.000	30-80	20-35	18-25	9,5-12	6,5-9,5	21-26
Sf (10 <sup>-3</sup> cm <sup>3</sup> /sg/dina/g)	> 400*	20-400*	12-20*	0-12*	4,8-6,1**	1,7-4,1**	
Migración electroforética	Origen	pre-β	β	β	α	α	pre-β
Vida media	1 h	1-3 h	1-3 h	2-3 días	5-6 días	5-6 días	3,3 días

\* Sf determinado a una densidad de 1,006 g/mL.

\*\* Sf determinado a una densidad de 1,210 g/mL.

centado la necesidad de su fraccionamiento y purificación. La propiedad que más profusamente se ha utilizado para separar las diferentes clases de lipoproteínas es su densidad, que viene determinada por la proporción de lípidos frente a proteínas. Así, se distinguen las lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL, las de baja densidad o LDL y las de alta densidad o HDL, como lipoproteínas mayoritarias en la especie humana, en el estado posprandial. Sus características físicas y composición se indican en la tabla 2.1.

Las distintas lipoproteínas del plasma se pueden obtener separadamente por ultracentrifugación del plasma, bien en equilibrio de densidad secuencialmente, aumentando en sucesivas etapas la densidad por adición de sales, o bien en una única etapa, en un gradiente de densidad como se esquematiza en la fig. 2.3. Así, de menor a mayor densidad se distinguen los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL, las de densidad intermedia o IDL, las de baja densidad o LDL y las de alta densidad o HDL con sus distintas subpoblaciones.

En la tabla 2.1 se incluye también la Lp (a), lipoproteína que no se separa dentro de un margen de densidades propio y característico, sino que cabalga entre las LDL y las HDL. En la situación fisiológica normal las VLDL son minoritarias en cuanto a número de partículas, aunque son las que mayor cantidad de triglicérido transportan. Para expresar los niveles de cada clase de lipoproteínas se suele hacer referencia a la concentración plasmática (o sérica) de alguno de sus componentes, normalmente el colesterol, de modo que esa expresión no refleja el número de partículas de cada clase. En el hombre adulto, más de dos terceras partes del colesterol circula asociado a LDL y sólo una cuarta parte a HDL, pero son más abundantes estas últimas que las primeras. En esa distribución, así como en el nivel total de colesterol, la especie humana se diferencia notablemente del resto de mamíferos (tabla 2.2). En la tabla 2.2 no se recogen los niveles de los quilomicrones porque, debido a su rápido catabolismo, prácticamente no se detectan en el plasma a las 10-12 h desde la última ingesta. Durante el periodo de absorción intestinal y en ciertas patologías los niveles de quilomicrones en el plasma son notables.

Aunque es frecuente considerar que cada una de aquellas clases de lipoproteínas constituye una población homogénea de partículas, es importante tener en cuenta que esto no es así sino que cada una de ellas está formada por diversas subclases. Normalmente los criterios que se utilizan para distinguir las distintas clases de lipoproteínas son meramente operacionales, y en la mayoría de los casos no diferencian esas subclases. Así, en su separación por ultracentrifugación, la línea divisoria entre unas y otras no es más que un punto de inflexión, de mínima frecuencia, en una curva de distribución (fig. 2.4). De esta forma, si una clase de lipoproteínas que contenga una población de partículas con alguna propiedad fisicoquímica en común (densidad, tamaño, etc., dentro de un rango) se somete a otro proceso analítico (p. ej., cromatografía de afinidad hacia alguna de las apoproteínas), seguramente observaremos la existencia de múltiples tipos de partículas, muy diferentes entre sí (fig. 2.4). El detalle de esta heterogeneidad se comentará para cada clase de lipoproteínas específicamente. Un excelente compendio sobre las características fisicoquímicas de las lipoproteínas y los métodos de análisis y separación es el libro de Mills et al<sup>1</sup>.

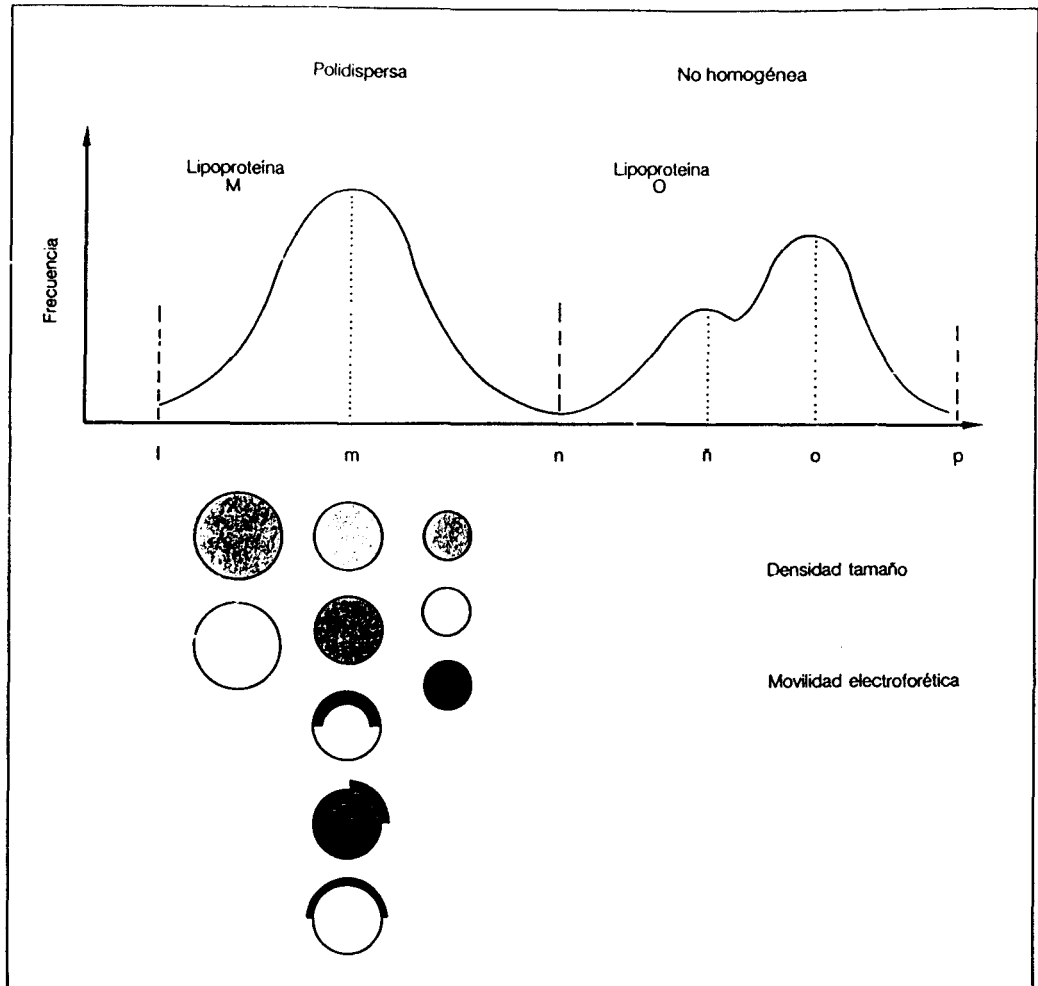
### Quilomicrones

Las lipoproteínas de mayor tamaño y con una densidad menor son los quilomicrones. Son de origen intestinal, su densidad hidratada es inferior a 0,95 g/mL y su coeficiente de flotación (Sf) superior a 400 (tabla 2.1). Más del 85 % del peso de la partícula corresponde a triglicérido, mientras que sólo el 2 % es proteína (tabla 2.2).

Los quilomicrones transportan los lípidos absorbidos desde el intestino hacia los distintos tejidos y el hígado. Entre estos lípidos cabe citar la importante masa de triglicéridos, pero también el colesterol y otros esteroides de la dieta y las vitaminas liposolubles (tabla 2.3). La vida media de los quilomicrones en plasma es de unos pocos minutos, y su degradación catabólica conduce a la aparición gradual de los denominados *quilomicrones remanentes* o partículas residuales. La diferenciación entre éstas y sus precursores es, no obstante, difícil, porque los cambios

TABLA 2.2  
Niveles promedio de colesterol en las diferentes lipoproteínas en distintas especies  
(mg de colesterol/dL plasma)

	Humano adulto	Humano neonato	Mono Rhesus	Rata	Perro	Conejo
VLDL	15	1	10	5	3	5
LDL	135	34	45	10	13	55
HDL	50	35	100	50	70	30
Total	200	70	155	65	86	90



**Figura 2.4.** Esquema sobre la heterogeneidad de las lipoproteínas. La separación de las lipoproteínas por cualquier método físico que atienda a la diferente densidad, tamaño o movilidad electroforética rinde poblaciones heterogéneas de partículas. Los límites de separación coinciden con los puntos de mínima frecuencia (l, n y p en la figura). La población denominada «lipoproteína M» en la figura presenta una distribución típicamente polidispersa, es decir, incluye partículas de múltiples tamaños (o la característica física de que se trate) pero siendo uno el más frecuente. Por el contrario, también se pueden obtener poblaciones como el de la «lipoproteína O» de la figura, que presenta una distribución no homogénea, en la que claramente pueden distinguirse dos subpoblaciones, cada una de las cuales, a su vez, polidispersa. Por último, como se ilustra en la parte inferior, la variedad de partículas a lo largo del espectro de una misma población no afecta tan sólo a la característica física que sirve para su separación, sino que, si las analizáramos con otros métodos, observaríamos que dentro de un mismo tamaño, por ejemplo, habría partículas con composición diversa. De modo que aunque las lipoproteínas del plasma pueden agruparse en unas pocas clases, difícilmente habrá dos partículas lipoproteicas iguales en todas sus características.

que sufren los quilomicrones afectan tanto a la composición lipídica como a las apoproteínas, al tiempo que disminuyen progresivamente de tamaño. En conjunto, los quilomicrones remanentes contienen menos triglicéridos y más ésteres de colesterol, apo-

proteína E y ácidos grasos libres que sus precursores. Todo ello determina un aumento de la carga negativa de la partícula, propiedad que se aprovecha metodológicamente para la separación analítica o preparativa de los remanentes respecto de los quilo-

TABLA 2.3  
Composición porcentual de las lipoproteínas del plasma humano

	OM	VLDL	IDL	LDL	HDL <sub>2</sub>	HDL <sub>1</sub>	Lp(a)
Proteínas	0,5-2,0	8	19	22	40	56	29
Triglicéridos	86	55	23	6	5	3	5
Colesterol esterificado	3	12	29	42	17	13	36
Colesterol libre	1	7	9	8	5	3	9
Fosfolípidos	7	18	19	22	33	25	21

micrones intactos mediante electroforesis o cromatografía.

