

1. Descripció i funció de la lipoproteïna (a)

1.1. Descripció de la partícula

1.1.1. Descobriment

La lipoproteïna (a) [Lp(a)] fou descrita per primer cop per Karen Berg [Berg, 1963] en un estudi dissenyat per identificar variants antigèniques de les β -lipoproteïnes humanes. Enfrontant sèrums de diferents pacients a determinats antisèrums anti β -lipoproteïnes, Berg caracteritzà dos tipus de pacients, els que posseïen la variant antigènica que anomenà Lp(a) positiu i els que no o Lp(a) negatiu. Molt aviat demostrà que aquest caràcter s'heretava de forma autosòmica dominant.

Poc temps després diversos autors [Utermann i Wiegand, 1969; Harvie i Schultz, 1970; Ehnholm et al., 1971] evidenciaren que la Lp(a) era una partícula amb identitat pròpia i no pas una variant de les LDL.

Si bé va ser purificada i caracteritzada parcialment a principis dels anys 70, la seva complexitat va fer que fins la dècada següent no fos caracteritzada en la seva totalitat.

La Lp(a) però, no despertà cap interès clínic fins que passats uns anys, un estudi cas - control [Dahlen et al., 1976] provà que la freqüència de plasmes Lp(a)-positiu entre pacients amb infart de miocardi era més elevada que la del grup control. Més tard, altres autors [Kostner et al, 1980] utilitzant un assaig quantitatiu demostraren per primer cop una relació directa entre concentracions elevades de Lp(a) i malaltia cardiovascular.

Des de les hores, nombrosos estudis han ampliat els coneixements originals sobre aquesta partícula, donant resposta a moltes de les qüestions plantejades i obrint-ne de noves algunes de les quals queden encara per contestar.

La lipoproteïna (a) és una partícula molt heterogènia de mida. El seu interval de densitat és ampli i inclou el de les LDL i part de les HDL. [Fless et al, 1984].

Malgrat la seva semblança amb les LDL, algunes de les seves característiques físiques i bàsicament la seva composició proteica la diferencien clarament d'aquestes. En un 71 a

83% està formada per lípids neutres, majoritàriament ésters de colesterol, situats en el nucli de la partícula mentre la resta, entre un 17 i un 29%, el constitueixen proteïnes [Gaubatz et al., 1983], fortament glicades [Ehnholm et al., 1972], que recobreixen totalment el cor hidrofòbic de la partícula [Fless et al., 1985].

En general aquestes propietats fan difícil la seva separació de les altres lipoproteïnes únicament per criteris de densitat i per tant es combina la ultracentrifugació amb tècniques de cromatografia d'afinitat

La reducció química de la Lp(a) amb tiols, dona lloc a dos productes solubles en aigua que poden ser separats per ultracentrifugació [Fless et al., 1986], la designada com lipoproteïna (a-) [Lp (a-)] i l'apoproteïna (a) [apo(a)].

La Lp (a-) és similar a les LDL en la seva mobilitat electroforètica composició lipídica i pes molecular aparent. El seu únic component proteic és l'apoB-100 i s'uneix als receptors específics de LDL presents en fibroblasts humans sent degradada de forma similar a aquestes [Armstrong et al., 1985]. L'apoproteïna(a) per la seva part és el component que la diferencia de les LDL. En la taula 1 es comparen les principals propietats fisicoquímiques i la composició de la Lp(a), les LDL i de la Lp (a-).

1.1.2. L'apoproteïna (a) humana

Amb un pes molecular entre 300 i 800 kDa, l'apo(a) és una proteïna fortament glicada, el 28% del seu pes de mitjana són carbohidrats, [Fless et al., 1986] i molt heterogènia de mida [Utermann et al., 1987].

En la seva estructura secundària predomina el plegament a l'atzar, un 71%, mentre l'hèlix alfa constitueix un 8% i la beta plegada un 21%. [Gaubatz et al., 1987]. El plegament terciari és el responsable de la seva elevada viscositat intrínseca, $28.3 \text{ cm}^3/\text{g}$.

És altament soluble en aigua i malgrat el caràcter relativament hidròfob de la Lp (a-), fa extensiva aquesta propietat a la lipoproteïna de la que forma part.

La seva presència confereix a la Lp(a) una immunoreactivitat diferent de la de LDL [Zawadzki et al., 1988] a la que està unida de forma covalent mitjançant un pont disulfur [Utermann et al., 1983].

Taula 1 Propietats fisicoquímiques de la Lp(a) en comparació a les LDL i a la Lp(a-)

	LDL	Lp(a)	Lp (a-)
Propietats fisicoquímiques			
Massa molecular (Da)	$(2.9) \times 10^6$	$(3.8-4.0) \times 10^6$	$3.2-3.3 \times 10^6$
Diàmetre (nm)	25.9 ± 0.1	28.3 ± 0.5	26.1 ± 0.1
Densitat (g/l)	1019-1063	1006-1125	1028
Vida mitjana (dies)	2-3	3-4	--
Composició (%)			
Proteïnes	26-31	17-29	24
Colesterol lliure	9	6-9	9
Colesterol esterificat	40-43	35-46	40-41
Triglicèrids	4-6	4-8	5-6
Fosfolípids	20-22	17-24	20

(Adaptat de Lippi i Guidi, 2000)

Les anàlisis de pes molecular [Fless et al., 1997] i composició d'aminoàcids [Albers et al., 1996] assenyalen una relació molar 1:1 apo(a):apoB100 en la partícula sencera.

Alguns autors han descrit altres proteïnes com a components menors de la Lp(a) [Bard et al., 1996], suggerint la presència de subpoblacions d'aquesta lipoproteïna. No està demostrat però, si aquestes troballes corresponen a autèntiques subespècies de Lp(a) o a contaminacions derivades del procés d'aïllament.

La seqüència d'aminoàcids de l'apo(a) [McLean et al., 1987], exhibeix un alt grau d'homologia amb el plasminogen humà. La proteïna madura està formada per 11 dominis proteics diferents o *kringles* i un domini serin-proteasa. Els *kringles*, anomenats així per la seva semblança amb una típica galeta danesa, són estructures disposades en triple llaç estabilitzades per 3 ponts disulfur intracatenaris, comunes a diferents proteïnes del sistema fibrinolític i de la coagulació entre les que es troba el plasminogen [Magnusson et al., 1975].

En la figura 1 es mostra l'estructura d'un *kringle* estàndard i la seva inserció en l'estructura de l'apo(a).

L'apo(a) conté fins a 54 *kringles* que segons la seva homologia amb els del plasminogen es classifiquen com del tipus IV i V [Scanu et al., 1995]. Tots ells són presents en una sola còpia (tipus IV subtipus 1 a 10 i tipus V) [Guevara et al., 1992] excepte el *kringle* IV₂ que ho fa en múltiples còpies idèntiques condicionant la mida de la proteïna [Gaw et al., 1994] i influenciant en els nivells plasmàtics de Lp(a) [Kraft et al., 1992]. La seva homologia amb els *kringles* del plasminogen oscil·la entre el 61-95%, i tots excepte KIV₁, KIV₂ i KV tenen el mateix número d'aminoàcids.

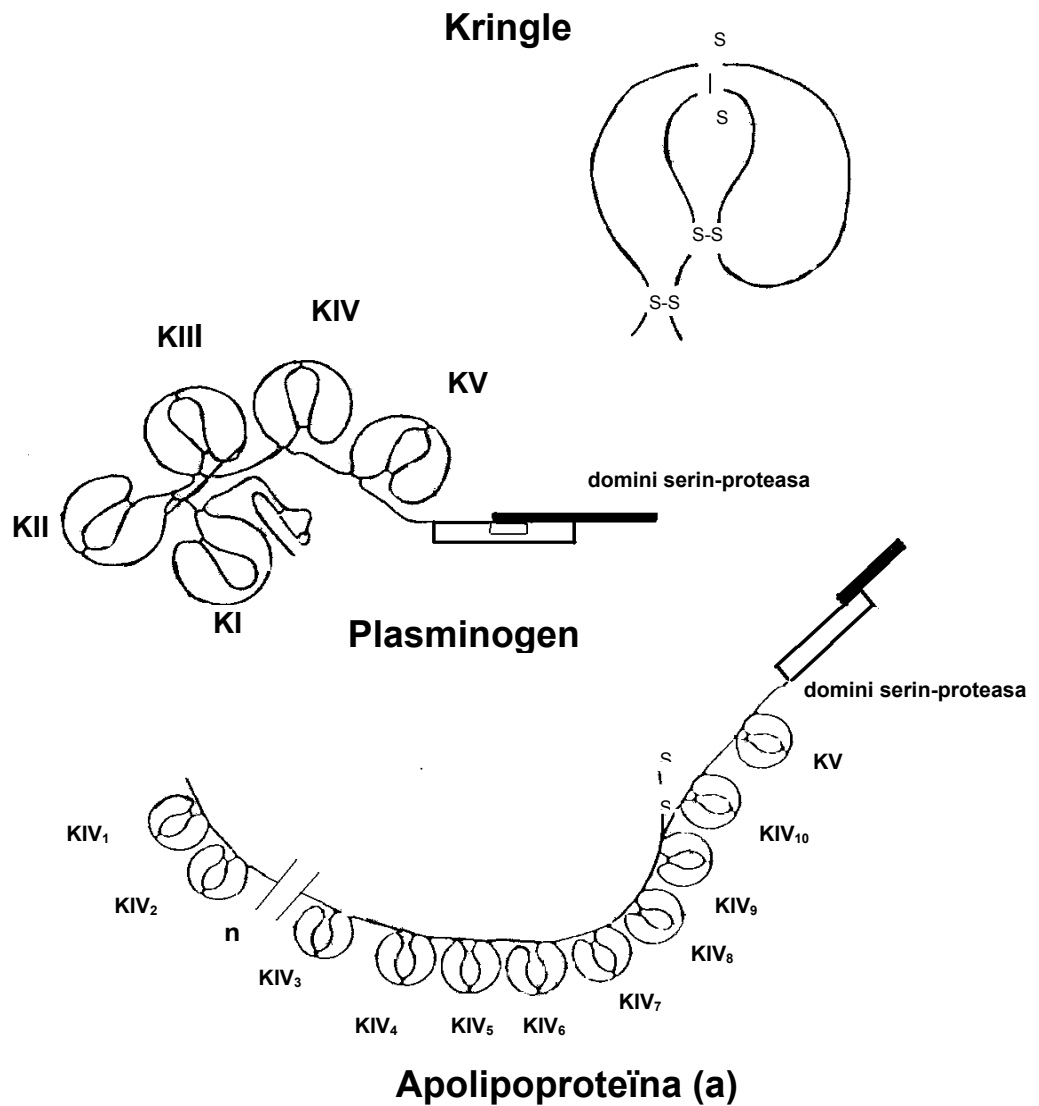
Els *kringles* de l'apo(a) s'uneixen a través de regions connectores la funció de les quals és encara desconeguda. És probable però que influencien en la flexibilitat dels dominis proteics i indirectament tinguin a veure amb l'activitat global de l'apo(a). Tots els connectors que uneixen els KIV₂ repetits tenen el mateix número d'aminoàcids mentre que aquells que es troben entre *kringles* no idèntics difereixen en mida i composició.

El *kringle* IV-9 posseeix a més un residu de cisteïna desaparellat que estableix un pont disulfur amb una altra cisteïna de l'apoB-100 en la Lp(a) [Koschinsky et al., 1993].

El domini carboxi-terminal de l'apo(a) exhibeix un alt grau d'homologia amb la regió serin-proteasa del plasminogen. Aquesta regió conté la tríada catalítica His⁴³⁵⁰-Asp⁴³⁹³-Ser⁴⁴⁸¹ (numeració basada en McLean et al), però una mutació en la seva seqüència d'activació (Arg-Val) impedeix que esdevingui funcional. En la figura 2 es representen les similituds entre l'apo(a) i el plasminogen

El carbohidrats, amb un 28% aproximadament del seu pes, es distribueixen en una relació molar de 3 : 7 : 5 : 4 : 7 (manosa: galactosa: galactosamina: glucosamina: àcid siàlic) [Fless et al., 1986]. L'existència de *kringles* diferents suggereix que l'apo(a) pot exhibir diferències en el seu contingut i composició en carbohidrats entre les diverses isoformes de mida. Aquesta heterogeneïtat pot relacionar-se amb el nombre de llocs susceptibles de glicosilació al llarg de la cadena polipeptídica, amb la longitud de la cadena d'oligosacàrids, amb l'existència de ramificacions o amb la combinació d'aquestes tres possibilitats.

Figura 1 Esquema d'un *kringle* i la seva disposició en el plasminogen i l'apoproteïna(a)



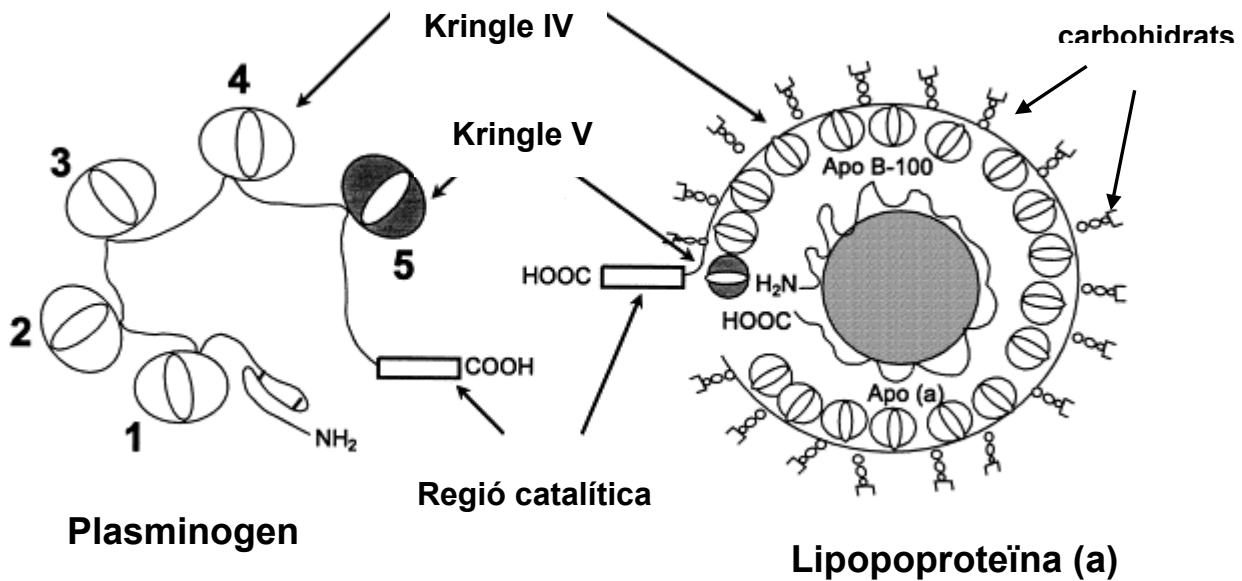
(Adaptat de Martínez Triguero et al.1993)

1.1.3. Localització cromosòmica

L'apo(a) és membre d'una superfamília de serin-proteases que actuen com la tripsina [Ichinose, 1992].