Es interesante señalar dos aspectos de la composición de los quilomicrones que les son característicos. El primero es que poseen una apoproteína, la apo B-48, que se sintetiza exclusivamente en los enterocitos; el segundo es que contienen ésteres de retinol. Como es sabido, estas lipoproteínas realizan el transporte de esta vitamina desde el intestino al hígado, y ahí, parte se acumula en las células estrelladas y parte sale al plasma en su forma de alcohol y circula asociado a la proteína enlazante de retinol, de manera que los quilomicrones y sus remanentes son las únicas lipoproteínas del plasma que contienen ésteres de retinol. La identificación de los quilomicrones se suele realizar en el laboratorio mediante electroforesis, pero su separación del resto de lipoproteínas es difícil, debiéndose realizar por centrifugación suave del plasma; en otro caso los quilomicrones se obtienen junto con las VLDL.

#### Lipoproteínas de muy baja densidad

A diferencia de los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL son de origen hepático. Como se observa en la tabla 2.1, tienen un tamaño y Sf algo inferiores a los quilomicrones y una densidad superior, comprendida entre 0,95 y 1,006 g/mL. Su componente mayoritario son los triglicéridos, que representan el 55 % aproximadamente de la masa total de la partícula (tabla 2.3). Se ha estimado que una partícula promedio de VLDL contiene más de 10.000 moléculas de triglicérido, unas 3.000-4.000 de fosfolípidos, 2.000-3.000 de colesterol libre y otras tantas de esterificado.

Aunque no es la única, la función más relevante de las VLDL es la de transportar triglicéridos del hígado a otros tejidos. Junto con los quilomicrones constituyen el grupo de lipoproteínas ricas en triglicéridos. La separación física de unas respecto de las otras también entraña dificultades. Existen varias diferencias en cuanto a su composición, aparte de las ya comentadas. Así, las VLDL poseen apo B-100 (una molécula por partícula) y apenas apoproteínas del grupo de las A, mientras que los quilomicrones

contienen apo B-48 y una cantidad apreciable de A-I, A-II y A-IV (véase más adelante). No obstante, ninguna de esas diferencias se ha explotado para la separación de estas dos clases de lipoproteínas a excepción de su densidad.

Las VLDL constituyen una población heterogénea de partículas. Así, mediante ultracentrifugación se observa que las VLDL se distribuyen enteramente a lo largo del espectro de Sf 20-400, configurando una población polidispersa (donde se observa un continuo en la diversidad), al tiempo que heterogénea de partículas (coexisten partículas con alguna propiedad en común —por ejemplo, el tamaño o la densidad— pero con otras totalmente diferenciadas, como la composición en apoproteínas) (fig. 2.3). Como característica general se observa que conforme disminuye el tamaño y aumenta la densidad de estas partículas, disminuye su contenido absoluto de triglicérido y de apoproteínas E y C y aumenta el contenido relativo de los otros componentes.

Diversas técnicas se han utilizado para separar subpoblaciones de VLDL con distinto tamaño, carga o densidad. A su vez, la cromatografía de afinidad, incluida la inmovinoafinidad, permite el subfraccionamiento bajo un criterio más funcional, como es el contenido en apoproteínas. Así, mediante cromatografía en gel de agarosa, que tiene unida heparina o bien anticuerpo contra la apo E, se han podido separar varias subpoblaciones con distinto contenido en apo E, habiéndose observado que, por lo general, la riqueza en esta apoproteína se asocia con un menor contenido en triglicérido y mayor en ésteres de colesterol, fosfolípido y proteína, al tiempo que con un menor tamaño<sup>2</sup>. Cierta proporción de las VLDL plasmáticas carece de apo E, siendo muy ricas en triglicérido y en fosfatidilcolina con respecto a esfingomielina. Lo interesante de este tipo de subfraccionamiento es que permite la purificación de poblaciones de lipoproteínas con características funcionales diferenciadas, como su susceptibilidad de ser hidrolizadas por las enzimas lipolíticas endoteliales o su interacción con los receptores celulares.

Por último, la utilización de anticuerpos monoclonales hacia diversos epitopos de una misma apoproteína o el estudio de la acción de enzimas hidrolíticas

sobre las VLDL, han permitido identificar partículas con semejante dotación en apoproteínas pero con diferente reactividad. Concretamente se ha reconocido la existencia de dos subpoblaciones de VLDL con apo E, en una de las cuales la apo E no es atacable por la trombina y tampoco interactúa con el receptor LDL. Por lo que respecta a la apo B-100, se conoce también que su reactividad varía según el grado de lipólisis que haya sufrido la VLDL. Estos datos apoyan el concepto de que las apoproteínas o, en concreto, alguno de sus dominios o regiones activas, pueden adoptar sobre la partícula dos disposiciones distintas (*oculta* frente a *expuesta*, respectivamente), con evidentes consecuencias en el metabolismo de la lipoproteína<sup>3</sup>.

### Lipoproteínas de densidad intermedia

En su metabolismo las VLDL dan lugar a unas partículas remanentes de mayor densidad, que para diferenciarlas de los quilomicrones reciben el nombre de lipoproteínas de densidad intermedia o IDL. En condiciones normales su concentración en plasma es muy baja. En ultracentrifugación se separan en el estrecho rango de densidad comprendido entre 1,006 y 1,019 g/mL, habiéndose denominado inicialmente LDL<sub>1</sub> para diferenciarlas de las LDL<sub>2</sub> ( $d = 1,019-1,063$  g/mL) que son mayoritarias (tabla 2.1).

Proceden de la degradación en el plasma de las VLDL, por pérdida de triglicérido y otros cambios en la composición lipídica y apoproteica, existiendo una gradación continua entre las VLDL y las IDL en las distintas características. De hecho, su existencia como entidad distinta de las VLDL sólo es evidenciable en estados en donde se produce su acumulación, como en la disbetalipoproteinemia. El estudio minucioso de esta clase de lipoproteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente permite la identificación de dos subpoblaciones: las IDL-1 (con radio de Stokes de 28 a 30 nm) y las IDL-2 (27-28 nm). Las primeras contienen un 21 % de triglicérido y un 41 % de colesterol esterificado, mientras que en las IDL-2 esos porcentajes son 11 y 51, respectivamente<sup>4</sup>. Su composición apoproteica es similar. En tamaño, densidad y composición las

IDL-1 se solapan con las VLDL más pequeñas, y las IDL-2 con las LDL más grandes. Estas subpoblaciones son funcionalmente distintas entre sí, habiéndose observado que las IDL-1 dan lugar a LDL por acción de la lipoproteína lipasa, mientras que las IDL-2 no son hidrolizadas más allá por esa enzima. Estas últimas son las más abundantes en individuos normales y su concentración se asocia positiva y fuertemente con la enfermedad cardiovascular.

### Lipoproteínas de baja densidad

Las lipoproteínas de baja densidad o LDL son aquellas que se separan entre las densidades de 1,019 y 1,063 g/mL (tabla 2.1). La función prominente de las LDL (junto con las HDL) es facilitar el trasiego de colesterol entre los tejidos. Acorde con ello, el componente mayoritario de las LDL es el colesterol esterificado, que llega a representar alrededor de un 40 % del peso seco de la partícula (tabla 2.3). Se puede calcular que una partícula promedio de LDL contiene hasta 1.500 moléculas de colesterol esterificado, unas 500 de colesterol libre, unas 650 de fosfolípido y menos de 100 de triglicérido. En contraste con lo anterior, la partícula de LDL posee una sola molécula de apo B-100, si bien ésta es una proteína de muy elevado peso molecular. Al comparar estas cifras con las correspondientes a las VLDL, destaca que éstas poseen muchas más moléculas de cualquier lípido que las LDL, incluido el colesterol esterificado y, por tanto, la transformación de las VLDL en LDL se lleva a cabo por un proceso en el que se producen esas pérdidas. Como en cualquier lipoproteína, el fosfolípido más abundante en las LDL es la fosfatidilcolina (tabla 2.4); no obstante, las LDL son las lipoproteínas más ricas proporcionalmente en esfingomielina, siendo la relación fosfatidilcolina/esfingomielina de 3 a 1, aproximadamente. El significado de esta particularidad estructural no se conoce, como tampoco se ha descifrado el papel de los fosfolípidos, aparte del estructural, en el metabolismo global de las lipoproteínas.

Las LDL son, quizá, la clase de lipoproteínas más homogénea, por cuanto todas ellas contienen una sola molécula de apo B-100 y están prácticamente exentas de otras apoproteínas. Las pequeñas dife-

TABLA 2.4  
Distribución de fosfolípidos en las lipoproteínas del plasma humano (mg/100 mg/fosfolípido total)

	OM	VLDL	LDL	HDL <sub>2</sub>	HDL <sub>3</sub>	Lp (a)
Fosfatidilcolina	78,5	68,4	66,6	78,1	81,2	63,6
Fosfatidiletanolanina	5,6	5,3	2,3	3,5	2,6	1,4
Esfingomielina	11,7	17,0	27,1	15,3	9,7	34,5
Lisofosfatidilcolina	4,2	5,7	2,8	2,1	5,7	0,5

rencias entre unas y otras en el contenido de lípidos (principalmente ésteres de colesterol) determinan, no obstante, la existencia de las distintas partículas, configurando una población polidispersa de lipoproteínas como se evidencia por ultracentrifugación analítica (fig. 2.3). La aplicación de las técnicas más resolutivas de ultracentrifugación en gradiente de densidad o la electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente, permiten la identificación de subpoblaciones dentro de las LDL. Mediante esta última se diferencian al menos tres subpoblaciones (LDL-I, LDL-II y LDL-III, de mayor a menor tamaño). Es interesante hacer notar que la abundancia de unas u otras está determinada genéticamente, habiéndose observado que el 85 % de la población aproximadamente presenta un perfil en donde predominan las LDL-II (patrón A), mientras que en el resto predominan las LDL-III (patrón B). El metabolismo de estas partículas no se conoce en detalle, pero el hecho de que el patrón B sea típico de los pacientes con hiperlipemia familiar combinada y se asocie con un elevado riesgo cardiovascular, aconseja una mayor dedicación al estudio del significado de las subpoblaciones de LDL.

### Lipoproteínas de alta densidad

Como su nombre indica, las lipoproteínas de alta densidad o HDL son las de mayor densidad, menor tamaño y mayor relación superficie/volumen. En

ellas la proporción de proteína y fosfolípidos (componentes de la superficie lipoproteica) frente a ésteres de colesterol es considerablemente más alta que en las otras lipoproteínas (tabla 2.3). Así, menos del 16 % del peso de una partícula de HDL corresponde a colesterol esterificado y, en el hombre, la proporción del colesterol plasmático que circula en estas lipoproteínas es menor que en LDL (tabla 2.2). En masa total, no obstante, la concentración de HDL es equivalente a la de LDL (entre 250 y 500 mg/dL), pero en número de partículas, las HDL exceden en 10-20 veces el de las restantes lipoproteínas. Estos datos ya anticipan el importante y activo papel que desempeñan estas lipoproteínas en el metabolismo plasmático de los lípidos.

La población de HDL es muy heterogénea<sup>5</sup>. Ya desde los pioneros estudios de Gofman et al en 1954 se identificaron en el hombre tres subpoblaciones de HDL mediante ultracentrifugación. a saber, HDL<sub>1</sub>, HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub>. Las primeras son muy minoritarias en individuos normales, pero aumentan en determinadas situaciones patológicas, siendo también abundantes en la rata y en animales alimentados con colesterol, por lo que también se denominaron HDL-colesterol. Son relativamente ricas en colesterol y poseen un tamaño superior al de las otras HDL (13-14 nm de diámetro), un peso de 500 kD aproximadamente y una densidad en torno a 1,063 g/mL, por lo que es prácticamente imposible separarlas de las LDL y HDL<sub>2</sub> mediante ultracentrifugación del

TABLA 2.5  
Características y función de las apoproteínas del plasma humano

	PM	N.º de aminoácidos	pl	Origen	Cromosoma	Función
Apo A-I	28.300	243	5,85, 5,65, 5,52, 5,40, 5,36	Intestino Hígado	11	Activación LCAT. Unión a receptor HDL Factor estabilizador de PGI <sub>2</sub>
Apo A-II 17.400 (dímero)		2 x 77	5,16, 4,89, 4,58, 4,31	Intestino Hígado	1	
Apo A-IV	45.000	376	5,15	Intestino	11	Activación LCAT. Facilita transferencia de apo C-II
Apo B-100	549.000	4.536		Hígado	2	Biosíntesis VLDL Unión al receptor B/E
Apo B-48	264.000	2.152		Intestino	2	Biosíntesis QM
Apo C-I	6.550	57	7,5	Hígado	19	Activación LCAT
Apo C-II	8.850	79	4,86, 4,69	Hígado	19	Activación LPL
Apo C-III	8.750	79	5,02, 4,82, 4,62	Hígado	11	Inhibición LPL y del reconocimiento de la apo E por el receptor
Apo D	32.500		5,20, 5,08, 5,00	Hígado	3	Forma complejos con la LCAT
Apo E	34.200	299	6,02, 5,89, 5,78, 5,64	Hígado Macrófagos	19	Unión a receptor E y al B/E
Apo F	28.000		3,7			
Apo G	72.000					
Apo H	43.000-54.000		5,6-6,4			Activación de LPL en presencia de apo C-II
Apo SAA (pobre en treonina)	11.700	104	6,0, 6,5			
Apo (a) 419.000-338.000				Hígado	6	Inhibición del plasminógeno



plasma. No obstante, gracias a su alto contenido en apo E, pueden purificarse por cromatografía de afinidad.

Las HDL<sub>2</sub> comprenden un grupo de partículas con densidad situada entre 1,063 y 1,125 g/mL. Son considerablemente más pequeñas que las anteriores (tabla 2.1) y su apoproteína mayoritaria es la apo A-I. Su concentración en plasma varía notablemente entre mujeres y varones (20 y 10 mg de colesterol/dL, respectivamente) y se correlaciona inversamente con los niveles de triglicérido.

Las HDL<sub>3</sub> son las más densas (1,125-1,21 g/mL) (tabla 2.1) y abundantes (alrededor de 35 mg de colesterol/dL). Se puede estimar que una HDL<sub>3</sub> promedio contiene tan sólo 30 moléculas de colesterol esterificado y 10 de libre frente a más de 50 de fosfolípido; alguna molécula de triglicérido y varias de proteína completan la partícula. Las hay que contienen 3 o 4 moléculas de apo A-I, simultáneamente o no con otras tantas de apo A-II, y otras sólo presentan apo A-II. Algunas partículas pueden contener apo E o apo D y está por determinar si todas ellas contienen apo C. Con pequeñas diferencias esta misma variedad de tipos de partículas se identifican entre las HDL<sub>2</sub>.

Mediante cromatografía de inmunoafinidad pueden separarse entre sí esas HDL con distinta composición en apoproteínas; sin embargo, mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad o electroforesis en gel de poliacrilamida se obtiene otro tipo de subpoblaciones. Así, se reconocen las HDL<sub>2b</sub>, HDL<sub>2a</sub>, HDL<sub>3a</sub>, HDL<sub>3b</sub> y HDL<sub>3c</sub>, de menor a mayor densidad y de mayor a menor tamaño, respectivamente. Por cromatografía de afinidad a la heparina se identifican otras subpoblaciones, que se diferencian entre sí por su distinto contenido en apo E y apo A-II con respecto a apo A-I<sup>6</sup>. Por su parte, la microscopía electrónica revela la existencia de partículas esféricas, pero también de otras discoidales, si bien en muy pequeña proporción. Finalmente, los estudios inmunológicos han demostrado que la apo A-I puede adoptar varias configuraciones sobre la partícula de HDL, con menor o mayor reactividad frente a anticuerpos monoclonales. Todo ello da idea de la enorme heterogeneidad de esta clase de lipoproteínas; en definitiva, debe tenerse presente que dentro de las HDL (y, en general, en cualquier clase de lipoproteínas) se encuentran múltiples tipos de partículas, con composición diversa y metabolismo diferenciado.

## APOPROTEÍNAS

Por definición las apoproteínas son proteínas que se asocian con lípidos para formar las lipoproteínas.

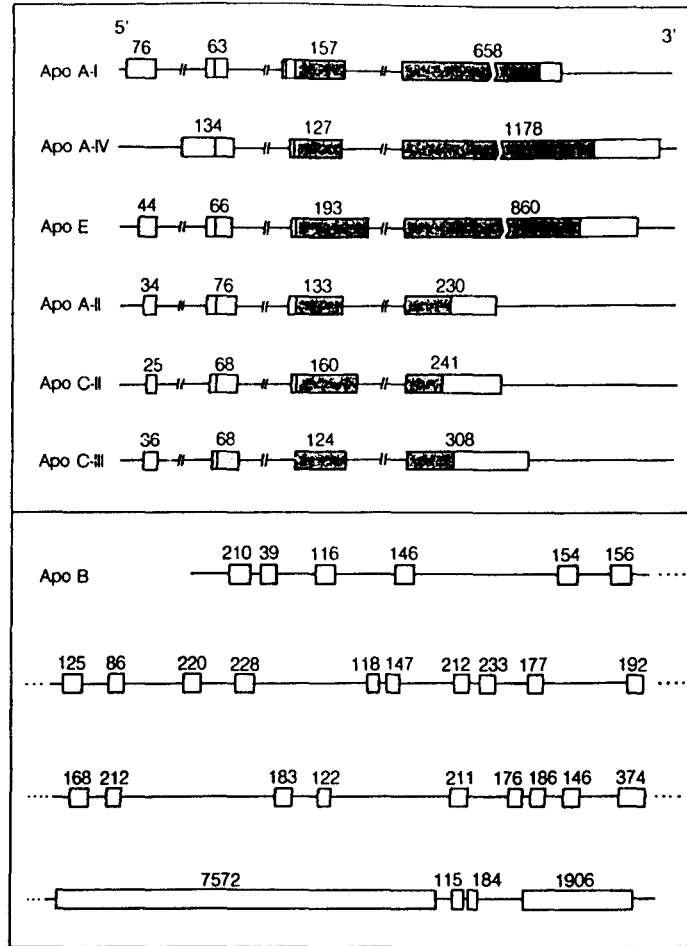
De hecho, para poder ser considerada como tal, una apoproteína debe cumplir los siguientes requisitos: a) poseer propiedades químicas, físicas e inmunológicas definidas; b) tener la capacidad de formar una partícula lipoproteica diferenciada; c) poseer alguna propiedad funcional o estructural característica, y d) formar parte integrante del sistema de transporte de lípidos en sangre.