El gen de l'apo(a) es localitza en el braç llarg del cromosoma 6 en la posició q26-q27 [Frank et al., 1988], pròxim al gen del plasminogen, [Weikamp et al., 1988].

Figura 2 Semblança estructural entre l'apo (a) i el plasminogen



Adaptat de de la Peña et al., 2000

Actualment se sap que el gen de l'apo(a) és part d'un grup de com a mínim 5 gens: plasminogen, factors de creixement hepàtic I i II i un segon pseudogen d'apo(a), amb més d'un 70% d'identitat de seqüència [Magnaghi et al., 1994]. El gen de l'apo(a) i el plasminogen estan organitzats cap amb cap separats per al voltant de 40 Kb.

La seqüència no transcrita i el senyal de l'extrem 5' del gen comparteixen una homologia d'un 98% i un 100% respectivament amb les del gen del plasminogen [Mc Lean et al., 1987], més enllà, les seqüències dels dos cDNA divergeixen.

La regió codificadora per un *kringle* IV, consta de 2 exons de 162 pb (exó 1) i 180 pb (exó 2), separats per un intró de 4.2 Kb (intró 1). Un segon intró de 1.4 Kb es localitza entre l'extrem 3' de l'exó 2 i l'extrem 5' del següent exó [Kraft et al., 1992].

1.1.4. Evolució

L'existència de la Lp(a) i de l'apo(a) està restringida als primats del vell continent, mones, goril·les i ximpanzés i als humans. [Lawn et al., 1995] i també a l'eriçó que produeix una proteïna semblant a l'apo(a) constituïda per moltes còpies repetides del *kringle* III del plasminogen però sense el domini serin-proteasa.

La comparació de les seqüències de DNA i l'anàlisi filogenètic indica que l'apo(a) humana, es formà a partir d'un duplicat del gen del plasminogen durant l'evolució més recent dels primats. En contrast, el *kringle* III de l'eriçó, ho va fer a partir d'una duplicació diferent del mateix gen fa aproximadament 90 milions d'anys quan l'eriçó primitiu es va separar de la resta de mamífers amb placenta. [Lawn et al., 1997].

Es proposa que el gen del plasminogen ha estat reestructurat dues vegades de forma independent produint dues formes similars d'apo(a) en dos grups d'espècies tant divergents. Posteriorment, ambdós gens haurien evolucionat independentment per duplicacions i modificació de diferents dominis del plasminogen donant lloc a una nova forma de convergència evolutiva molecular.

1.1.5. Isoformes

El polimorfisme de mida de la proteïna fou descrit per primer cop per Utermann [Utermann et al., 1987] quan aconseguí separar i identificar sis isoformes d'apo (a) en una electroforesi en gel de poliacrilamida desnaturalitzant. Les sis isoformes de les que es determinà un pes molecular d'entre 400 i 800 kDa, es varen nomenar d'acord a la seva mobilitat electroforètica relativa respecte l'apoB100 (\approx 520 kDa.).

- F (*faster*) amb una mobilitat superior a l'apoB100
- B amb mobilitat semblant a l'apoB100
- S (*slower*) amb una mobilitat inferior a l'apoB100, distingint en aquest cas quatre isoformes amb diferents mobilitats, S₁ a S₄

Tots els individus estudiats, presenten com a màxim dues isoformes diferents en el plasma [Kraft et al., 1992], però en un nombre considerable, el 49%, no es detecta cap isoforma. Aquests individus varen ser catalogats com a portadors de l'al·lel nul.

Els estudis familiars suggeriren ben aviat una herència autosòmica codominant de les isoformes controlada per un seguit d'al·lels autosòmics (Lp^F , Lp^B , Lp^{s1} , Lp^{s2} , Lp^{s3} , Lp^{s4}) i un locus simple. Un setè al·lel Lp^0 o al·lel nul, va ser introduït per explicar els pacients que no expressaven cap isoforma [Utermann et al., 1988].

D'acord amb aquest model, les persones amb dues isoformes d'apo(a) són heterozigotes per aquest caràcter mentre que les persones amb una sola isoforma o bé són homozigotes o heterozigotes amb un dels dos al·lels nul.

La introducció de l'electroforesi desnaturalitzant en gel d'agarosa ha permès incrementar sensiblement la detecció d'isoformes d'apo(a) en plasma i en l'actualitat se'n descriuen més de 30 de diferents. Paral·lelament, ha augmentat el percentatge d'individus classificats com heterozigots que en els estudis actuals se situa al voltant del 80% [Marcovina et al., 1993], mentre en tots ells es detecta com a mínim una isoforma.

La distància de migració s'ha relacionat directament amb el nombre de repeticions del *kringle IV*₂ i per tant amb la mida de la proteïna [Marcovina et al., 1996].

En contrast amb els estudis inicials, les freqüències de les isoformes, és troben en equilibri de *Hardy-Weinberg*. El desequilibri dels estudis inicials, reflectia la incapacitat tècnica per detectar algunes isoformes que en certes races es donen amb relativa freqüència, però a baixa concentració.

1.1.6. Polimorfismes genètics

El gen de l'apo(a) presenta polimorfisme de mida. Aquest polimorfisme guarda una relació directa amb la mida de la proteïna que codifica [Lindahl et al., Koschinsky et al., 1990].

Estudis en famílies han revelat una herència codominant per aquest caràcter i han demostrat la cosegregació d'aquest polimorfisme amb el de mida de la proteïna.

L'evidència més directa d'aquesta relació la donen els estudis de restricció del DNA genòmic amb l'enzim KpnI. La digestió del DNA genòmic amb aquest enzim conserva sencer el nombre de repeticions del *kringle* IV₂ [Lackner et al., 1991], demostrant que la mida de la proteïna es relaciona amb el nombre de repeticions del KIV del gen. Aquesta metodologia ha estat aplicada pel nostre grup en l'estudi del polimorfisme de mida del gen a les nostres mostres.

Malgrat la bona correlació entre les tècniques de determinació del fenotip i genotip (s'ha descrit una excel·lent relació lineal entre el logaritme del número de *kringles* i la distància a la que migra l'isoforma en un gel d'agarosa), les diferències en la sensibilitat de la determinació d'un o altre han estat evidents [Valenti et al, 1997], àdhuc emprant tècniques d'alta resolució [Aveynier et al, 1998]. En la població de raça blanca aplicant tècniques estàndards per la determinació del fenotip d'apo(a), no es detecten al voltant del 30% dels al·lels raó per la que s'obté una freqüència elevada d'individus homozigots. Per tant alhora d'abordar l'estudi d'aquesta lipoproteïna és necessari avaluar els avantatges i inconvenients que presenta cadascuna de les tècniques.

1.2. Funció de la Lipoproteïna (a)

No es coneix però es distingeixen algunes relacionades amb la seva similitud estructural i funcional amb el plasminogen.

1.2.1. Funció LBS

El plasminogen mitjançant els seus dominis o *kringles* té la capacitat de reconèixer lisines, principalment residus de lisina carboxi-terminal. Les regions dels *kringle* que intervenen en aquesta unió s'anomenen LBS (*Lisylne Binding Site*) i la propietat que li confereixen, funció LBS.

La funció LBS és responsable de la unió del plasminogen a la lisina-Sefarosa i el que és més important, de la unió del plasminogen i la plasmina a substrats com la fibrina, a inhibidors i a receptors cel·lulars. La funció LBS del plasminogen pot ser inhibida per la mateixa lisina i els seus anàlegs com l'àcid ϵ -aminocaproic (ϵ AAC) i l'àcid tranexàmic [Mc Cance et al., 1994] i no és una propietat exclusiva d'aquesta proteïna, doncs altres proteïnes

de coagulació i la fibrinolisi com la protrombina, el factor XII, la urokinasa, i l'activador tissular del plasminogen (tPA), també l'exhibeixen.

L'estructura de la regió LBS es conserva relativament intacta en la majoria de proteïnes amb aquesta funció [Tulinsky et al., 1988]. Els estudis de ressonància magnètica i de minimització d'energia la descriuen com una superfície dipolar separada per una regió hidrofòbica de residus aromàtics.

Dels cinc *kringles* del plasminogen el *kringle* I és el que té més afinitat per la fibrina mentre els *kringle* II i III són llocs de poca o dèbil afinitat i el *kringle* IV d'una afinitat intermèdia. En el KIV set aminoàcids, dos d'aniònics (Asp⁵⁵ Asp⁵⁷), dos catiònics (Lys³⁵ Arg⁷¹) i tres d'apolars (Trp⁶² Phe⁶⁴ i Trp⁷²) formen la regió LBS i són els responsables de la unió de la plasmina als residus de lisina.

A l'igual que el plasminogen, la Lp(a) s'uneix a la lisina-Sefarosa, i també ho fa a la matriu extracel·lular, a proteïnes de la matriu i a varis tipus de cèl·lules, incloent hepatòcits, monòcits i cèl·lules endotelials. Aquesta interacció també pot ser inhibida al menys en part per lisina i els seus anàlegs.

Tenint en compte la similitud entre l'apo(a) i el plasminogen és de suposar que un o més del KIV de l'apo(a) estiguin implicats en aquesta unió. Els estudis d'afinitat de fragments obtinguts en el trencament proteolític de la Lp(a) han determinat que en la interacció hi intervenen seqüències localitzades en l'extrem carboxi-terminal que compren del *kringles* KIV₃ al domini serin-proteasa [Huby et al. , 1995].

De tots els *kringle* IV de l'apo(a) humana, el que conserva millor els aminoàcids claus de la funció LBS del plasminogen és el KIV₁₀ que té sis dels set aminoàcids i el setè en la posició 35 amb un canvi conservatiu lisina per arginina. En base a la seva seqüència als altres *kringles* de l'apo(a) se'ls calcula o bé una afinitat menor o nul·la.

Per tant, des dels inicis de la caracterització de la funció LBS en la Lp(a) tots els esforços s'han centrat en la investigació d'aquest *kringle*.

De forma natural la Lp(a) de la mona rhesus presenta una pèrdua important d'afinitat a lisina-Sefarosa i a cultius de monòcits quan es compara amb la Lp(a) humana. La seqüència d'aminoàcids del *kringle* IV₁₀ de la seva apo(a) mostra una substitució Trp → Arg

en l'aminoàcid 72 considerat clau per aquesta funció [Scanu et al., 1993]. El canvi d'aminoàcids sembla ser la causa principal de la pèrdua de funció LBS de l'apo(a) en el primat. Aquesta hipòtesi es veu reforçada pel fet que en la lesió ateromatosa de primats amb concentracions plasmàtiques elevades de Lp(a), aquesta lipoproteïna no es detecta conjuntament amb les restes de fibrina [Kusumi et al, 1993].

El fragment del gen d'apo(a) corresponent al KIV₁₀ ha estat clonat a partir del cDNA hepàtic i expressat en *E. coli*. Aquest procés ha permès l'obtenció de quantitats suficients de *kringle* funcional per ser utilitzats en la caracterització de les seves propietats físiques, l'anàlisi de la constant de dissociació en front de diversos anàlegs de lisina i la capacitat d'unir-se a fibrinogen tractat amb plasmina i de prevenir la unió de la Lp(a) al fibrinogen [LoGrasso et al., 1994]. Els resultats indiquen que el KIV₁₀ contribueix de forma decisiva a la interacció de l'apo(a) i el plasminogen.

La substitució de dos dels residus aniònics claus de la funció LBS del KIV₁₀, Arg^{55 i 57} per Ala dona lloc a una proteïna recombinant [r-apo(a)] que expressada en un cultiu cel·lular és capaç de retenir tant sols un 30% de la capacitat LBS de la proteïna salvatge [Boonmark i Lawn, 1997]. En aquest estudi es troben també diferències significatives en la deposició d'apo(a) en la paret dels vasos entre els ratolins transgènics que expressen la proteïna recombinant mutada o els que expressen la salvatge, suggerint una correlació entre la pèrdua d'afinitat per la lisina i la capacitat de deposició d'apo(a) en les lesions ateromatoses i corroborant els resultats dels estudis anteriors.

Un segon lloc d'interacció de Lp(a) amb substrats biològics ha estat descrit entre els *kringles* IV₅ i IV₈. Aquesta segona regió (LBS II) presenta una afinitat per la lisina més dèbil i és la responsable de la interacció no covalent entre l'apo(a) i l'apoB100. En el context de la partícula sencera, la LBS II està emmascarada per la unió covalent entre ambdues proteïnes. [Ernst et al., 1995]. Emprant tècniques suaus de separació de l'apo(a) i l'apoB100, s'ha demostrat que en l'apo(a) lliure el LBS II és el responsable de la unió de la proteïna al fibrinogen modificat per la plasmina i compta també per la interacció amb la lisina immobilitzada encara que com s'ha dit anteriorment, amb menys eficiència que el LBS del KIV₁₀ [Klezovitch et al., 1996]. Els autors postulen que la mesura amb la que aquesta segona funció LBS queda impedita per la unió covalent amb l'apoB100 i amb les LDL determina la intensitat de la unió de l'apo(a) al fibrinogen modificat per la plasmina.