Las apoproteínas no sólo mantienen la estructura de las lipoproteínas y con ello facilitan su transporte a través del medio interno, sino que determinan el destino de los lípidos al ser algunas de ellas ligandos de receptores específicos de membrana, mientras que otras modulan la actividad de ciertas enzimas plasmáticas.

Las proteínas que cumplen esos criterios están referidas en la tabla 2.5 (desde la apo A-I a la apo E). Las apoproteínas F, G y H son muy minoritarias y su papel está aún por definir, por lo que no se tratarán en este capítulo con mayor detalle. La apo (a) siempre va unida convalentemente a la apo B-100. Son proteínas de muy variado peso molecular y de las diez primeras se conoce su estructura primaria, bien por secuenciación de la proteína purificada o por estudio del cDNA.

## Localización cromosómica y estructura de los genes

El enorme avance de la biología molecular y su aplicación a las apoproteínas del hombre ha permitido establecer la localización cromosómica de sus genes, tal como se indica en la tabla 2.5. Los genes para las apo A-I, apo C-III y apo A-IV se localizan en el brazo largo del cromosoma 11, formando un *cluster* de unas 22 kb. El gen para la apo E está separado unas 4 kb del gen para la apo C-I sobre el cromosoma 19, y su transmisión genética está fuertemente ligada al de la apo C-II. En este mismo cromosoma se sitúa el gen del receptor LDL. Los genes para la apo A-II, apo B y apo D se localizan en cromosomas independientes (1, 2 y 3, respectivamente). La estructura genómica de los estudiados hasta la fecha muestra una remarcable similitud entre ellos, con la excepción de los genes para la apo B y la apo D (fig. 2.5). Los de A-I, A-II, C-II, C-III y E presentan cuatro exones y tres intrones cada uno, y la localización de cada uno de estos intrones es muy similar. El gen para la apo A-IV se diferencia de ellos únicamente en que carece del primero de estos exones. Aparte de compartir la misma estructura básica en cuanto a la organización de los exones e intrones, estos genes también presentan regiones codificantes con una alta homología entre ellos. Así, en todas estas apoproteínas se observan dos secuencias de 11 aminoácidos cada una que, con pequeñas variaciones,



**Figura 2.5.** Organización de los genes de ciertas apoproteínas humanas. Las cajas representan los exones y las líneas entre ellos, los intrones. El número que figura sobre ellos indica el número de nucleótidos. La sección rayada corresponde al péptido señal y las secciones oscuras al péptido maduro. Se observa la estrecha relación entre los genes para A-I, A-IV, E, A-II, C-II y C-III y su diferencia con el gen para la apo B-100.

se repiten periódicamente a lo largo de la estructura de aquellas apoproteínas<sup>7</sup>. Estas regiones representan estructuras muy conservadas a lo largo de la evolución y que tienen un significado funcional relevante, correspondiendo fundamentalmente a las regiones anfipáticas que tienen todas las apoproteínas y que les confiere la propiedad de enlazar lípidos (fig. 2.2)

La alta homología de los genes de las apoproteínas pone de manifiesto su origen común, que procederían de un pequeño gen ancestral por duplicación, fusión, adición de otros dominios, entrecruzamiento, etc., tal como se indica en la figura 2.6. Las mutaciones ocurridas a lo largo de la evolución en aquellas secuencias repetitivas es la base de la divergencia entre dichos genes, dando lugar a la ad-

quisición de nuevas y características funciones en cada apoproteína<sup>8</sup>.

Como se ha indicado anteriormente, el gen de la apo B posee una estructura considerablemente distinta a los anteriores, con 28 intrones y 29 exones, y una extensión de 43 kb (fig. 2.5). Por su parte, el gen de la apo D, más pequeño, también presenta una organización de intrones/exones totalmente distinta, con varios intrones intercalados en la región que codifica el péptido maduro. Estos datos hacen pensar que tanto el gen de la apo B como el de la apo D no pertenecen a la familia multigen de las otras apoproteínas.

Esta agrupación de los genes puede relacionarse con la capacidad de unirse a lípidos que presentan las respectivas apoproteínas. Así, las apo A-I, A-II,

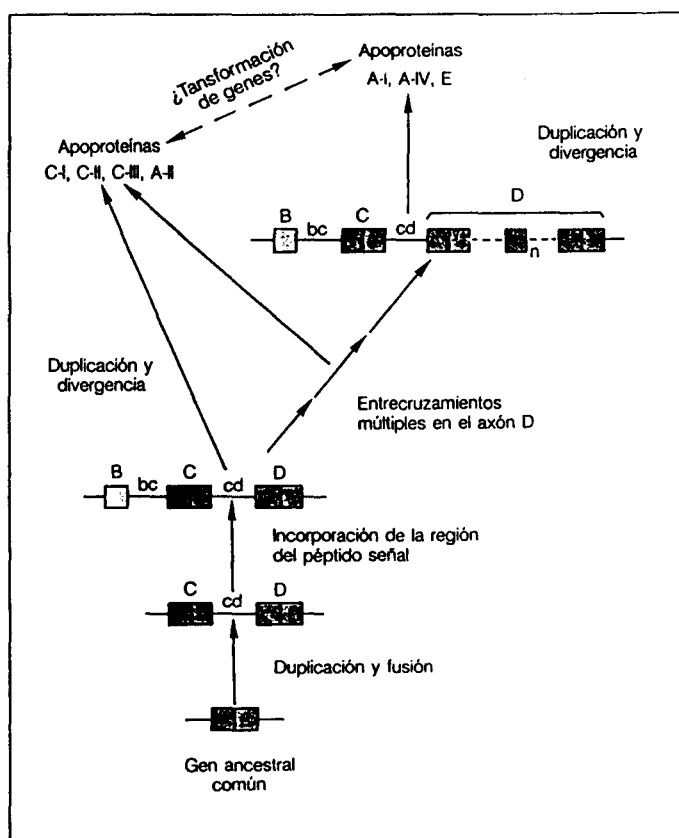
etc., que derivan del gen ancestral común, presentan todas ellas numerosas regiones con estructura en  $\alpha$  hélice anfipática (fig. 2.2). La cara hidrofóbica de dicha hélice se expone a los ácidos grasos de los fosfolípidos, mientras que la cara hidrofílica interactúa con los grupos polares de los fosfolípidos y con el agua. Las apoproteínas, al poder interactuar con la fase acuosa, se localizan sobre la superficie de la lipoproteína y ello facilita su transferencia de unas partículas a otras así como la interacción con enzimas o con receptores específicos de membrana. La interacción de las apoproteínas con los lípidos se diferencia de la que ocurre en las membranas biológicas, en donde las proteínas integrantes poseen una o varias regiones constituidas exclusivamente por aminoácidos no polares, que son las que facilitan la inserción del polipéptido en la membrana lipídica.

La apo B, a diferencia de las otras apoproteínas, posee un alto contenido de estructura  $\beta$ , que se cree que es la que interactúa fuertemente con los lípidos

e impide ser transferida de una lipoproteína a otra. Por su parte, la apo D carece tanto de estructura  $\beta$  como de hélice  $\alpha$  anfipática.

### Apoproteína A-I

La apo A-I presenta una concentración en plasma humano entre 100 y 150 mg/dL aproximadamente (tabla 2.6), y es la apoproteína más abundante. Su concentración es indicativa de la HDL, ya que de ellas es el principal componente proteico (tabla 2.6). De hecho, la apo A-I es constitutiva de las HDL, de manera que en estados de deficiencia de esta apoproteína la concentración de HDL es bajísima y presentan una composición fuertemente alterada. Se trata de un polipéptido que se sintetiza fundamentalmente en el hígado y el intestino en forma de prepropéptido, con un péptido señal de 18 aminoácidos que se escinde intracelularmente, saliendo a la circulación la forma pro-apo A-I de 249 aminoácidos, acilada con palmitato; en el plasma, alguna proteasa



**Figura 2.6.** Modelo simplificado de evolución de los genes de ciertas apoproteínas humanas. El gen ancestral común probablemente comprendería unas pocas secuencias repetidas de 33 nucleótidos, cada una de las cuales codificaría el undecapéptido repetitivo que se aprecia en la estructura de las apoproteínas actuales.