En la figura 3 es representa esquemàticament la Lp(a) i s'assenyalen els *kringles* responsables de la funció LBS

Recentment, la descripció de la primera estructura cristal·logràfica d'un dels *kringles* amb funció LBS II, el KIV₇ [Ye et al., 2001] ha ajudat a entendre millor les diferències de capacitat entre ambdues funcions LBS. En el KIV₇, on l'afinitat es 10 cops més dèbil que la mostrada pel KIV₁₀ [Rahman et al., 2001], la presència d'una tirosina en la posició 62 juntament amb la d'arginina en la posició 35 facilita la formació d'una xarxa de ponts d'hidrogen i interaccions electrostàtiques entre els aminoàcids de la LBS (Arg³⁵, Tyr⁶² i Asp⁵⁴) i un residu perifèric Tyr⁴⁰. Aquesta interacció restreny la flexibilitat de la funció LBS del *kringle* reduint l'adaptabilitat de la lisina i els seus anàlegs. A més produeix una obstaculització estèrica que elimina les interaccions necessàries per l'estabilització dels lligants. Aquests subtils però crítics canvis semblen ser els responsables de les diferències d'afinitat entre ambdós *kringles*.

Malgrat tot, les bases moleculars que regeixen la unió de la Lp(a) a la fibrina i la contribució de cada *kringle* a la funció LBS i a la unió al fibrinogen són encara lluny de desxifrar-se en la seva totalitat.

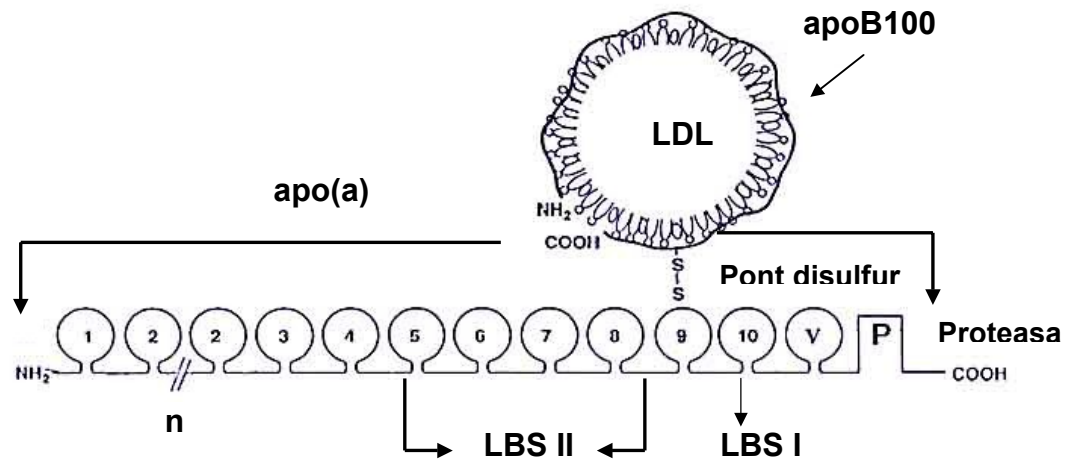
En un estudi recent) [Rahman et al., 2001] s'ha intentat caracteritzar per separat l'afinitat dels diferents *kringles* IV de l'apo(a) amb el fibrinogen i determinar la contribució d'aquests a la interacció global al temps que s'examinava la seva capacitat de contribuir a l'efecte antifibrinolític de l'apo(a).

Utilitzant un sistema d'expressió en bacteris s'ha purificat els *kringles* d'apo(a) : KIV₂, KIV₇, KIV₉ Δ Cys (al que li manca la cisteïna lliure) i KIV₁₀, i s'han generat tres mutacions de KIV₁₀ dues corresponents al residu Trp⁷⁰ que juga un paper important en l'estabilització de lligants (KIV₁₀ Trp⁷⁰ → Arg, KIV₁₀ Trp⁷⁰ → Phe) i un altre corresponent al residu Arg³⁵ l'únic residu d'aminoàcid de la LBS no idèntic al KIV del plasminogen (KIV₁₀ Arg³⁵ → Lys).

Aquests estudis han demostrat que KIV₇ i KIV₁₀ tenen regions sensibles a la lisina i a la prolina capaces de fer de mitjanceres en la unió de la Lp(a) al fibrinogen modificat per la plasmina, mentre KIV₂ i KIV₉ tenen poca o nul·la afinitat. Els mutants de KIV₁₀ conserven la funció LBS segons el tipus de mutació i aquesta es correlaciona amb la seva capacitat per unir-se al fibrinogen, Mentre amb el canvi Trp⁷⁰ → Arg s'elimina tant la capacitat d'unir-se a

lisina com a fibrinogen, el canvi conservatiu de Trp⁷⁰ → Phe així com Arg³⁵ → Lys redueixen l'habilitat sense anul·lar-la. És important destacar, però que malgrat la seva capacitat per interaccionar amb el fibrinogen, ni KIV₇ ni els mutants de KIV₁₀ tenen cap efecte observable en la fibrinolisi *in vitro*.

Figura 3 Esquema dels *kringles* responsables de la funció LBS



(Adaptat de Scanu, 1999)

La funció LBS de la Lp(a) varia en la població [Armstrong et al., 1990]. Aquesta variabilitat és deguda en part al polimorfisme de KIV₁₀ però alhora és conseqüència d'altres factors estructurals també heterogenis entre els que es troba la composició lipídica i glucídica. Segons aquesta propietat, la Lp(a) plasmàtica es pot fraccionar en espècies que s'uneixen (Lp[a]-Lys⁺) o que fallen en aquesta propietat (Lp[a]-Lys⁻). La proporció de cadascuna de les fraccions depèn de l'individu estudiat [Bas Leerink et al., 1992].

Una publicació recent ha qüestionat la fiabilitat dels resultats obtinguts en l'avaluació de la funció LBS *in vitro*. Els autors [Xia et al., 2000] han trobat que la purificació progressiva de la Lp(a) per diversos mètodes dona com a resultat un increment progressiu en la fracció Lp(a)-Lys⁺ i una disminució de la fracció Lp(a)-Lys⁻. Al mateix temps, l'addició de LDL o fibronectina purificada a Lp(a) purificada en una relació 1 molar redueix la fracció Lp(a)-Lys⁺ en un 34 i 20% respectivament mentre l'addició conjunta d'ambdues substàncies ho fa en un 45%. Aquests resultats podrien indicar que l'heterogeneïtat de la funció LBS no és una

característica intrínseca de la lipoproteïna si no més aviat el resultat en gran part de la seva habilitat per associar-se de forma no covalent a d'altres components abundants en el plasma com ara les LDL i la fibronectina. Aquesta interacció podria emascarar la zona LBS del *kringle* KIV₁₀ de l'apo(a) que actua de mitjancera en la unió. De confirmar-se, aquesta característica haurà de ser avaluada en els treballs que es realitzin en un futur

El poder aterotrombòtic de la Lp(a) ha estat sovint relacionada amb la seva capacitat per interferir en els processos de la fibrinolisi però també, amb altres processos que impliquen la interacció de la partícula amb cèl·lules, receptors, i substàncies de la matriu extracel·lular. Alguns d'aquests processos faciliten la deposició de colesterol com a primer pas en el mecanisme de formació de la placa d'ateroma. Tots ells, tenen en comú que probablement s'hi troba implicada la funció LBS com a mecanisme d'interacció. Aquesta és l'única funció que la Lp(a) no comparteix amb les LDL, .

La contribució de la funció LBS a la malaltia cardiovascular no ha estat suficientment estudiada, probablement per la dificultat dels mètodes cromatogràfics tradicionals per caracteritzar-la. El desenvolupament d'un immunoassaig [Hoover-Plow et al., 1996] per avaluar la funció LBS va permetre al nostre grup quantificar aquesta funció en pacients amb infart prematur i relacionar-la amb altres característiques de l'apo(a), concentració i polimorfisme de mida assenyalades com a contributives de capacitat aterotrombòtica en la lipoproteïna (a). L'afinitat de l'anticòs per la Lp(a), utilitzat en l'assaig es anul·lada totalment per la presència d'àcid epsilon-aminocaproic indicant la seva especificitat per la regió LBS de la proteïna.

1.2.2. Efecte de la Lipoproteïna (a) en el sistema fibrinolític

Com a resultat de l'activació del sistema fibrinolític, es genera plasmina. La plasmina desfà la fibrina dipositada en els vasos sanguinis per l'activitat homeostàtica. El seu precursor, el plasminogen, mitjançant la funció LBS dels seus *kringles* s'uneix a la malla de fibrina dirigint la unió del seu activador tissular (t PA). D'aquesta forma, la plasmina és generada en la secció interior del dipòsit de fibrina dissolent-la i exposant els residus de lisina carboxi-terminal per amplificar la resposta. Un cop la fibrina s'ha desintegrat, el mecanisme s'atura i l'endoteli vascular no allibera més tPA. Llavors la plasmina circulant romanent i el tPA són

inutilitzats pels seus corresponents inhibidors, l'alfa 2 antiplasmina i l'inhibidor de l'activador tissular del plasminogen (PAI-1).

La Lp(a) mitjançant la funció LBS té la capacitat de modular la fibrinolisi competint amb el plasminogen per la unió a la fibrina [Loscalzo et al, 1990]. Havent perdut la funció enzimàtica característica de la plasmina, la unió competitiva de la Lp(a) als residus de lisina de la fibrina actua a favor de l'acumulació de fibrina i lípids en la paret cel·lular. Els estudis *in vitro* sobre la naturalesa trombogènica de la Lp(a) suggereixen que l'afinitat de cada isoforma d'apo(a) per la fibrina, depèn en primer lloc de la mida de l'apo(a) i de forma secundària de la seva concentració plasmàtica, encara que totes dues estan relacionades [Hervio et al., 1993, 1996, Bas Leernik et al., 1994]. Un dels objectius del nostre grup ha estat estudiar la relació entre la mida de l'apoproteïna i la funció LBS avaluada de forma quantitativa. La caracterització de la mida de la proteïna mitjançant la determinació del genotip ens ha permès obviar els problemes de detecció que presenten les tècniques de determinació del fenotip que podrien interferir en els resultats obtinguts.

L'efecte que els canvis en les concentracions de Lp(a) tenen *in vivo* en l'activació del plasminogen s'ha investigat en la Síndrome Nefròtica [Soulat et al., 1999]. L'increment en la unió de la Lp(a) a fibrina observat durant els episodis d'aquesta Síndrome es relaciona directament amb la concentració de Lp(a) i inversament amb la de plasminogen. És de destacar que no es troba correlació amb altres paràmetres lipídics que també manifesten àmplies variacions en aquest període [Soulat et al., 2000].

La interacció de la Lp(a) amb el plasminogen s'estén al procés fibrinolític que té lloc a l'endoteli, el qual juga un paper crític en la regulació del procés trombòtic en virtut de la seva connexió superficial al sistema fibrinolític.

Les cèl·lules endotelials sintetitzen i segreguen tPA el qual pot unir-se com a mínim a dos llocs de la superfície cel·lular. Aquests llocs d'unió mantenen la seva activitat catalítica i el protegeixen del seu inhibidor fisiològic PAI-1. La unió del plasminogen als receptors cel·lulars s'associa amb un increment fins a 12 vegades en l'eficiència del tPA per generar plasmina. [Scott, 1989].

L'acoblament del plasminogen i tPA a les cèl·lules de l'endoteli és un dels mecanismes pel qual aquestes regulen la fibrinolisi. La Lp(a) interfereix en el procés inhibint la unió de Glu-

Plg als seus receptors impedit la formació de plasminogen i plasmina [Hajjar et al., 1989]. En la figura 4 es resumeix esquemàticament el sistema fibrinolític endotelial i la intervenció de la Lp(a) en el mateix.

La competència de la Lp(a) amb el plasminogen pels receptors cel·lulars, no es limita a les cèl·lules endotelials sinó que s'estén als receptors de cèl·lules monocítiques [Gonzalez-Gronow et al., 1989]. La interacció és dependent del temps, específica, saturable, independent de presència en el medi d'ions bivalents i sensible a la temperatura, característiques que també mostra la unió del plasminogen a les cèl·lules endotelials. L'afinitat d'ambdues partícules és similar però, la Lp(a) té aproximadament deu vegades menys punts d'unió que el plasminogen [Miles et al., 1995].

Un dels receptors cel·lulars de l'endoteli que participa en la interacció amb el plasminogen i la Lp(a), ha estat identificat. Consta de dos components, un d'ells és el receptor pròpiament dit i l'altre és una proteïna citoesquelètica, actina que juga un paper important en la localització i unió del plasminogen a la superfície de la cèl·lula [Dudani i Ganz, 1996]. Els estudis *in vitro* amb actina purificada han confirmat que el plasminogen s'hi uneix d'una forma saturable i amb relativa afinitat. Ensenms, ha estat demostrada la capacitat de la Lp(a) per unir-s'hi.

Per últim la reducció en la formació de plasmina es veu facilitada per un tercer mecanisme, la interacció de la Lp(a) amb el PAI.

El PAI-1 està considerat el regulador més important del sistema fibrinolític mitjançant la seva interacció amb els activadors del plasminogen entre els que es troba el tPA. La interacció entre la Lp(a) i el PAI-1 va ser descrita per primer cop fa una dècada [Etingin et al., 1991] quan es demostrà que en cultius de cèl·lules endotelials la Lp(a) era capaç d'incrementar l'activitat del PAI-1 sense alterar els nivells de tPA. La descripció dels polimorfismes genètics del PAI ha permès constatar que la Lp(a) exerceix un efecte potenciador sobre l'expressió de PAI i que aquest efecte és dependent del polimorfisme genètic d'aquesta proteïna [Li et al., 1997].

Coincidint amb la descripció de la regulació del PAI-1 per la Lp(a), s'ha descrit en monòcits una important inducció del RNA missatger de l'inhibidor de l'activador tissular del plasminogen tipus 2 (PAI-2) en pacients amb concentracions plasmàtiques elevades de

Lp(a) [Buechler et al, 2001]. Aquesta inducció sobre una de les formes polimòrfiques del PAI, condueix a l'increment dels nivells intracel·lulars i a la secreció de PAI-2 per aquestes cèl·lules.

1.2.3. Afinitat de la Lipoproteïna (a) pels components de la matriu extracel·lular

La matriu vascular extracel·lular està formada per una densa xarxa de proteïnes i proteoglicans [Wight, 1995]. Entre les proteïnes majoritàries de la matriu es troben: el col·lagen, la fibronectina, la laminina i la vitronectina. Els proteoglicans estan formats per cadenes de glicosaminoglicans amb fortes càrregues negatives unides covalentment a una proteïna situada en el nucli.

Els proteoglicans es diferencien per la seva proteïna i pel nombre, mida i seqüències de les cadenes monosacàrid dels glicosaminoglicans. Els glicosaminoglicans majoritaris de la matriu extracel·lular són l'heparan sulfat, condroitin sulfat i dermatan sulfat.

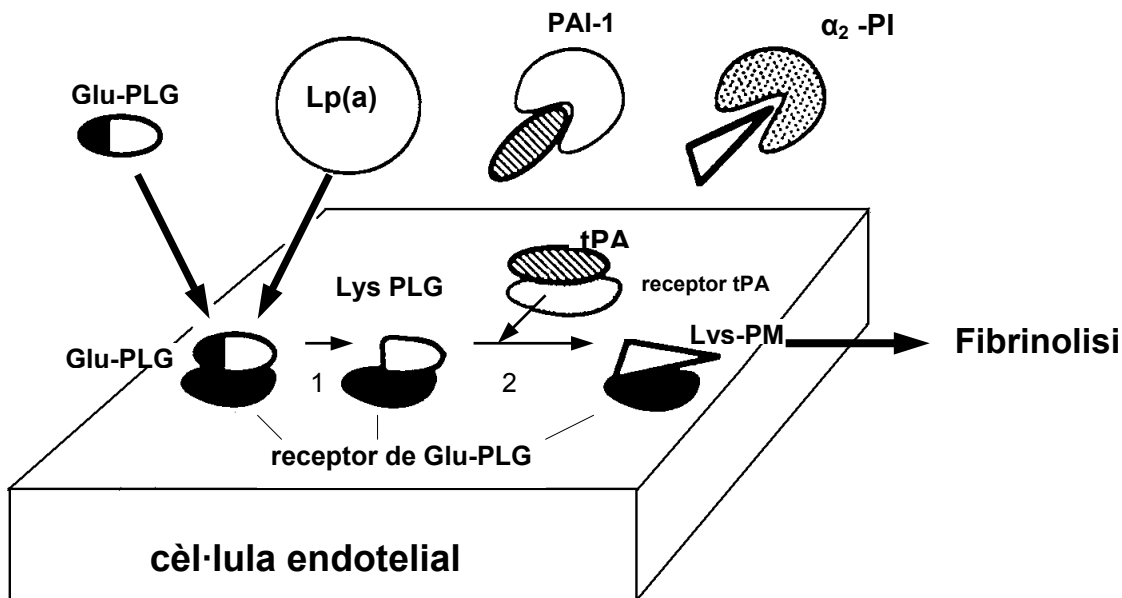
Les lipoproteïnes amb apoB100 poden interaccionar amb els proteoglicans. L'apoB100, conté en la seva superfície, seqüències carregades positivament que poden associar-se amb les fortes càrregues negatives dels proteoglicans de l'íntima [Hurt-Camejo et al., 1997] i contribuir d'aquesta forma al procés aterogènic.

L'afinitat de la Lp(a) pels glicosaminoglicans va ser suggerida per primer cop per Dahlen i els seus col·laboradors quan demostraren que la Lp(a) és capaç d'unir-se a columnes de Sefarosa amb glicosaminoglicans en presència de ions bivalents de calci independentment del tipus de glicosaminoglicà [Dahlen et al. , 1978]. Posteriorment altres autors [Bihari-Varga et al., 1988] confirmaren que la interacció de la Lp(a) amb els glicosaminoglicans de la paret arterial es feia a expenses l'apoB100, reduint la interacció de l'apo(a) a quasi testimonial.

La descripció de mètodes d'obtenció d'apo(a) que no danyen l'estructura de la proteïna i les noves possibilitats que ofereixen els estudis d'interacció amb fragments d'apo(a) generats enzimàticament [Edelstein et al., 1996], han proporcionat un nou punt de vista en la interacció de la Lp(a) amb les proteïnes i proteoglicans de la matriu extracel·lular de forma

que actualment es pot considerar que ambdues apolipoproteïnes, apoB100 i apo(a) hi són implicades.

Figura 4 Interacció de la Lp(a) en el sistema fibrinolític endotelial



Glu PLG: Plasminogen Glutàmic terminal (zimogen); Lys PLG: Plasminogen; Lys PM: Plasmina; α₂ PI: Inhibidor de la plasmina; PAI-1: Inhibidor de l'activador del plasminogen

1. Conversió de Glu-PLG a Lys PLG per la plasmina localitzada en la superfície de l'endoteli.
2. Activació del plasminogen pel tPA

(Adaptat de Scott, 1989)

La interacció entre l'apo(a) i els proteoglicans ha estat estudiada en la decorina, un proteoglicà format per una proteïna de 36 kDa i una sola cadena de glicosaminoglicans (dermatan sulfat). Aquest proteoglicà és sintetitzat a l'endoteli vascular i les cèl·lules musculars llises i es colocalitza amb el col·lagen tipus I en la lesió primària de la placa d'ateroma [Klezovitch et al., 1998].

L'apo(a) lliure s'uneix a la proteïna de la decorina però no al seu glicosaminoglicà. Aquesta unió es veu reduïda si es destrueix l'estructura dels seus *kringles* indicant que la seva conservació és un requeriment essencial per la unió. Els estudis d'afinitat dels fragments generats per l'elastasa han permès demostrar que la decorina s'uneix a l'extrem carboxi-

terminal de l'apo(a) si bé el fet que aquesta interacció no sigui alterada per compostos anàlegs de la lisina com l'EACA fa pensar que no hi intervé la funció LBS. En la unió s'impliquen tant interaccions electrostàtiques entre l'apoB100 i els glicosaminoglicans com hidrofòbiques entre l'apo(a) i la proteïna.

Les LDL i la Lp(a) semblen establir una interacció cooperativa en la matriu mitjançada en bona part pels glicosaminoglicans dels proteoglicans [Lundstam et al, 1999], segons aquesta hipòtesi, la interacció de la Lp(a) amb proteoglicans, del tipus condroitin sulfat incrementaria la unió de lipoproteïnes amb apoB100 a la matriu. Un cop unida a la matriu, la Lp(a) i en menor mesura les LDL, crearien nous llocs d'unió probablement per un procés d'autoagregació. Aquests resultats, han estat obtinguts en cultius de cèl·lules musculars llises que són probablement les que més contribueixen als components macromoleculars de la matriu de l'intima arterial i que estan fortament implicades en els processos aterogènics.

1.2.4. Afinitat de Lipoproteïna (a) / apolipoproteïna (a) per altres substàncies

L'interès per comprendre els mecanismes precisos pels quals les concentracions plasmàtiques elevades de Lp(a) incrementen el poder aterotrombòtic de la Lp(a) ha portat a alguns investigadors a la recerca de proteïnes que actuïn com a lligands de l'apo(a) i que puguin explicar les seves funcions fisiopatològiques. Entre aquestes s'ha descrit la β 2-glicoproteïna. Aquesta proteïna amb una seqüència única d'aminoàcids rica en prolina i cisteïna s'estructura en 5 mòduls repetits que es relacionen amb la superfamília de les proteïnes que controlen el complement. La seva interacció amb la Lp(a) *in vivo* podria estar mediatitzada per les repeticions del *kringle* KIV₂ pel *kringle* KIV₆ o per ambdós [Kochl et al., 1997]. Malauradament no se li ha assignat cap funció metabòlica concreta raó que dificulta explicar-ne la relació. S'ha suggerit que pot jugar un paper en el metabolisme dels triglicèrids. A més la β 2-glicoproteïna exhibeix propietats anticoagulants inhibint diferents processos com l'activació per contacte en la via intrínseca de la coagulació, l'agregació de les plaquetes dependent de l'ADP, i l'activitat protrombinasa de les plaquetes. Aquestes funcions podrien ser modulades per la interacció de la Lp(a) dotant a aquesta partícula d'un nou mecanisme d'interferència en el procés de la coagulació sanguínia

1.2.5. Mutacions en l'apoproteïna (a) associades a canvis en la seva funció

La recerca de mutacions en l'apo(a) relacionades amb canvis en la funció d'aquesta lipoproteïna ha donat de moment pocs resultats. La mutació Trp⁷² → Arg del *kringle* KIV₁₀ de l'apo(a) observada en la mona rhesus, responsable de la pèrdua de funció LBS en la Lp(a) d'aquests primats, ha estat descrita també en humans [Scanu et al., 1994] si bé afecta tant sols al 2% de la mostra estudiada. El seu significat biològic i patològic és incert. No obstant, donat el paper crític que aquest aminoàcid juga en la funció LBS bé podria ser la causa de pèrdua d'afinitat pel fibrinogen. Des del punt de vista de la malaltia cardiovascular, si es pogués extrapolar *in vivo* el concepte que per inhibir la conversió de plasminogen a plasmina és necessària la funció LBS del *kringle* IV₁₀ la mutació es podria considerar com a favorable.

El concepte de polimorfisme en la funció LBS de la Lp(a) s'ha ampliat amb la descripció d'un fenotip de "superafinitat". Trobat en el 4% d'una mostra d'individus de raça caucàsica (americans i mediterranis), la seva Lp(a) presenta una afinitat pel fibrinogen superior en tres a quatre vegades a la dels altres individus, similar a la que presenta l'apo(a) lliure en el grup control on la funció LBS II no es veu impedida per la unió de les LDL. [Scanu et al., 1997]. La incidència familiar d'aquest fenotip amb independència dels nivells plasmàtics de Lp(a), estat nutricional, edat, sexe o tipus de desordre lipídic, dóna suport al seu origen genètic. Si s'accepta que l'increment en l'afinitat pel fibrinogen d'aquests pacients es fa a expenses de la segona funció LBS (*kringles* KIV₅ a KIV₈) es pot especular que els pacients amb Lp(a) d'alta afinitat podrien presentar modificacions estructurals potser relacionades amb la composició lipídica de la partícula que els comportaria una apo(a) més exposada. Alternativament també es podria pensar en seqüències mutades en aquests *kringles*. En qualsevol cas, la identificació de Lp(a) d'alta afinitat afegeix un nou polimorfisme funcional que pot ser rellevant en la patologia cardiovascular.

Un darrer estudi ha descrit una mutació en el KIV₈ Pro¹² → Trp en el *kringle* IV₈, un dels constituents de l'anomenat segon domini d'unió a la lisina (LBS-II) [Prins et al., 1997]. Aquesta mutació que es dóna tant sols en el 2% d'una mostra de la població holandesa sembla incidir en l'afinitat de la Lp(a) amb el fibrinogen però no ha estat descrita en altres poblacions.

La importància de la funció LBS com a mitjancera de la interacció de la Lp(a) per la fibrina, receptors cel·lulars i substàncies de la matriu i la descripció de les mutacions esmentades

així com la ben caracteritzada substitució en els aminoàcids de la LBS de l'apo(a) de la mona rhesus, va encoratjar el nostre grup a cercar noves mutacions en la població mediterrània en el *kringle* IV₁₀ principal responsable de la funció LBS de la Lp(a).

1.2.6. Modificacions postranscripcionals associades a canvis en la seva funció

1.2.6.1. Processos oxidatius

Els estudis *in vitro*, han demostrat que la Lp(a) oxidada amb malonaldehid [Haberland et al., 1992] o coure [Naruszewicz et al., 1992] és captada de forma preferent pels receptors dels macròfegs. La Lp(a) oxidada amb coure injectada de forma intravenosa en rates, és ràpidament eliminada de la circulació sanguínia per un mecanisme de receptor *scavenger* [de Rijke et al., 1992]

Darrerament, ha estat desenvolupat un assaig d'enzimoinmunoanàlisi per mesurar el grau d'oxidació de la partícula gràcies a l'obtenció d'anticossos monoclonals que reconeixen un epítop de la Lp(a) modificada amb un tractament oxidatiu. D'aquesta forma ha estat possible demostrar la presència de Lp(a) modificada per estrès oxidatiu en sèrum humà i el seu augment en circulació en pacients hipertensos així com la presència de Lp(a) oxidada en lesions ateroscleròtiques en humans [Yamada et al., 2000].

1.2.6.2. Processos proteolítics

En el procés de la fibrinolisi s'acumulen leucòcits neutròfils que per un procés de lisi cel·lular o per secreció poden alliberar elastasa, la qual en un entorn plasmàtic és capaç de degradar la fibrina. La modificació de la Lp(a) per l'elastasa podria provocar canvis en la seva funció que modifiquin el seu poder aterotrombòtic.

L'elastasa pancreàtica [Edelstein et al., 1996] i leucocitària [Edelstein et al., 1997] són els dos primers bioenzims dels que s'ha demostrat una acció proteolítica sobre l'apo(a) que és independent de la mida de la proteïna.