TABLA 2.6  
Niveles de apoproteínas y su distribución en las lipoproteínas del plasma humano

	Niveles en plasma (mg/100 µg proteína) (mg/dL)	OM	VLDL	LDL	HDL <sub>2</sub>	HDL <sub>3</sub>	Lp (a)	d > 1,21
Apo A-I	100-150	0-5			70	65		+
Apo A-II	30-50	0-1			10	20		
Apo A-IV	15	10				+		+++
Apo B-100	80-100		35-40	95-100			40-60	
Apo B-48	**	20-25						
Apo C-I	4-7	5-10	3	+	+	+		
Apo C-II	3-8	15	7-8	+	+	+		
Apo C-III	8-15	35-40	35-40	+	10	5		
Apo D	5-6	1	+		+	1,2		+++
Apo E	3-6	5	5-10	+	1-10	1-2		
Apo F	2			+	+	+		
Apo G	6-10				+	++		+
Apo H	10-16	+	+		+	+		+++
Apo SAA	***		+		+	++		
Apo (a)	0-500	+	+	****	****		40-60	

\* La cruz indica presencia, pero sin poderse dar un dato cuantitativo.

\*\* La apo B-48 se encuentra en plasma sólo durante el periodo absorptivo.

\*\*\* La apo SAA es una proteína de fase aguda y aparece en el plasma sólo en ciertos estados patológicos o tras la agresión.

\*\*\*\* La apo (a), como constituyente de la Lp (a), se detecta por ultracentrifugación en las fracciones de LDL y de HDL<sub>2</sub>.

no identificada rompe un enlace Gln-Asp, liberándose un hexapéptido de la región N-terminal y dando lugar a la apo A-I madura, de 243 aminoácidos y 28 kD (fig. 2.7). En plasma se identifican hasta 6 isoformas de la apo A-I mediante isoelectroenfoque, la A-I-2 corresponde a la pro-apo A-I y las mayoritarias son la A-I-4 y la A-I-5; esta variedad no corresponde a péptidos con distinto contenido en ácido siálico, sino que probablemente proceden unas de otras por desamidación.

Además de en las HDL, la apo A-I también se localiza en los quilomicrones, aunque en baja proporción (tabla 2.6). El número de moléculas de apo A-I por partícula de HDL es variable, pero lo habitual es

de 3 a 4 (fig. 2.8). Se han reconocido múltiples variantes de la apo A-I, que proceden por sustitución o pérdida de algún aminoácido (tabla 2.7). De las indicadas, la única variante que lleva asociada evidentes alteraciones en la función de esta apoproteína es la denominada «Milán», que posee Cys en vez de Arg en la posición 173, lo que le habilita para formar dímeros por puente de cistina entre dos moléculas de apo A-I «Milán» o entre una de ellas y la apo A-II.

Aparte de dar estabilidad a las HDL, la apo A-I ejerce otras funciones de relevancia (tabla 2.5). Una de ellas es la activación de la lecitín-colesterol-aciltransferasa LCAT, por lo que la propia apoproteína de una HDL facilita que se esterifique el colesterol

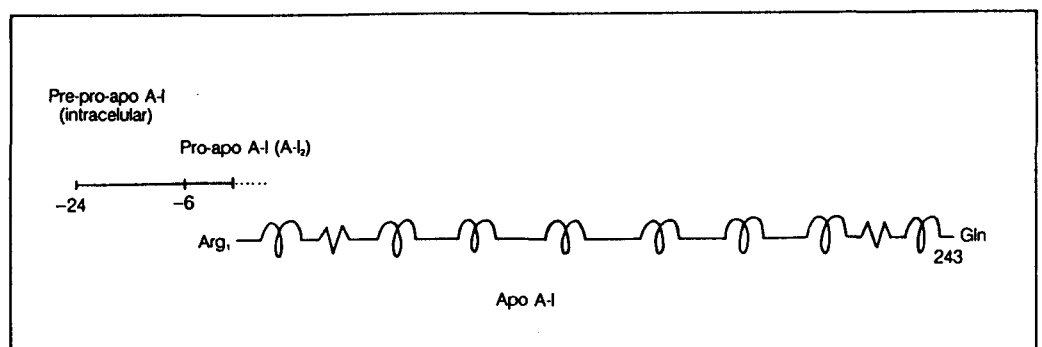


Figura 2.7. Esquema de la estructura de la apo A-I. La línea helicoidal representa segmentos con estructura en hélice  $\alpha$  anfipática. La línea quebrada representa segmentos con estructura en lámina  $\beta$ .

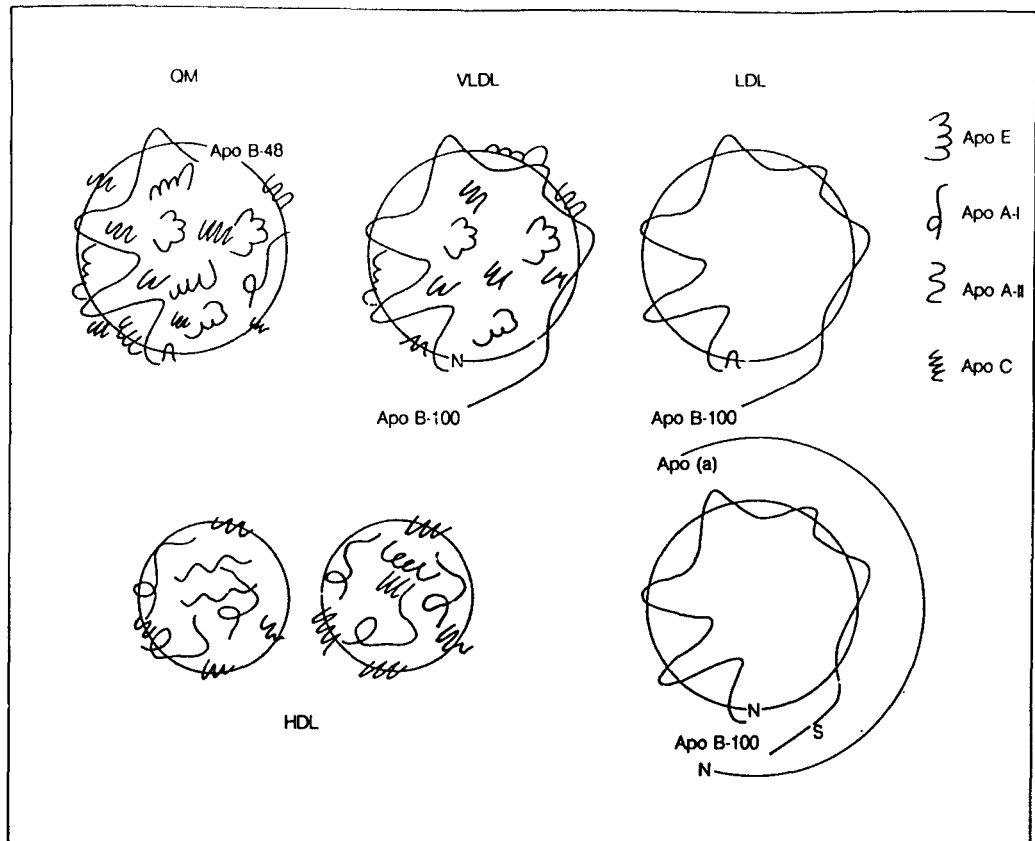


Figura 2.8. Esquema de la distribución de las apoproteínas en las lipoproteínas.

libre que porta esa misma partícula lipoproteica. El mecanismo de activación de la LCAT involucra las repetidas regiones con estructura en hélice  $\alpha$  anfipática. Estas regiones están presentes también en otras apoproteínas (p. ej., C-I, A-IV, E) y, de hecho, éstas activan igualmente la LCAT.

Otra función importante que se le asigna a la apo A-I es la de ligando de un receptor o aceptor de membrana. En macrófagos y hepatocitos los datos existentes sugieren que la apo A-I de las HDL media en el proceso de retroendocitosis que protagonizan estas lipoproteínas<sup>9</sup>. En otros tipos celulares se ha descrito la existencia de un aceptor de apo A-I, habiéndose propuesto que tras su unión se desencadena la salida de colesterol libre hacia las HDL<sup>10</sup>. Queda por determinar aún la naturaleza de dicho aceptor o receptor y su especificidad hacia las apoproteínas. Recientemente se ha demostrado también que la apo A-I actúa como factor estabilizador de la prostaciclina<sup>11</sup>. La trascendencia fisiológica de

estas diversas funciones está aún por determinar. En cualquier caso, la enfermedad coronaria prematura que sufren los escasos pacientes detectados con deficiencia en esta apoproteína, así como la asocia-

TABLA 2.7  
Variantes de apolipoproteína A-I en seres humanos

	Carga relativa	Sustitución	Activación LCAT (%)
A-I	0		100
Münster 3 (A)	+1	Asp <sub>100</sub> →Asn	100
Münster 3 (B)	+1	Pro <sub>4</sub> →Arg	100
Münster 3 (C)	+1	Pro <sub>3</sub> →His	100
Münster 3 (D)	+1	Asp <sub>213</sub> →Gly	100
Giesen	+1	Pro <sub>142</sub> →Arg	60
Milano	-1	Arg <sub>173</sub> →Cys	< 20 (dímero)
Marburg	-1	Lys <sub>107</sub> →0	60
Münster 2 (B)	-1	Ala <sub>158</sub> →Glu	
Münster 4	+2	Glu <sub>198</sub> →Lys	100
Norway	+2	Glu <sub>136</sub> →Lys	100

ción inversa entre niveles de apo A-I y casos de enfermedad cardiovascular que aportan los estudios epidemiológicos, evidencian el importante papel que desempeña esta apoproteína en el denominado transporte reverso de colesterol hacia el hígado.