Aquests enzims trenquen l'enllaç Ile³⁵²⁰ - Leu³⁵²¹ en la regió d'unió entre els *kringles* IV₄ i IV₅. Aquest tall genera dos fragments, un que representa el domini amino-terminal anomenat F1 i l'altre que representa el domini carboxi-terminal anomenat F2. Ambdós fragments exhibeixen un comportament metabòlic, estructural i funcional diferent. El fragment F₁ sembla ser funcionalment inert i la seva mida varia d'acord amb la mida de la isoforma de la que depèn. El fragment F₂, que comprèn de KIV₅ a la regió proteasa, té capacitat per unir-se a les columnes de lisina-Sefarosa, a la fibrina i a la fibronectina i si s'incuba amb LDL és capaç de formar una partícula anomenada mini Lp(a).

Els estudis metabòlics amb ratolins mostren que mentre els fragments F₁ injectats via intravenosa són ràpidament eliminats del plasma (T_{1/2} 2.9 hores), els F₂ tenen una vida més llarga (T_{1/2} 5 hores) i s'excreten en quantitats marcadament inferiors en orina.

La recerca d'enzims inflamatoris implicats en processos proteolítics de la Lp(a) ha portat a l'estudi de les metal·lo-proteinases, enzims metal·lo-dependents implicats en l'homeòstasi de la matriu extracel·lular que juguen un paper important en el procés ateroscleròtic [Galis et al., 1994].

Dins d'aquesta família la metal·lo-elastasa de macròfegs, també anomenada MMP-12 és un enzim secretat per macròfegs inflamatoris amb amplia activitat elastolítica sobre macromolècules de la matriu com ara la fibronectina, la laminina, la vitronectina i els proteoglicans., *In vitro*, la metal·lo-elastasa trenca l'apo(a) en l'enllaç entre Asn³⁵¹⁸ i Val³⁵¹⁹ situat al costat mateix, en direcció 5' del lloc de tall de l'elastasa de neutròfils (NE) [Edelstein et al., 1999].

La capacitat proteolítica *in vivo* de d'ambdós enzims sobre la Lp(a) ha estat estudiada amb dues soques de ratolí *knock out* per cadascun dels enzims (MMP-12^{-/-} i NE^{-/-}) [Edelstein et al., 1999]. La injecció d'apo(a) evidencia que la generació de fragments F₁ és controlada mitjançant l'activitat MMP-12 atorgant a aquest enzim un paper important en la fisiopatologia de la Lp(a).

Tots els animals injectats amb fragments F1 mostren en orina fragments de mida més petita suggerint que els fragments d'apo(a) són sotmesos a un segon trencament durant el trànsit renal mitjançant un mecanisme independent de NE i MMP-12.

L'alt grau d'homologia entre MMP-12 de ratolí i la humana [Shapiro et al., 1993] i el fet que en plasma humà es trobi espontàniament fragments de mida similar a aquells trobats en el plasma de ratolí al que s'ha injectat apo(a), fa que els autors d'aquest treball especulin sobre la possibilitat d'extrapolar els resultats obrint un nou camp en la investigació de l'acció de la Lp(a).

Altres dos enzims actius en la matriu extracel·lular, la col·lagenasa IV d'origen bacterià i la estreomelisin-1 (MMP-3) [Scanu, 1998] també són capaços de tallar l'apo(a) ja sigui en la seva forma lliure o unida a LDL. En cada cas, la seqüència de tall es localitza en el connector entre els *kringle* IV₄ i IV₅, encara que la posició de l'enllaç peptídic és diferent que la diana de l'elastasa pancreàtica o leucocitària. És interessant remarcar que en líquid sinovial del genoll de pacients amb artritis reumatoïda, s'ha trobat fragments d'apo(a) que segons l'anàlisi electroforètic presenten una mida comparable als generats *in vitro* per l'acció de l'elastasa leucocitària [Scanu, 1998].

1.2.6.3. Processos lipolítics

La fosfolipasa A₂ i l'esfingomielinasa, representen dues classes d'enzims que romanen actius en la paret de l'artèria. Ambdós han demostrat ser capaços de modificar, les LDL i la Lp(a) *in vitro*.

Les LDL modificada per fosfolipasa A₂ s'uneix amb més facilitat que les LDL nativa al proteoglicà, vesican [Hurt-Camejo et al, 1997]. Altrament la Lp(a) modificada per la fosfolipasa A₂ s'uneix a lisina amb més afinitat que la Lp(a) nativa, probablement perquè en el tractament es posa al descobert el LBS II de l'apo(a) [Hoover-Plow et al., 1998]

L'esfingomielinasa per altre part, promou la desestabilització i l'agregació de les LDL, procés que s'ha relacionat amb la patogènia d'aquesta partícula [Xu i Tabas, 1991]. No hi ha dades disponibles sobre si l'enzim exerceix el mateix efecte en la Lp(a). És important destacar però, que la digestió de Lp(a) amb esfingomielinasa no modifica la capacitat d'aquesta d'unir-se a la lisina [Hoover-Plow et al., 1998].

1.2.7. Funcions fisiològiques de la Lipoproteïna (a)

El paper fisiològic de la Lp(a) en els humans roman encara incert. De fet els individus amb concentracions plasmàtiques de Lipoproteïna (a) baixes o nul·les no presenten cap tipus de malaltia o síndrome de deficiència.

La integració de descobriments recents sobre l'estructura i metabolisme d'aquesta partícula lipoproteica ha permès formular algunes hipòtesis relacionades amb les avantatges evolutives que pot representar sintetitzar partícules com la Lp(a) [Lippi et al., 1998].

1.2.7.1. La Lipoproteïna (a) facilita la reparació dels teixits

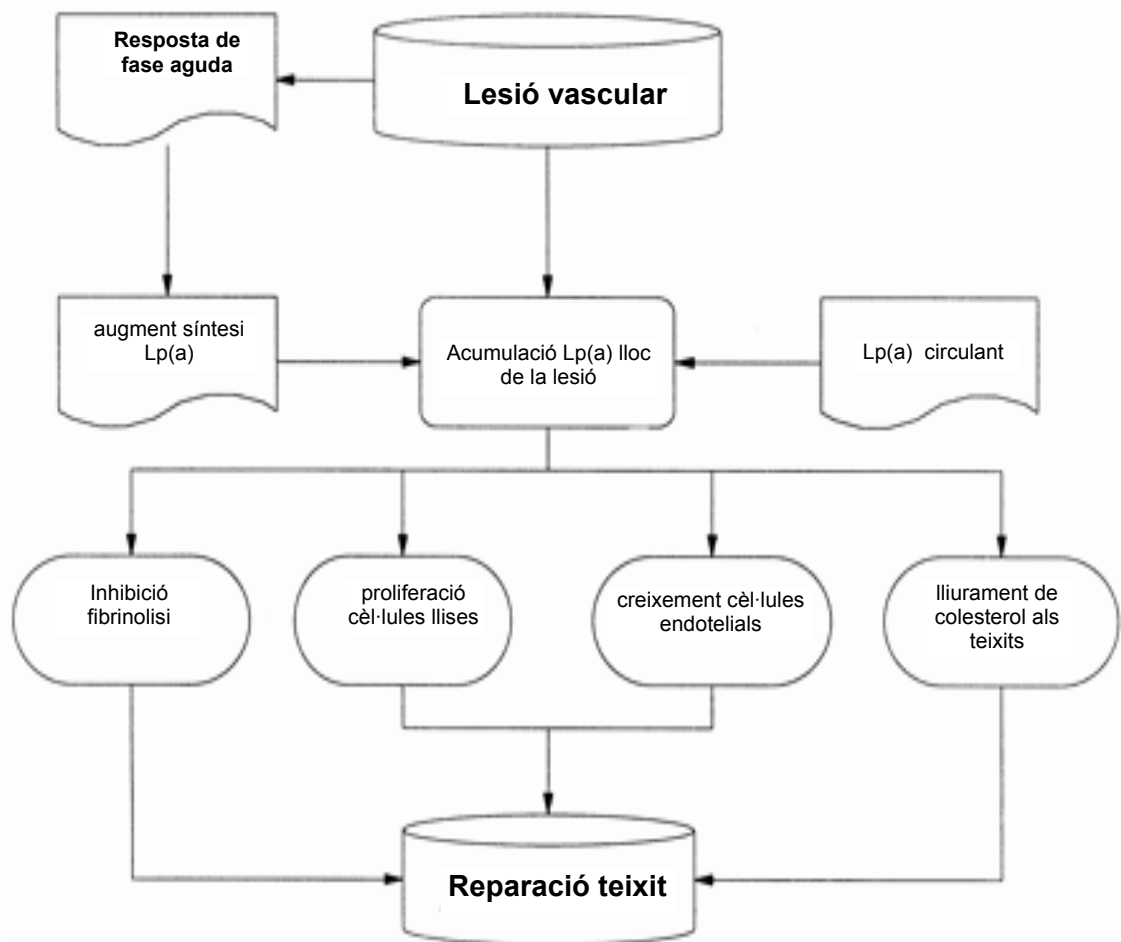
No és descabellat pensar que en el passat la Lp(a) hagi ofert avantatges evolutives als humans promovent o accelerant la cicatrització de les ferides i la reparació dels teixits danyats i les lesions vasculars. Aquesta hipòtesi es recolza en diverses evidències biològiques.

La Lp(a) es comporta com un reactant de fase aguda. [Lippi et al., 1998]. El gen de l'apo(a) conté diverses seqüències que responen a l'acció de la Interleukina-6 (IL-6) [Wade et al., 1993]. La IL-6 genera un augment marcat de la síntesi de mRNA, dosi depenent, que condueix a l'acumulació de partícules de Lp(a) en cultius d'hepatòcits [Ramharack et al., 1998]. La capacitat de la Lp(a), mitjançant la funció LBS, de ser reconeguda per receptors de superfície de cèl·lules endotelials, macròfags, fibroblastes i plaquetes [Hughes et al., 1997] facilitaria aquest procés. Si bé encara no està del tot clar si la partícula de Lp(a) és internalitzada directament o pel contrari és sotmesa a una degradació extracel·lular prèvia, la gran quantitat de colesterol que transporta pot ser extret fàcilment i utilitzat en el lloc on s'acumula.

A més del seu efecte reparador, la Lp(a) mostra característiques de factor de creixement. Promou el creixement de les cèl·lules endotelials de la vena umbilical en un efecte sinèrgic amb factor de creixement dels fibroblastes i insulina [Takahashi et al., 1996] i en cultiu, incrementa la proliferació de cèl·lules vasculars llises inhibint l'activació del factor de transformació del creixement β [Grainger et al., 1994].

Un procés versemblant començaria per la producció de dany vascular que produiria una resposta de fase aguda generada de forma concomitant per l'alliberament de varis mediadors entre els quals la IL-6 que estimularia la síntesi hepàtica d'apo(a) i l'augment de Lp(a) en la circulació. Poc després la Lp(a) s'acumularia en el lloc de la lesió i s'uniria als receptors de les diferents cèl·lules presents i a la fibrina inhibint la lisi del coàgul. Al mateix temps les propietats de factor de creixement promourien la reparació del dany vascular assegurant la regeneració gràcies a la gran quantitat de colesterol transportat. En la figura 5 es mostra un esquema de la funció de la Lp(a) en la reparació del teixit

Figura 5 Visió esquemàtica de la funció de la Lp(a) en la reparació dels teixits.



Adaptat de [Lippi i Guidi, 2000].

La concentració de Lp(a) no es veu modificada pels hàbits alimentaris. És possible doncs, que fa uns milions d'anys en els primats, amb hàbits alimentaris molt diferents dels nostres i amb concentracions plasmàtiques de colesterol total i LDL-colesterol més baixos que els nostres, la quantitat de colesterol transportat per la Lp(a) pogués representar una font important de substrats per la regeneració i el creixement La colocalització de l'apo(a) amb apoB en teixits en procés de cicatrització recolza aquesta hipòtesi [Yano et al., 1997]. El fet que tant sols en un cinc per cent de les mostres es trobi apoB sense apo(a) suggereix que l'origen d'aquesta apoB és la Lp(a) i no pas les LDL.

1.2.7.2. La Lipoproteïna (a) i el càncer

La relació clínica entre la Lp(a) i el càncer és encara poc clara. La concentració de Lp(a) sovint està augmentada en els pacients amb aquesta patologia respecte els controls sans independentment del tipus i grau de malignitat del tumor [Wright, 1989].

L'angiostatina, fragment del plasminogen que es genera per proteolisi en processos cancerígens inhibeix la neovascularització de tumors i metàstasis [O'Reilly, 1997]. Tenint en compte el grau d'homologia de l'apo(a) amb el plasminogen, és plausible que els fragments d'apo(a) generats en la degradació fisiològica de la Lp(a) tinguin propietats similars i redueixin el creixement i l'extensió dels tumors. Malgrat ser atractiva, la hipòtesi presenta algunes dificultats. Per una part la Lp(a) té una funció semblant a la del factor de creixement amplament reconeguda que entra en contradicció amb un eventual efecte inhibitori de l'angiogènesi. Per l'altre l'administració sistemàtica de proteïnes amb *kringles* no inhibeix la neovascularització i el creixement de metàstasis en els tumors primaris.

1.2.7.3. La lipoproteïna (a) pot ser un succedani de l'ascorbat

Segons la teoria del premi Nobel Linus Pauling [Rath, Pauling 1990] la malaltia cardiovascular és una condició degenerativa induïda per la manca crònica d'ascorbat, en la que la gran deposició extracel·lular de Lp(a) representa un mecanisme defensiu de caire biològic molt potent. Aquesta teoria es basa en la consideració que la Lp(a) es troba en primats i conillets d'índies, espècies que han perdut la capacitat de síntesi *de novo* de vitamina C, en el fet que en animals d'experimentació l'administració d'ascorbat a dosis 40

mg/kg de pes/dia prevé l'acumulació de Lp(a) i el desenvolupament de lesió arterioscleròtica [Rath, Pauling 1990] i en que ambdues molècules podrien compartir algunes propietats bàsiques .

Des de les hores però, no ha estat publicat cap altre estudi experimental que relacioni la Lp(a) amb l'ascorbat en humans. Els estudis posteriors han estat incapaços de demostrar la presència de material immunoreactiu semblant a la Lp(a) en plasma o mRNA en el fetge del conill d'índies suggerint que el material identificat originalment per Rath i Pauling podrien ser proteïnes o polipèptids amb reactivitat creuada [Lawn et al., 1995] i finalment el suplement amb altes dosis d'ascorbat en pacients amb malaltia coronària prematura no produeix un descens important de la concentració plasmàtica de Lp(a). Tot plegat indicaria que la relació entre la Lp(a) i la vitamina C necessita més investigació per ser confirmada

2. Concentració de Lipoproteïna (a) en plasma i el seu significat en la patologia humana

Actualment encara es desconeixen alguns aspectes relatius al metabolisme i possible funció de la Lp(a). Malgrat tot, les evidències que la relacionen amb la patologia vascular varen aparèixer molt aviat en nombrosos estudis i des de les hores les concentracions elevades en plasma s'han considerat factor de risc independent de patir malaltia cardiovascular.

La concentració de Lp(a) pot variar fins a mil vegades entre diferents individus però es manté remarcablement constant amb l'edat, la dieta i la major part dels tractaments coneguts efectius en la reducció dels nivells plasmàtics d'altres lipoproteïnes.

2.1. Contribució dels polimorfismes de mida de l'apoproteïna (a) a la concentració plasmàtica de Lipoproteïna (a)

La mida de l'apo(a) es relaciona de forma inversa amb la seva concentració plasmàtica [Utermann et al., 1987]. Ambdues característiques estan regulades pel gen de l'apo(a) i cosegreguen juntes. La mitjana de la concentració plasmàtica de Lp(a) en individus amb isoformes petites, és superior a la dels individus amb isoformes grans. Si prenem com exemple la classificació d'Utermann, la concentració mitjana de Lp(a) dels individus tipus B és 10 vegades més alta que dels individus tipus S₄. En la taula 2 es mostren els resultats

que relacionen la mida del gen, de la proteïna i la concentració plasmàtica de Lp(a) obtinguts en dos estudis citats en la bibliografia [Utermann, 1989; Kraft et al., 1992]. En individus heterozigots la concentració de Lp(a) tendeix a ser quasi igual a la suma de les concentracions assignades a les seves respectives isoformes.

Els estudis en cultius cel·lulars d'hepatòcit de mona suggereixen que aquesta correlació està relacionada amb l'eficàcia de processament postranscripcional de l'apo(a) [White et al., 1994], en concret amb la glicació de la proteïna. En aquest procés, que té lloc en el retícul endoplasmàtic, les isoformes més grans romanen més temps en aquest orgànu i tenen per aquesta causa més possibilitats de ser degradades.

Malgrat la variació en la concentració plasmàtica de Lp(a) associada a un mateix al·lel heretat per individus diferents és inferior a 2,5 vegades [Perombelon et al., 1994], en individus no relacionats la mateixa isoforma pot variar fins a dues-centes vegades indicant que altres factors poden també controlar la concentració plasmàtica de Lp(a)

La distribució de la concentració plasmàtica de Lp(a) presenta variacions ètniques importants [Helmhold et al., 1991]. Mentre en la població caucàsica i asiàtica està fortament esbiaixada a l'esquerra, en afroamericans és quasi normal. Aquests darrers, presenten concentracions de Lp(a) varies vegades més elevades que els individus de raça blanca. És important remarcar que les concentracions són també més elevades en cada fenotip individualment [Rotimi et al., 1997]. Aquestes diferències han portat alguns autors a formular la hipòtesi que el control genètic de les concentracions de Lp(a) és diferent en la població africana que la caucàsica [Scholz et al., 1999].

En la població caucàsica aproximadament el 90% de la variabilitat en la concentració plasmàtica de la Lp(a) està regulada per la seqüència del gen de l'apo(a) [Boerwinkle et al., 1992]. Prop d'un 70% d'aquesta variació pot ser explicada pel polimorfisme de mida de l'apo(a) [Boerwinkle et al., 1989]. En la població de raça negra en canvi, la regulació que el gen exerceix sobre els nivells plasmàtics es redueix a un 78% [Mooser et al., 1997] mentre tant sols el 38% d'aquesta variació pot ser explicat pel polimorfisme de mida de la proteïna [Kraft et al., 1996].

Les diferències que s'estableixen entre la contribució del polimorfisme de mida de la proteïna i el que és explicat genèticament, fan pensar que altres polimorfismes així com

altres gens i en menor mesura factors no genètics tenen un paper en la regulació de la seva expressió.

2.2. Altres factors reguladors de les concentracions plasmàtiques

2.2.1. Factors genètics

El gen de l'apo(a) presenta altres polimorfismes de seqüència que han estat relacionats amb els nivells de síntesi de la proteïna i que podrien explicar part de la contribució no atribuïda al polimorfisme de mida.

La concentració de Lp(a) ha estat relacionada amb el polimorfisme de repetició d'un pentanucleòtid (TTTTA)_{n=7-11} situat en l'extrem 5', en la regió promotora del gen a 1,4 Kb de la seqüència senyal. [Mooser et al., 1995]. Dels 10 genotips diferents que genera, els al·lels de 8 i 9 repeticions són els més freqüents, mentre els de més de 9 repeticions són comuns en individus de raça caucàsica i els de menys, en individus de raça negra. Alguns autors, han trobat un efecte multiplicador en la interacció d'aquest polimorfisme amb el de mida de la proteïna [Rosby i Berg., 2000].

Una altra mutació, +93 C/T en la regió no traduïda de l'extrem 5' introdueix un codó addicional ATG d'inici de la transcripció que *in vitro* redueix fins un 60% la traducció de la proteïna [Zysow et al., 1995]. Aquest polimorfisme mostra un impacte significatiu en la concentració de Lp(a) en africans però no en caucàsics, probablement perquè en individus caucàsics el seu efecte queda emmascarat pel desequilibri d'unió de l'al·lel +93T amb els al·lels de mida intermèdia i amb l'al·lel de 9 repeticions del polimorfisme del pentanucleòtid [Kraft et al., 1998].

Altres polimorfismes detectats en l'anàlisi de la seqüència de nucleòtids del gen de l'apo(a) es troben en la posició -773 i en la posició +121 i consisteixen en el canvi d'una base (G/A). [Ichinose i Kuriyama, 1995]. D'aquests, el que correspon a la posició +121 de la transcripció s'associa amb una regulació positiva en la transcripció del gen.

Recentment la substitució de G/A en la posició +1 de la regió connectora del *kriple* IV₈ s'ha associat amb deficiència congènita de Lp(a) en plasma [Ogorelkova et al., 1999]. Aquest polimorfisme d'una sola base (SNP) que es dona amb relativa freqüència (6%) en individus

de raça caucàsica i no en africans podria contribuir a explicar fins un 25% dels al·lels nuls detectats.

Taula 2 Relació entre isoforma d'apo(a), mida dels fragments obtinguts en la digestió del gen amb l'enzim de restricció KpnI, número de repeticions del *kringle* IV i concentració plasmàtica de Lp(a) en una població de raça caucàsica

Nom isoforma	Massa molecular kDa*	Mida fragment digerit amb KpnI Kb	Nombre de <i>kringles</i> IV ₂	Concentració mitjana Lp(a) mg/L*	Freqüència % **
F	<450	37-49	11-13	#	< 0.2
B	≈ 500	55-66	14-16	617	1.2
S ₁	≈ 550	72-82	17-19	344	3.8
S ₂	≈ 600	88-99	20-22	245	11.2
S ₃	≈ 650	105-116	23-25	102	13.7
S ₄	> 700	121-210	26-42	< 57	70.1

Pocs individus

* (Utermann, 1989)

** (Kraft et al., 1992)

Els mateixos autors [Ogorelkova et al, 2001] han identificat fins a 14 SNP en diferents exons i regions flanquejants d'introns de KIV_{6,8,9 i 10}, alguns dels quals mostren efectes significatius en les concentracions plasmàtiques de Lp(a) quan es té en compte la raça.

Encara que els polimorfismes identificats certament no poden explicar totalment les diferències en les concentracions de Lp(a) entre individus amb la mateixa isoforma ni tampoc les diferències en la mitjana de Lp(a) plasmàtica en races diferents, suporten la hipòtesi que les mutacions tant en les regions codificadores com en la regió del promotor contribueixen a la variabilitat en la concentració plasmàtica entre persones de la mateixa raça i entre races diferents.

2.2.2. Factors no genètics

Entre els factors no genètics que poden afectar els nivells plasmàtics de Lp(a) es troben les hormones i algunes malalties.

L'administració d'esteroids anabolitzants [Albers et al., 1984] o estrògens [Sacks et al., 1994] s'ha associat a descensos significatius en les concentracions plasmàtiques de Lp(a). L'administració d'hormona del creixement [Olivecrona et al., 1993], factor I de creixement [Olivecrona et al., 1995] o el tractament substitutiu amb hormones de les tiroïdes en l'hipotiroïdisme [de Bruin et al., 1993] es relaciona en canvi amb un augment en la concentració de Lp(a). El mecanisme d'acció d'aquestes hormones en la modulació dels nivells plasmàtics de Lp(a) és desconegut.

Els nivells plasmàtics de Lp(a) en les malalties renals han estat abastament estudiats. Els pacients sotmesos a diàlisi [Thillet et al., 1993], amb insuficiència renal no tractada [Barbagallo et al., 1993] i amb síndrome nefròtica [Kanno et al., 1992], presenten concentracions elevades. S'ha trobat una correlació positiva entre la severitat de la proteïnúria i els nivells de Lp(a) [Joven et al., 1995], probablement reflectint l'increment en la síntesi hepàtica provocada pel descens de la pressió oncòtica secundària a la pèrdua d'albumina [Karadi et al., 1989].

La relació entre diabetis i la concentració de Lp(a) ha estat motiu de controvèrsia en la literatura científica, la qual generalment sembla recolzar un efecte directe d'aquesta malaltia en la concentració, independentment del seu tractament [Joven i Vilella, 1991], [Utermann, 1995].

S'han trobat també augments de Lp(a) plasmàtica en processos inflamatoris, preferentment en el marc d'una reacció de fase aguda [Ledue et al., 1993], que es podrien explicar per la disposició d'aquesta partícula a lliurar els lípids necessaris per reparar els teixits danyats. Malgrat que recentment els resultats d'altres investigadors han entrat en clara contradicció amb aquesta hipòtesi [Mooser et al., 2000].

Altres patologies com el Lupus eritomatós sistèmic [Borba et al., 1994] l'artritis reumatoïda [Rantapaa-Dahlqvist et al., 1991] i preclàmsia [Wang et al., 1998] determinen també augments significatius.

2.3. Metabolisme de la Lipoproteïna (a)

La Lp(a) no és un producte metabòlic d'altres lipoproteïnes [Krempler et al., 1979], el seu catabolisme tampoc implica la conversió en altres lipoproteïnes [Krempler et al., 1980] i la seva concentració plasmàtica és una conseqüència directa de la seva taxa de síntesi.

2.3.1. Síntesi de la Lipoproteïna (a)

Encara que s'ha trobat quantitats apreciables de mRNA d'apo(a) en els testicles i el cervell, el fetge sembla ser l'òrgan de síntesi predominant, ja que és l'únic que també sintetitza apoB i que per tant pot facilitar l'acoblament amb les LDL. L'evidència més directa del paper del fetge en la síntesi d'apo(a) la donen els estudis en malalts sotmesos a trasplantaments terapèutics de fetge. Aquests pacients poden canviar totalment les característiques genètiques de l'apo(a) i adquirir el fenotip del fetge del donant [Kraft et al, 1989].

Els mecanismes pels que es regula la síntesi d'apo(a) són relativament desconeguts. Recentment alguns autors han proposat que part de les diferències en la concentració plasmàtica de Lp(a) podria explicar-se per les diferències en el paper que activadors i repressors tenen en cada individu [Pati i Pati, 2000].

En certa mesura, aquests mecanismes han estat deduïts de la comparació amb la síntesi en primats. El promotor d'apo[a] de primats comparteix un 98% d'homologia amb la regió equivalent dels humans però es diferencia d'aquella per l'absència de dos dels polimorfismes descrits en la regió promotora, el polimorfisme de repetició del pentanucleòtid (TTTTA)_n i el SNP de la posició +93 de la regió no traduïda [Ramharack et al., 1996]. Els primats solen presentar concentracions més elevades de Lp(a). Si bé una part important d'aquestes diferències es poden explicar per la relació inversa entre polimorfisme de mida i concentració, també s'assenyala el promotor com a responsable de l'increment de síntesi. De fet, en experiments de transfecció, el promotor de primat confereix al gen d'apo(a) una activitat 5 cops superior que a la del promotor humà. [Huby et al., 2001].

S'ha descrit que l'expressió hepàtica del gen de l'apo(a) està regulada parcialment per la regió no traduïda del promotor, compresa entre els nucleòtids +88 a +130 que és sensible a la interacció amb el factor hepàtic, HNF-1 α (*hepatocyte nuclear factor 1 alpha*) present en abundància en aquest òrgan [Wade et al., 1994]. Però com s'ha demostrat en experiments de transfecció de cèl·lules HepG2 el promotor d'apo(a) per si sol genera uns nivells de transcripció relativament baixos. Sembla probable doncs, que la transcripció òptima com la de la majoria dels gens, pugui dependre de la presència d'una o més regions potenciadores situades a una certa distància del promotor basal.

En aquest sentit s'han trobat un parell de regions amb zones reguladores de la transcripció. Una d'elles a 26 Kb del promotor en direcció 5', requereix de la interacció dels factors de la transcripció Sp1 i PPAR1 [Wade et al., 1997], l'altre en la mateixa direcció, però a 20 Kb de l'inici de la transcripció, conté un seqüència sensible factors de transcripció. [Yang et al., 1998].