### Apoproteína A-II

Esta apoproteína es también abundante en las HDL, aunque en menor proporción que la apo A-I. También se encuentra en los quilomicrones en baja proporción (tabla 2.6). Su concentración en plasma humano se encuentra entre 30 y 50 mg/dL (tabla 2.5). Su vida media en el plasma es de 4-5 días, parecida a la de la apo A-I. Se sintetiza principalmente en el hígado en forma de prepropéptido, con el péptido señal de 18 aminoácidos que es escindido contralateralmente, como en el caso de la apo A-I. El propéptido sale al plasma, donde es procesado por una tiol proteasa para perder un pentapéptido del extremo N-terminal, dando lugar a la apo A-II madura de 77 aminoácidos. Circula en sangre en forma de un dímero, de 17.400 D, estabilizado por un puente disulfuro entre los respectivos restos de cisteína en posición 6. La apo A-II también puede formar un heterodímero con la apo E. Aparte de la pro-apo A-II, que posee 3 cargas positivas adicionales, en plasma se detectan varias isoformas con distinto contenido en ácido siálico, siendo la mayoritaria la que carece de él.

Aparte de su papel estructural, la función de la apo A-II no está bien establecida. Se conoce su gran afinidad por los fosfolípidos. A su vez, *in vitro* puede llegar a inhibir la LCAT pero, en determinada proporción con la apo A-I sobre una misma partícula lipoproteica, la apo A-II puede incluso estimular la actividad de aquella enzima. Por otra parte, se llegó a sugerir que la apo A-II estimulaba la lipasa hepática endotelial, pero tal extremo no ha podido ser confirmado.

### Apoproteína A-IV

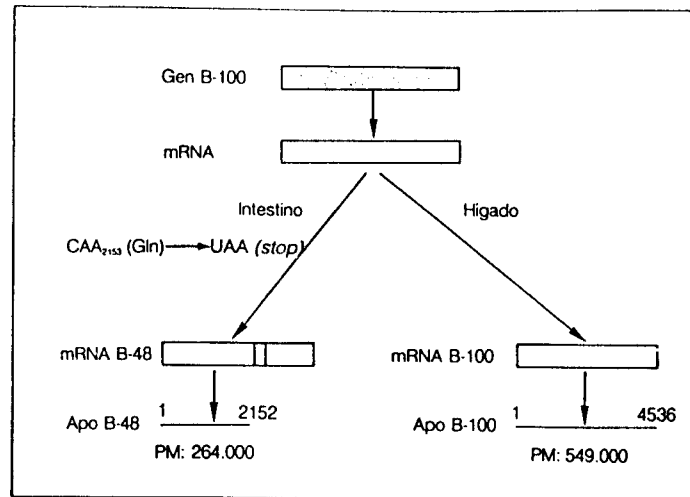
Aunque la mayor parte de la apo A-IV se encuentra libre, no asociada a lipoproteínas, parte se asocia a los quilomicrones y a las HDL (tabla 2.6). Su concentración en plasma oscila en torno a 15 mg/dL. Se sintetiza fundamentalmente en el intestino, en forma de pre-apo A-IV, que contiene un presegmento señal de 20 aminoácidos, distinto de las apoproteínas anteriores. Ese segmento es escindido intracelularmente y sale a la linfa la apo A-IV madura, de 376 aminoácidos y un peso molecular de 45 kD. Esta proteína carece de Cys y no se glicosila, pero se detectan numerosas isoformas en plasma de naturaleza incierta. Aparte, la apo A-IV presenta polimorfismo genético.

La apo A-IV contiene al menos 13 de los segmentos de 22 aminoácidos con estructura en hélice  $\alpha$  anfipática de forma similar a la apo A-I. Se ha observado que cuando la LCAT está activa la apo A-IV se encuentra asociada a las HDL<sub>3</sub> y viceversa, de manera que se ha sugerido que la formación de un complejo ternario LCAT-apo A-IV-HDL<sub>3</sub> es un acontecimiento relevante en el metabolismo de estas lipoproteínas. Por otra parte, la apo A-IV se une con afinidad a las membranas celulares y llega a promover la salida de colesterol de las células, todo lo cual preconiza un significativo papel de esta apoproteína en el metabolismo del colesterol. Muy recientemente se ha observado que la apo A-IV facilita la transferencia de apo C-II desde las HDL a los quilomicrones, favoreciendo la acción de la lipoproteína-lipasa<sup>12</sup>. Al igual que en las anteriores apoproteínas, el alcance fisiológico de estas acciones de la apo A-IV es incierto.

### Apoproteína B

Genéricamente, la apo B es la apoproteína de mayor tamaño. Existen dos especies, la apo B-100 y la apo B-48. La primera es constituyente de VLDL, IDL y LDL, y la apo B-48 lo es de los quilomicrones (tabla 2.6). Ambas especies son esenciales para configurar las correspondientes lipoproteínas, de forma que su deficiencia supone la ausencia de dichas lipoproteínas del plasma. En el hombre la apo B-48 se sintetiza exclusivamente en el enterocito, mientras que la apo B-100 es de procedencia hepática, de ahí su localización particular en aquellas lipoproteínas (tabla 2.5).

El gran tamaño y la bajísima solubilidad de la apo B-100 ha hecho muy difícil su estudio como tal, pero la utilización de su cDNA está ayudando actualmente a desvelar aspectos sobre su estructura. La apo B-100 es una de las proteínas monoméricas mayores que se conocen, con 4.536 aminoácidos y un peso molecular de 512 kD (o 549 kD cuando está glicosilada). La apo B-48 posee 2.152 aminoácidos y un peso molecular igual al 48 % de la anterior, de ahí su denominación. Ambas proceden de la expresión de un mismo gen, cuyo mRNA es procesado de forma diferente en hígado y en intestino (fig. 2.9). En este último órgano, el mRNA correspondiente sufre una transformación que consiste en la sustitución de una citosina por un uracilo, de manera que el codón CAA que codificaba Gln en posición 2.153 pasa a ser UAA, que es un codón de parada. Se desconoce la identidad de la enzima responsable de ese cambio, la cual presenta una especificidad de órgano sin precedentes, y su actividad es tal que impide que el intestino segregue apo B-100 a pesar de que sintetiza su mRNA. En definitiva, la apo B-48 no es más



**Figura 2.9.** Esquema de la síntesis de las apo B-100 y B-48. En la especie humana, el gen da lugar a un mRNA que es procesado de forma diferente según el tejido para dar lugar a apo B-48 (intestino) o apo B-100 (hígado).

que el fragmento de 2.152 aminoácidos del extremo N-terminal de la apo B-100. En plasma se detectan también otras especies de apo B, la B-26 y la B-74, pero son productos de degradación de la B-100<sup>13</sup>.

Aparte del papel estructural de las apo B-100 y B-48, que es esencial para la síntesis y secreción de las respectivas lipoproteínas, la apo B-100 es importante para el reconocimiento de las lipoproteínas por el receptor denominado *de LDL*. Ello se debe a que presenta un dominio que interactúa específicamente con dicho receptor, y de esta manera la apo B-100 dirige y determina el metabolismo último de las LDL<sup>14</sup>. Ese dominio se localiza en torno a los aminoácidos 3.345 y 3.381, por lo que la apo B-48 no presenta aquella propiedad<sup>15</sup>.

El gen de la apo B presenta polimorfismo genético. Así, con la enzima de restricción XbaI se reconoce la existencia de dos alelos distintos, el X1 y X2. Los estudios epidemiológicos muestran que el colesterol de LDL es ligeramente superior en los homocigotos para X2 que en los X1, pero no están claras sus causas. Por otra parte, se han identificado pacientes con una apo B-100 que presenta una sustitución en el aminoácido 3.500 (Gln en vez de Arg); esta proteína mutante interactúa deficientemente con el receptor LDL, siendo ésta la causa de la hipercolesterolemia que manifiestan. Indudablemente, una proteína tan grande como la apo B-100 es compatible con la existencia de múltiples alelos aún sin identificar. Las técnicas de la biología molecular permitirán determinar la importancia de dichos mutantes en cuanto a la patogénesis de la hipercolesterolemia.

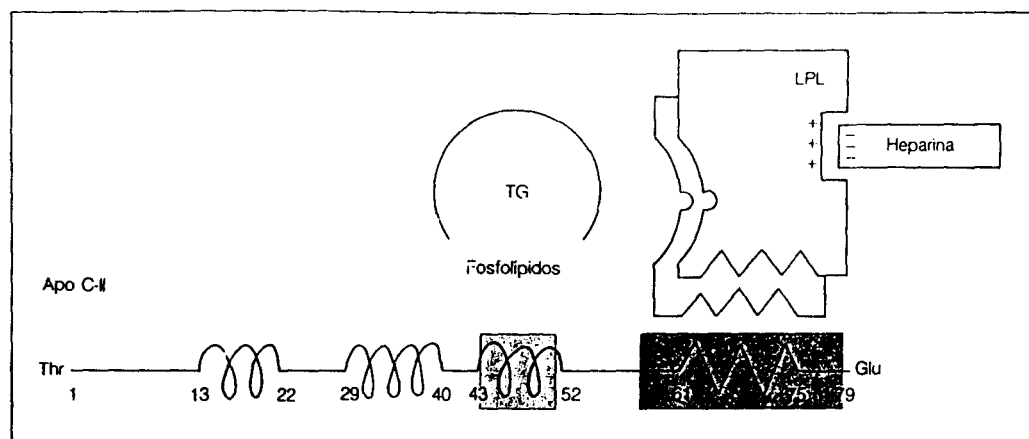
### Apoproteína C

Existen tres polipéptidos de bajo peso molecular, denominados C-I, C-II y C-III, que se distribuyen ampliamente entre las diferentes lipoproteínas, especialmente en las VLDL y quilomicrones y en las HDL. Están sujetas a un fuerte dinamismo de transferencia de unas a otras lipoproteínas, y así, durante el ayuno predominan en las HDL, mientras que en el período absorptivo se trasladan en parte hacia los quilomicrones.

Todas ellas se sintetizan en el intestino, pero preferentemente lo hacen en el hígado y lo hacen con un péptido señal que es escindido intracelularmente como en el caso de las apo A-I y A-II.

La apo C-I es minoritaria entre las apoproteínas (alrededor de 6 mg/dL), siendo también la más pequeña, con 57 aminoácidos y un peso molecular de 6.550 D. Es la apoproteína más básica, con un pI superior a 7,5, no está glicosilada y contiene una alta proporción de estructura con hélice  $\alpha$  anfipática. No se conoce aún el papel funcional de esta apoproteína, aunque *in vitro* se ha observado que activa la LCAT e inhibe la lipoproteína-lipasa.

La apo C-II es segregada a la circulación en forma de pro-apo con una o dos moléculas de ácido siálico (son las apo C-II-1 y C-II-2, respectivamente). En el plasma pierden el ácido siálico (apo C-II-0) y, posteriormente, también un hexapéptido en la región N-terminal por acción de alguna proteasa sin identificar, para dar lugar a la apo C-II-1/2. Curiosamente, la forma minoritaria en el plasma es la madura, y la mayoritaria es la proapoproteína (apo C-II-0). Esta



**Figura 2.10.** Esquema de la estructura de la apo C-II. La línea helicoidal representa segmentos con estructura en hélice  $\alpha$  anfipática que interactúan con los fosfolípidos. La línea quebrada representa un segmento con estructura en lámina  $\beta$ , que interactúa con la lipoprotein-lipasa (LPL).

posee 70 aminoácidos y un peso molecular de 8.850 D. Su concentración en el plasma humano se sitúa en torno a 4 mg/dL. En su secuencia se reconocen dos regiones: una con estructura en hélice  $\alpha$  y otra en la región C-terminal con estructura en hoja plegada o  $\beta$ , que interactúa con la enzima lipoprotein-lipasa (LPL) (fig. 2.10). La apo C-II es el cofactor activador de dicha enzima y su deficiencia simula la deficiencia de lipoprotein-lipasa. La naturaleza de esta activación no se conoce con exactitud porque la modificación de las constantes cinéticas depende del tipo de sustrato. Por otra parte, y dado que la máxima activación de la lipoprotein-lipasa se consigue con cantidades muy pequeñas de apo C-II, la concentración de esta apoproteína en el plasma no debe ser limitante.

La apo C-III es la más abundante de estas apoproteínas (8-15 mg/dL), siendo un componente importante de las VLDL y HDL. Consta de 79 aminoácidos y suele encontrarse glicosilada, con 1 o 2 ácidos siálicos. Aun sin ácido siálico, su pI es bastante ácido: 5,02. En cuanto a su función, inhibe la interacción de la apo E con su receptor y, con ello, el aclaramiento de los quilomicrones remanentes por el hígado. Por otra parte, se conocía desde hace tiempo que *in vitro* inhibía también la acción de la LPL, propiedad que residía en su mitad C-terminal. En pacientes con deficiencia en apo C-III (por alteración en el *cluster* que incluye los genes para ésta y para la apo A-I), se ha observado que la hidrólisis de los triglicéridos de las VLDL es extremadamente rápida y que la incorporación de apo C-III *in vitro* a esas lipoproteínas la enlentece, aproximándola a la normal, lo

que sugiere que, efectivamente, la apo C-III puede modular *in vitro* la acción de la LPL, oponiéndose a la apo C-II<sup>16</sup>.

### Apoproteína D

La apo D (inicialmente denominada apo A-III) es una apoproteína minoritaria en los seres humanos (5-6 mg/dL). Se sintetiza en el hígado mayoritariamente y presenta un peso molecular de 32 kD. Se asocia principalmente a las HDL más densas (HDL<sub>3</sub> y lipoproteínas de muy alta densidad o VHDL), pero forma también complejos con la LCAT, de la cual fue difícil separar con los métodos de purificación habituales. Su función permanece por descifrar, aunque se ha propuesto que está relacionada con la LCAT.

### Apoproteína E

La apo E presenta una concentración en plasma relativamente baja (3-6 mg/dL), pero está presente en todas las clases de lipoproteínas a excepción de las LDL. Es una glicoproteína de 299 aminoácidos y 35 kD, que se sintetiza en el hígado y en diversos tejidos, pero escasamente en el intestino, por lo que la dotación de apo E de los quilomicrones procede por transferencia desde otras lipoproteínas. Se segrega al plasma altamente sializada y ahí pierde estos residuos, de manera que el 80 % de la apo E plasmática carece de ácido siálico. Es una proteína especialmente rica en restos Arg (de ahí que inicialmente se denominara *péptido rico en arginina*) y presenta un alto contenido de estructuras con hélice  $\alpha$ , princi-



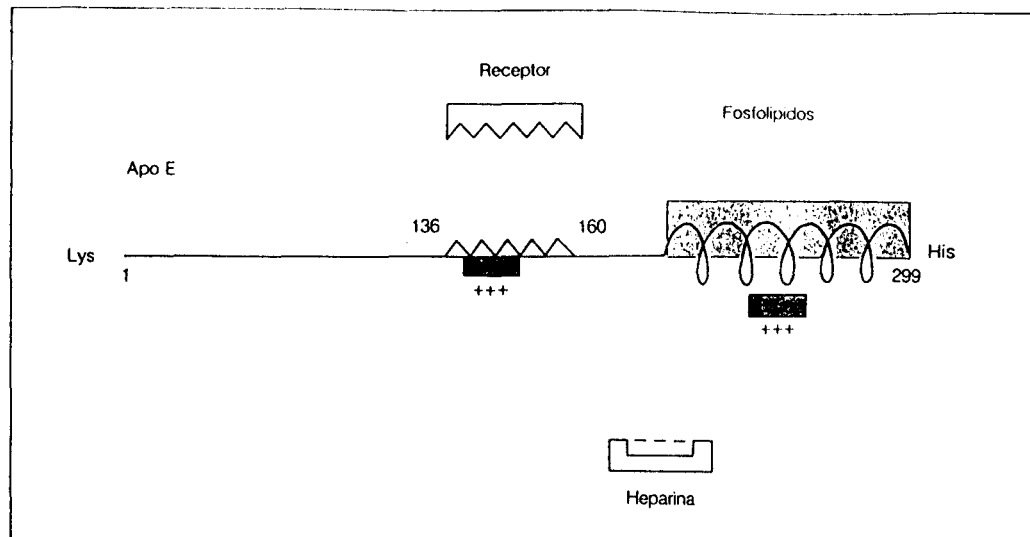


Figura 2.11. Esquema de la estructura de la apo E. La línea helicoidal representa la región con hélice  $\alpha$  anfipática que interactúa con los fosfolípidos. Las dos cajas oscuras indicadas con + representan los dos sitios de unión a la heparina, ricos en aminoácidos básicos. La región indicada con triángulos corresponde al sitio de unión al receptor E o B/E.

palmente en la región C-terminal, que interactúan con los fosfolípidos (fig. 2.11)

En el hombre existen varios alelos para la apo E, que codifican proteínas que varían entre sí en uno o más aminoácidos (tabla 2.8). En la mayoría de los casos su diferente pI permite su identificación mediante isoelectroenfoque. La isoforma más frecuente es la E-3, seguida de la E-4 y la E-2, respectivamente, lo que determina la existencia de seis fenotipos distintos. No obstante, hay que tener en cuenta que cada una de esas formas puede corresponder a más de una cadena polipeptídica, ya que su denominación hace referencia simplemente a su movilidad en

isoelectroenfoque. Éste es el caso, por ejemplo, de las diferentes E-3 y E-2 (tabla 2.8).

La apo E es un importante factor de reconocimiento, ya que es el ligando del denominado *receptor de remanentes* que se localiza en las células hepáticas<sup>17</sup>. Este receptor parece coincidir con la recientemente descubierta *proteína relacionada con el receptor LDL*. El dominio de reconocimiento de la apo E se localiza entre los residuos 140 y 150, siendo la secuencia: (140) His-Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg (150). En ella destaca la profusión de aminoácidos cargados positivamente, que son los que interactúan con otros del receptor cargados ne-

TABLA 2.8  
Variantes de apolipoproteína E en seres humanos

Isoforma	Carga relativa	Sustitución	Actividad receptor (%)	Frecuencia del alelo
E 3	0		100	0,76-0,77
E 4	+1	Cys <sub>112</sub> →Arg	100	0,12-0,15
E 2	-1	Arg <sub>158</sub> →Cys	< 2	} 0,8-0,13
E 2	-1	Arg <sub>145</sub> →Cys	45	
E 2	-1	Lys <sub>146</sub> →Gln	40	
E 3	0	Cys <sub>112</sub> →Arg	< 20	
E 3	0	Arg <sub>142</sub> →Cys		
		Ala <sub>99</sub> →Thr		
E 1	-2	Ala <sub>152</sub> →Pro	4	
		Gly <sub>127</sub> →Asp		
E Leiden	0	Arg <sub>158</sub> →Cys	(Baja)	
		(?)		

gativamente. Lo dicho no supone que otras regiones de la proteína no sean esenciales para la correcta función de la apo E, como lo demuestra el hecho de que la forma E-2 (que posee Cys en posición 158, en vez de Arg) no interactúa correctamente con el mencionado receptor.