Amb freqüència, apareixen nous estudis que impliquen diferents regions de la zona del promotor en l'activació de la transcripció com la que compren els nucleòtids -703 a -640 (64 parells de bases) que s'uneix a múltiples factors específics del fetge i activa la transcripció en cèl·lules hepàtiques [Handa et al., 2002].

A banda de les seqüències que responen als diferents factors de transcripció, se'n ha identificat d'altres sensibles al retinoid [Ramharack et al., 1998] o als estrògens [Boffelli et al., 1999].

2.3.2. Acoblament de l'apoproteïna (a) a les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL)

Estudis *in vitro* suggereixen que la unió entre LDL i l'apo(a) té lloc fora de la cèl·lula de forma que l'apo(a) sintetitzada de nou, és secretada i fixada a la superfície de l'hepatòcit mitjançant els seus *kringles*. En aquesta localització, pot ser capturada per l'apoB i alliberada de la cèl·lula com a partícula lipoproteica [White et al., 1993]. Probablement la fixació de l'apo(a) a la superfície de la cèl·lula pot facilitar la interacció amb lipoproteïnes que contenen apoB i prevenir la lliure circulació d'apo(a) en el plasma on podria participar en interaccions perjudicials amb d'altres components de la superfície cel·lular.

L'acoblament de la Lp(a) té lloc en dues fases. En la primera, es forma un complex làbil entre les LDL i l'apo(a) per interacció entre els *kringle* IV₅₋₈ i un grup de lisines de l'apoB [Kostner et al., 1997]. Aquesta unió es pot dissociar amb l'addició de lisina, àcid ε-aminohexòic (ε-AAH) o compostos similars [Frank et al., 1995]. En una segona etapa, es forma un pont disulfur entre un residu de cisteïna lliure localitzat en el *kringle* IV₉ (Cys⁴⁰⁵⁷) (numeració, segons McLean 1997), i una cisteïna de l'apoB [Koschinsky et al., 1993].

L'anàlisi de l'acoblament de l'apo(a) amb diverses apoB truncades; apoB95 i apoB97, ha demostrat que la regió compresa entre els aminoàcids 4330 i 4397 d'aquesta proteïna, juguen un paper clau en la unió covalent amb l'apo(a). [McCormick et al., 1997]. És important ressaltar que aquesta és una regió rica en lisines. Així mateix la seqüència entre els aminoàcids 680 (apoB15) i 781 (apoB18) està implicada en l'associació no covalent amb apo(a) i s'uneix específicament a un o més del *kringles* KIV₅₋₈ de l'apo(a) [Gabel et al., 1998]. El residu Lys⁶⁹⁰ de l'apoB18 s'ha determinat com a crític en el procés d'unió no covalent [Becker et al., 2001]. Basant-se també en proves d'acoblament d'apoB truncades s'ha proposat el residu Cys⁴³²⁶ com a responsable de l'enllaç sulfidril amb l'apo(a) [Gabel et al., 1994]. Estudis recents amb ratolins transgènics han donat suport a aquesta hipòtesi [Cheesman et al., 2000].

2.3.3. Catabolisme de la Lipoproteïna (a)

Encara no s'ha determinat amb certesa el lloc i el mecanisme pel qual la Lp(a) s'extrau de la circulació. Si bé pot ser degradada mitjançant la via del receptor de LDL, s'acumulen evidències suggerint que *in vivo* aquesta no és la via catabòlica més important.

Els experiments *in vitro* amb cèl·lules HepG2 han demostrat que la Lp(a) s'uneix al receptor de les LDL però que ho fa amb afinitat inferior a les LDL [Kostner, 1993]. La unió és inespecífica i quasi insaturable mentre la quantitat de Lp(a) internalitzada és baixa. Una observació similar s'ha obtingut en experiments amb fibroblasts.

Diversos estudis han intentat esbrinar *in vivo* la implicació dels receptors de LDL en l'extracció de la Lp(a) del plasma i la relació entre la seva deficiència i els nivells plasmàtics elevats.

Les persones amb hipercolesterolèmia familiar (HF) presenten concentracions aixecades de Lp(a) amb independència de la isoforma heretada [Bowden et al., 1994]. Aquestes juntament amb les de LDL incrementen encara més el seu risc de patir una malaltia cardiovascular [Lingenhel et al., 1998]. Per tant, els pacients amb HF defectius en el receptor de LDL constitueixen un model adient pels estudis del catabolisme de Lp(a). Mentre que la internalització i degradació de Lp(a) per fibroblasts d'aquests pacients és comparable a les obtingudes amb fibroblasts d'individus sans, la degradació de LDL és virtualment zero [Kostner et al., 1991]. Els resultats suggereixen que probablement aquesta no sigui la causa dels nivells elevats de Lp(a) plasmàtica. És important ressaltar també que la teràpia amb estatines que se sap incrementa dràsticament el nombre de receptors de LDL en el fetge no té un efecte reductor sobre la Lp(a) plasmàtica [Kostner et al., 1989].

El conjunt d'observacions anteriors demostren que el receptor de LDL si està implicat en el catabolisme de la Lp(a), hi juga un paper menor. Ha d'haver-hi per tant altres mecanismes o altres receptors implicats en la captació de Lp(a).

Recentment un estudi *in vivo* ha comparat parelles de germans homozigots i heterozigots per hipercolesterolèmia familiar i ha demostrat que els homozigots, presenten quasi el doble de Lp(a) plasmàtica que els seus germans heterozigots [Kraft et al., 2000]. Els autors proposen que les mutacions en el gen del receptor tenen un efecte directe en les concentracions plasmàtiques de Lp(a). Descartada la via del receptor de LDL el repte continua sent donar explicació als mecanismes pels quals en aquests pacients la Lp(a) tampoc s'extreu de la circulació sanguínia amb la mateixa eficiència que els individus sans.

Els models d'experimentació animal, assenyalen el ronyó i el fetge com els òrgans més importants en la captació de LDL i Lp(a). Els càlculs atribueixen al fetge un 60% de la captació de LDL i un 50% de la de Lp(a). El ronyó per la seva part capta 1.6 vegades més Lp(a) que LDL, suggerint que aquest òrgan reté preferentment Lp(a) i que la capacitat de captació és específica. Tenint en compte que *in vivo* el fetge té un paper cabdal en l'extracció de la Lp(a) del plasma i, considerant que com s'ha esmentat anteriorment, *in vitro* les cèl·lules hepàtiques internalitzen molt poca Lp(a), alguns autors [Kostner et al., 1997] han proposat un mecanisme alternatiu de catabolisme pel qual la Lp(a) podria ser degradada parcialment *in vivo* i d'aquesta forma, els fragments degradats podrien ser captats pel fetge.

La hipòtesi de Kostner i els seus col·laboradors té el seu origen en l'observació de dos processos que la fan plausible. Tant en plasma com en orina es poden detectar fragments d'apo(a) i el tractament de la Lp(a) i l'apo(a) amb algunes proteases genera patrons específics de fragmentació.

L'apo(a) s'excreta en orina en fragments de la porció amino-terminal. Aquests fragments tenen un pes molecular d'entre 35 i 160 kDa segons el nombre de *kringles* IV₂ de la isoforma plasmàtica i poden trobar-se àdhuc en l'orina de pacients que presenten concentracions plasmàtiques no immunodetectables [Moose et al., 1996]. La concentració de fragments en orina, sembla ser proporcional a la concentració plasmàtica de Lp(a). Es calcula que aproximadament el 0.1% de la quantitat de Lp(a) catabolitzada diàriament pot ser extreta del plasma en forma de fragments amino-terminal d'apo(a) mitjançant el ronyó. Paral·lelament en plasma es troben fragments, des de 25-30 kDa, la mida estimada d'un *kringle*, fins a ~200 kDa [Mooser et al., 1996] corresponents també a la posició amino-terminal de la proteïna. La seva concentració està directament relacionada amb els nivells plasmàtics de Lp(a). Tot plegat mostra fortes evidències que els fragments d'apo(a) plasmàtics poden tenir el seu origen en la Lp(a) i apo(a) circulant i que aquests podrien ser l'origen dels fragments urinaris.

És un fet rellevant, que la mida dels fragments sigui igual tant en pacients amb isoformes petites com grans, malgrat que recentment ha estat descrit un patró de fragmentació d'apo(a) associat a isoformes petites caracteritzat pel predomini d'un fragment la mida del qual està relacionada amb la mida de l'isoforma original. [Gonbert et al., 2001].

Constatada l'existència de fragments d'apo(a) tant en plasma com en orina, diverses investigacions s'han adreçat a esbrinar-ne la causa. Com s'ha esmentat anteriorment, alguns dels enzims de la família de les serin-proteases com l'elastasa [Edelstein et al., 1996], metal·loproteïnasa [Edelstein et al., 1997] o col·lagenasa [Kostner et al., 1997] hidrolitzen la Lp(a) en una certa extensió donant lloc a fragments específics. De tots ells els generats per les col·lagenases són comparables als obtinguts en orina de pacients

S'ha estudiat l'efecte que té el tractament de Lp(a) amb col·lagenasa en la interacció dels fragments generats amb els receptors LDL de cèl·lules HepG2. En un cultiu amb cèl·lules HepG2 que sobreexpressen receptors de LDL, s'ha demostrat que les LDL natives o tractades amb col·lagenasa, presenten una captació similar. Com era d'esperar, la captació de la Lp(a) nativa no tractada és significativament més baixa que la de LDL. Després del

tractament amb col·lagenasa però, la quantitat de fragments captats per les cèl·lules hepàtiques es dobla i s'equiparà a la de LDL.

Amb totes les dades exposades, Kostner i col. han proposat un mecanisme quantitativament important per explicar el catabolisme de la Lp(a). Segons aquest model, la Lp(a) podria ser tallada per proteases específiques del tipus col·lagenasa. L'actuació de la col·lagenasa produiria l'alliberament d'un fragment amino-terminal, que contindria les repeticions del *kringle IV*₂. La partícula romanent amb un pes inferior a 100 kDa restaria formada per LDL i una porció d'apo(a) carboxi-terminal incapaç de bloquejar la interacció de les LDL amb els receptors cel·lulars i seria per tant aclarida del plasma de forma similar a aquesta lipoproteïna. En la figura 6 es mostra un esquema del metabolisme proposat per la Lp(a).

2.4. Significat de la Lipoproteïna (a) en la patologia humana

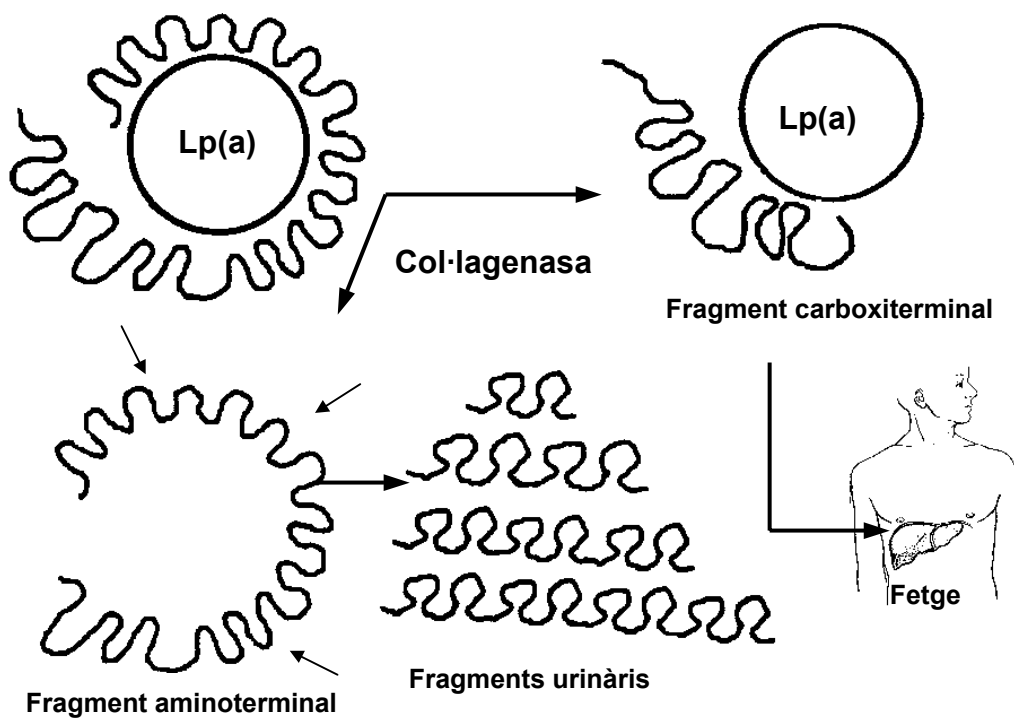
Concentracions plasmàtiques elevades de Lp(a) s'han associat a la malaltia arterial coronària silent, a l'infart agut de miocardi (IAM), a les malalties cardiovasculars perifèriques i a l'infart cerebral [Kronenberg et al., 1996]. Habitualment, s'han considerat predictives d'IAM en pacients de mitjana edat [Seed et al, 2001] i constitueixen l'anomalia lipoproteica familiar més freqüent entre pacients amb infart agut de miocardi prematur [Pay et al., 1997].

Degut a les seves característiques fisicoquímiques i funcionals s'ha atorgat a Lp(a) un paper pont entre el procés trombogènic i aterogènic [Scanu, 1988; Cremer et al., 1994; Bostom et al., 1996; Wild et al., 1997]. Això no obstant alguns d'aquests estudis han obtingut resultats discrepants [Jauhiainen et al, 1991; Ridker et al., 1993; Alfthan, 1994] que han creat una important confusió en l'estudi de la seva patologia.