La apo E también es reconocida por el receptor LDL, con mayor afinidad incluso que la propia apo B-100, debido a que cuatro moléculas de apo E pueden interactuar simultáneamente con una de receptor LDL, mientras que en el caso de la apo B-100 la estequiometría es de 1:1. Este receptor LDL reconoce la isoforma E-3 y también la E-4, pero no la E-2. Los estudios iniciales llevados a cabo con hepatocitos o sus membranas indicaron que el receptor de remanentes mostraba ese mismo patrón de especificidad hacia las isoformas de la apo E. Ello permitiría atribuir la acumulación de quilomicrones remanentes que se da en algunos individuos homocigotos para la E-2 a su falta de reconocimiento por ese receptor y consiguiente retraso en su aclaramiento. No obstante, a lo dicho hay que contraponerle el que la mencionada proteína relacionada con el receptor LDL reconoce con igual afinidad a todas esas isoformas<sup>18</sup>. De ser así, la hiperlipoproteinemia tipo III no se debería a la no interacción de la apo E-2 con ese receptor sino a alguna otra causa no determinada, lo cual precisamente explicaría el que sólo algunos (la minoría) de los individuos E-2/E-2 presenten dicha hiperlipemia. Evidentemente, todavía no pueden extraerse conclusiones definitivas sobre todos esos datos, ya que antes habrá que confirmar que esa proteína es verdaderamente el receptor de remanentes. Por encima de esa incertidumbre está demostrado que la apo E protagoniza el aclaramiento de los quilomicrones remanentes a través de su receptor específico y también participa, junto con la apo B-100, en el aclaramiento de las VLDL o IDL por el receptor LDL hepático. La patología humana confirma ese importante papel de la apo E a la vista de la acumulación de esas lipoproteínas que se da en los pacientes deficientes en esta apoproteína, los cuales, a su vez, presentan xantomas tuberoeruptivos y enfermedad cardiovascular prematura.

Aparte de lo anteriormente mencionado, a la apo E también se le han atribuido otros aspectos funcionales, como la captación por el hígado y glándulas esteroideogénicas de ciertas HDL que la llevan, la eliminación del colesterol por los macrófagos y, recientemente, el transporte de lípidos en el ámbito del tejido nervioso. A su vez, la apo E es capaz, *in vitro*, de activar la LCAT y de inhibir la lipoproteína lipasa. Finalmente, la apo E presenta una alta capacidad de unión a la heparina y otros glicosaminoglicanos, propiedad que podría tener alguna relevancia fisiológica, al permitir la unión de ciertas lipoproteínas a la

pared de los vasos, favoreciendo así la acción de las enzimas endoteliales.

### Apoproteína (a)

Constituye un componente esencial de la lipoproteína (a) o Lp (a), cuya relación con el riesgo de enfermedad cardiovascular ha despertado recientemente el interés por el conocimiento de su metabolismo. La apo (a) es un polipéptido que presenta un elevado polimorfismo en la especie humana, habiéndose descrito hasta 11 alelos que codifican proteínas con peso molecular que van desde 400 hasta más de 800 kD. Es una proteína que también se detecta en otras especies de mamíferos, especialmente en hibernantes. Se sintetiza en el hígado, y en la circulación aparece asociada a la apo B-100, formando un puente disulfuro con ella, y constituyendo la denominada lipoproteína (a) o Lp (a) (fig. 2.8). Esta lipoproteína posee características fisicoquímicas y antigénicas diferentes a las LDL (tabla 2.1). La Lp (a) se separa en el rango de densidades 1,05 a 1,11 g/mL, aproximadamente, que cabalga entre las LDL y las HDL<sub>2</sub>, lo que implica que en los individuos que presentan Lp (a), la fracción de HDL obtenida por ultracentrifugación está fuertemente contaminada por la Lp (a)<sup>19</sup>. Por otra parte, la Lp (a) está altamente glicosilada con ácido siálico y presenta movilidad pre-β en electroforesis zonal, por todo lo cual inicialmente se denominó «pre-β oculta». La concentración de Lp (a) es muy variable entre los individuos, habiendo quien carece prácticamente de ella y otros que superan los 1.000 mg/L (que equivalen aproximadamente a 33 mg de colesterol/dL), y se ha observado que su concentración está inversamente correlacionada con el peso molecular de la forma de apo (a) que se sintetice (tabla 2.6). Mientras que las LDL proceden del metabolismo de las VLDL/IDL, el origen de la Lp (a) es incierto y también la vía de eliminación del plasma, por cuanto interactúa deficitariamente con el receptor de LDL.

La molécula de apo (a) presenta una alta homología con el plasminógeno y, concretamente, posee una copia del *kringle-5* y numerosas del *kringle-4*. Esto confiere a la apo (a) la facultad de competir con el propio plasminógeno por la unión a sus aceptores celulares y, con ello, disminuir la producción de plasmina. Esta homología estructural también la capacita para enlazarse a la fibrina y al fibrinógeno. En definitiva, la Lp (a) puede llegar a ejercer una inhibición competitiva sobre la capacidad fibrinolítica del organismo, que podría significar una prolongación de la vida del trombo. Relacionado con ello están las repetidas observaciones clínicas que atribuyen a la Lp (a) la calidad de factor de riesgo de las enfermedades cardio y cerebrovasculares. A este respecto se

ha constatado que los niveles de Lp (a) son el mejor discriminante de la afectación coronaria entre los pacientes con hipercolesterolemia familiar, por encima de la apo B-100 y los niveles de LDL-colesterol. No obstante, muy recientemente se ha observado que la Lp (a) inhibe competitivamente la unión de la  $\alpha_2$ -antiplasmina a la plasmina, por lo que la Lp (a) podría favorecer la acción fibrinolítica de la plasmina<sup>20</sup>. Estas acciones tan dispares están despertando un enorme interés por el estudio de la Lp (a), para tratar de descifrar no sólo el detalle de su interrelación con el plasminógeno y la plasmina, sino su papel fisiológico (si tiene alguno), su metabolismo y las vías de control terapéutico.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Mills GL, Lane PA, Weech PK. A guidebook to lipoprotein technique. Amsterdam, Elsevier, 1984.
- Trezzi E, Calvi C, Roma P, Caiapano AL. Subfractions of human VLDL by heparin-Sepharose affinity chromatography. *J Lipid Res* 1983; 24: 790-795.
- Bradley WA, Hwang SLC, Karlin JB et al. Low-density lipoprotein receptor binding determinants switch from apo E to apo B during conversion of hypertriglyceridemic VLDL to lowdensity lipoproteins. *J Biol Chem* 1984; 259: 14.728-14.735.
- Lippel K, Gianturco S, Fogelman A et al. Lipoprotein heterogeneity workshop (Meeting summary). *Arteriosclerosis* 1987; 7: 315-323.
- Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1984; 25: 1.017-1.058.
- Lasunción MA, Iglesias A, Skottová N, Orozco E, Herrera E. High-density lipoprotein subpopulations as substrates for the transfer of cholesteryl esters to very-low-density lipoproteins. *Biochem J* 1990; 270: 441-449.
- Li WH, Tanimura M, Luo CC, Datta S, Chan L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res* 1988; 29: 245-272.
- Boguski MS, Brikenmeier EH, Elshourbagy NA, Taylor JM, Gordon JL. Evolution of the apolipoproteins. *J Biol Chem* 1986; 261: 6.398-6.407.
- Schitz G, Robenek H, Lohmann U, Assmann G. Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *EMBO J* 1985; 4: 613-622.
- Aviram M, Biernam EL, Oram JF. High density lipoprotein stimulates sterol translocation between intracellular and plasma membrane pools in human monocyte-derived macrophages. *J Lipid Res* 1989; 30: 65-76.
- Yui Y, Aoyama T, Morishita H et al. Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A-I (apo A-I). A novel function of apo A-I. *J Clin Invest* 1988; 82: 803-807.
- Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein apo C-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 1990; 265: 4.266-4.272.
- Powell LM, Wallis SC, Pease RJ et al. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-form B-48 in intestine. *Cell* 1987; 50: 831-840.
- Schneider WJ. The low density lipoprotein receptor. *Biochim Biophys Acta* 1989; 988: 303-317.
- Yang CY, Chen SH, Gianturco SH et al. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature* 1986; 323: 738-742.
- Ginsberg HN, Le NA, Goldberg IJ et al. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins C-III and A-I. Evidence that apolipoprotein C-III inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoprotein by lipoprotein lipase *in vivo*. *J Clin Invest* 1986; 78: 1.287-1.295.
- Hui DY, Innerarity TL, Mahley RW. Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolically distinct apo E and apo B, E receptors. *J Biol Chem* 1981; 256: 5.646-5.655.
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E binding protein. *Nature* 1989; 341: 162-164.
- Álvarez JJ, Lasunción MA, Olmos JM, Herrera E. Interferencia de la lipoproteína (a) en la cuantificación de las HDL mediante ultracentrifugación. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1991; 2: 146-152.
- Mao SJT, Tucci MA. Lipoprotein (a) enhances plasma clot lysis *in vitro*. *FEBS Lett* 1990; 276: 131-134.