S'han proposat algunes raons per explicar aquesta aparent contradicció. Degut a la seva complexitat intrínseca, tant genètica com estructural i metabòlica, és necessari aplicar condicions rigoroses d'estandardització dels protocols per extreure conclusions dels resultats de les investigacions que es duen a terme, [Scanu, 2001], però també l'efecte de l'emmagatzematge de les mostres en la determinació de la concentració plasmàtica de Lp(a) ha estat una possible font de discrepància ja que molts d'aquests estudis s'han basat en mostres conservades a diferents temperatures i diferents períodes de temps. [Kronenberg, 1996]. Ha estat intenció del nostre grup contribuir a l'aclariment d'aquesta controvèrsia

estudiant l'efecte que un llarg període de temps, mes de 5 anys, pot tenir sobre la concentració de Lp(a) i la influència que el polimorfisme de mida podria exercir sobre aquesta pèrdua.

Figura 6 Esquema del metabolisme de la Lp(a) proposat per Kostner i col



Adaptat de Kostner et al, 1997

2.4.1. Capacitat aterogènica de la Lipoproteïna (a)

Les propietats aterogèniques de la Lp(a) es troben íntimament relacionades amb les de les LDL. de forma que el potencial cardiovascular de la Lp(a) sembla ser més important en pacients hipercolesterolèmics [von Eckardstein et al., 2001].

Hi han prou evidències per explicar el paper de la Lp(a) en la gènesi, el desenvolupament i la complicació de la lesió ateroscleròtica. Material amb característiques immunoreactives de Lp(a) ha estat localitzat en la paret vascular de diversos vasos arterials incloent l'aorta [Jurgens et al, 1993] i la coronària [Rath et al, 1989]. La quantitat relativa d'apo(a) dipositada en la lesió, s'ha relacionat de forma significativa amb la seva extensió i amb els nivells plasmàtics de Lp(a) [Pepin et al.,1991]. L'acumulació d'apo(a) es pot donar en les seves formes degradada, lliure i oxidada. Un estudi recent però, podria modificar parcialment aquests resultats ja que s'ha detectat mRNA d'apo(a) no així d'apoB, en la paret dels vasos tant d'adults amb aterosclerosi com en infants sans, el que podria indicar que mentre tota les LDL trobada en les artèries té el seu origen exclusivament en el torrent circulatori, l'acumulació de Lp(a) podria en part, ser deguda a la producció *in situ* d'apo(a) en la paret del vas [Fu et al, 2001].

Dos han estat fins ara els mecanismes descrits que podrien facilitar la deposició de la Lp(a) a la paret del vas:

La defensina alliberada pels neutròfils durant el procés de fagocitosi facilita la unió de Lp(a) a la paret vascular [Bdeir et al., 1999].

També s'ha observat que en el desenvolupament de la lesió ateroscleròtica es produeix l'augment de la síntesi d'heparanasa induït per la presència de LDL oxidada. Aquest enzim és el responsable del descens de glicosaminoglicans tipus heparan sulfat i de l'augment de dermatan sulfat i condroitin sulfat i de facilitar d'aquesta forma la retenció de LDL en la matriu. Aquest canvi sembla ser a la vegada el responsable de l'augment de la fixació de Lp(a) a la fibronectina de la matriu [Pillarsetti et al., 1997].

Indirectament la deposició de Lp(a) es pot fer a través de macròfegs ja que s'ha demostrat que receptors específics, l'activitat dels quals és induïda per colesterol, són capaços de captar i internalitzar Lp(a) reconeixent un domini d'apo(a) diferent dels que s'impliquen en la funció LBS [Keesler et al, 1996].

S'ha descrit també la seva intervenció en altres mecanismes:

1) *La Lp(a) indueix la secreció de substàncies quimiotàctiques i molècules d'adhesió*

Les LDL oxidades però no les intactes, indueixen l'expressió de molècules d'adhesió de monòcits en cèl·lules endotelials i de múscul llis [Cushing et al., 1990]. Donada l'associació en la placa d'ateroma, de Lp(a) i macròfegs, s'ha examinat la capacitat d'aquesta partícula per induir la secreció de factors d'activitat quimiotàctica sobre monòcits en cèl·lules endotelials [Poon et al., 1997]. S'ha comprovat que la Lp(a) indueix la secreció de factors quimiotàctis al medi de cultiu, atribuïbles en la seva totalitat a l'apo(a). Aquesta inducció a diferència de les LDL és causada per l'apo(a) no oxidada. [Haque et al., 2000].

La Lp(a) oxidada té també la capacitat d'induir l'expressió de molècules d'adhesió en cultius de cèl·lules endotelials. Aquesta secreció provoca l'adhesió dels monòcits activats a les esmentades cèl·lules estimulants la seva diferenciació a macròfegs [Ragab et al., 1996]. L'increment de l'adhesió de leucòcits a l'endoteli, es presenta com un procés crucial en el desenvolupament de l'aterosclerosi

2) La Lp(a) mostra propietats de factor de creixement per diversos teixits vasculars

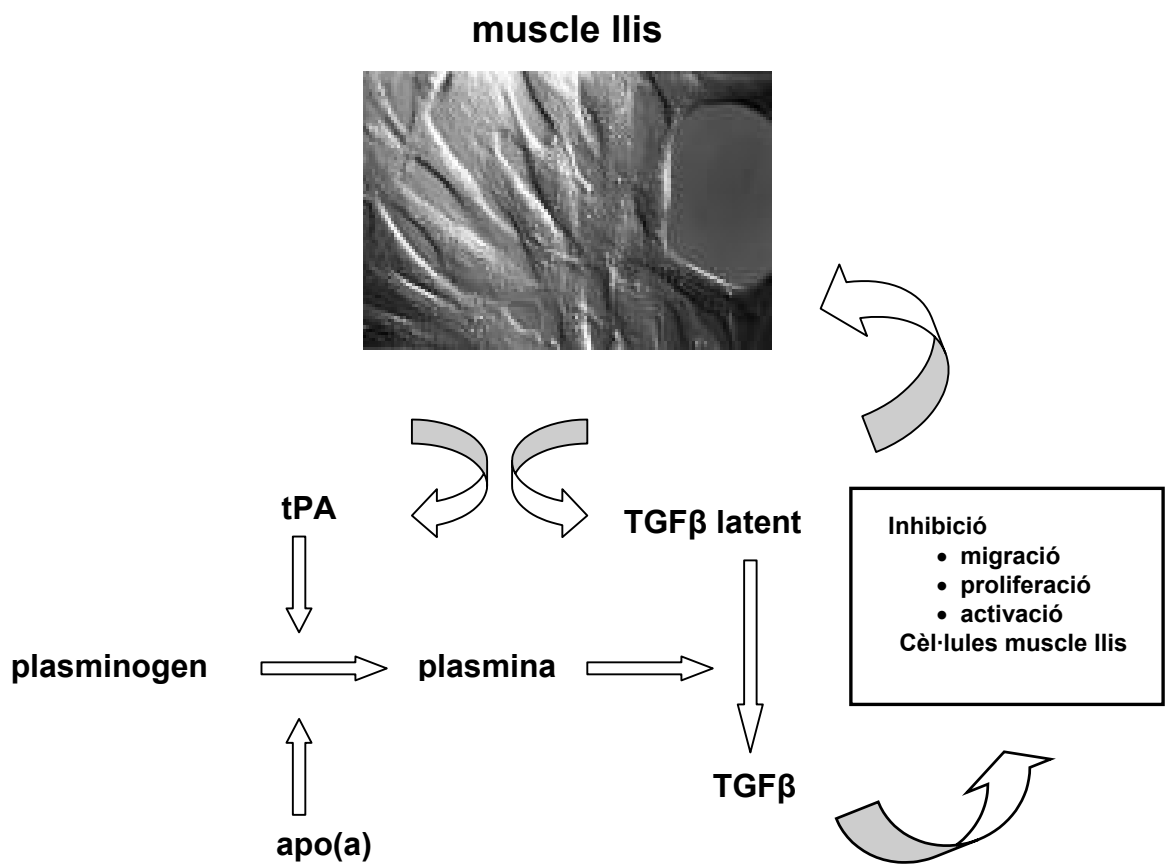
A més del seu paper en la fibrinolisi la plasmina està implicada en altres processos com l'activació de la citoquina, Factor de Transformació del Creixement β (TGF β). Aquesta citoquina que es produeix usualment com una forma latent inactiva és activada proteolíticament per la plasmina i sembla participar en la regulació de la progressió de l'aterosclerosi [Grainger et al., 1993 i 1994]. En resposta a varis agents mitògens que actuen en el lloc de la lesió ateroscleròtica, les cèl·lules vasculars del múscul llis (VSMC) migren al lumen i proliferen per formar una íntima que repari el dany produït. El TGF β és responsable d'inhibir la migració d'aquestes cèl·lules i restaurar l'equilibri. Quan s'inhibeix de forma competitiva l'activació del plasminogen a plasmina, la Lp(a) bloqueja l'activació del TGF β latent. En la figura 7 s'esquematitza el paper de l'apo(a) en l'activació del TGF β

3) La Lipoproteïna (a) altera la capacitat vasodilatadora de l'endoteli

L'alteració de la funció de l'endoteli és un dels primers successos que té lloc en l'aterogènesi, de fet es detecta ja en infants amb hipercolesterolèmia familiar. En models animals i en humans ha estat demostrada una correlació espai temporal entre disfunció endotelial i aterosclerosi coronària. L'alteració de l'endoteli, ha pogut ser induïda experimentalment per l'hipercolesterolèmia i particularment per les LDL.

El grau d'alteració de la dilatació, és relaciona amb les concentracions plasmàtiques de Lp(a) [Sorensen et al, 1994] Concentracions elevades de Lp(a) poden predir una resposta anormal del vas a l'acetilcolina suggerint que els nivells plasmàtics d'aquesta lipoproteïna són potents predictors de disfunció endotelial en pacients normocolesterolèmics [Ioka et al, 2002]. L'alteració està causada per Lp(a) oxidada com s'ha comprovat en un model de ratolins transgènics [Rubanyi et al., 2000].

Figura 7 Interacció de l'apo(a) en el mecanisme d'activació del TGFβ.



Adaptat de Grainger i Metcalf, 1995

2.4.2. Capacitat trombogènica de la Lipoproteïna (a)

L'augment de la concentració plasmàtica de Lp(a), ha estat observat en pacients afectats de diverses alteracions trombòtic-oclusives com ara: l'embolisme pulmonar [Csaszar et al, 1995], l'oclusió de la vena retinal central [Tavola et al., 1995] o interferències en la circulació placentària causant de retard en el creixement fetal. [Berg et al., 1994]. Endemés els nivells elevats de Lp(a) són altament predictius de tromboembolisme postquirúrgic en intervencions vasculars i endovasculars [Lippi et al, 1998].

Diversos han estat els mecanismes plausibles proposats per explicar el potencial antifibrinolític de la Lp(a), una considerable part dels quals rau en la seva similitud molecular amb el plasminogen. El més reconegut és la inhibició competitiva de la unió del plasminogen i la seva activació en la superfície de la fibrina, cèl·lules endotelials i plaquetes en proporció directa a la seva concentració.

Harpel i col, han demostrat que la força d'interacció entre l'apo(a) i la fibrina s'incrementa en presència de compostos amb radicals sulfidril com ara l'homocisteïna, la cisteïna, el glutatió i la N-acetilcisteïna [Harpel et al., 1992] una observació particularment atractiva que podria proporcionar un veritable sinergisme entre Lp(a) i homocisteïna en la intrincada gènesi de les alteracions trombòtiques.

Altres estudis han implicat la Lp(a) en nous processos potenciadors de la seva capacitat trombogènica:

1) *La Lp(a) interfereix en la producció de tPA i PAI*

La Lp(a) juntament amb altres lipoproteïnes, té un efecte inhibitor de la secreció de tPA en les cèl·lules endotelials [Levin et al., 1994]. Alhora, *in vitro*, especialment en la seva forma oxidada, incrementa fins a dues vegades la síntesi endotelial i la secreció de PAI-1. [Ren et al., 1997], suggerint que l'oxidació de la Lp(a) amplifica el seu efecte antifibrinolític i trombòtic. Altrament el tPA s'uneix de forma reversible a la Lp(a) fixada en la superfície cel·lular inhibint l'activació del zimogen del plasminogen (Glu-Plasminogen) mitjançada per aquesta proteasa [Sangrar et al., 1997].

2) *La Lp(a) interfereix en la funció de les plaquetes per mecanismes divergents*

En el primer procés, clarament trombogènic, la Lp(a) competeix amb el fibrinogen per la unió als receptors de plaquetes en un mecanisme dependent de la lisina inhibint la seva activació pel tPA [Ezratty et al., 1993] El complex glicoproteic GP IIb-IIIa ha estat identificat com el lloc d'unió de la Lp(a) a les plaquetes.

Per altre banda, com a conseqüència de la lesió vascular, el teixit connectiu, preferentment col·lagen, queda exposat a la llum del vas induint l'adhesió de les plaquetes. Des del moment que es produeix el contacte de les plaquetes amb el subendoteli, s'inicia la seva contracció en un mecanisme dependent de Ca^{+2} que conduirà a l'agregació. L'augment de calci es realitza per l'alliberament d'ADP dels grànuls intracitoplasmàtics i la síntesi de tromboxà A₂. La contracció promou al seu temps la secreció d'altres components intraplaquetars com ara serotonina, factors plaquetars i factors mitògens. La incubació de plaquetes amb LDL i VLDL a concentracions fisiològiques té un efecte potenciador de l'agregació induïda per col·lagen mentre les HDL presenten un efecte oposat. Contràriament al que es podria pensar, la Lp(a) inhibeix aquesta agregació [Gries et al, 1996], suggerint el caràcter no proagregant de l'apo(a) a diferència de les LDL.

3) *Altres mecanismes implicats en els processos trombòtics*

La capacitat d'interacció de la Lp(a) amb components de la coagulació, rics en residus de lisina, ha comportat la cerca d'altres mecanismes que donin suport a una implicació més directa d'aquesta partícula al procés trombòtic.

Un potencial candidat a interaccionar amb la Lp(a) és el *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) que té nombroses lisines en els seu extrem carboxi-terminal. La via extrínseca de la coagulació comença quan el factor VII s'uneix al seu receptor cel·lular, *Tissue Factor-mediated coagulation* (TF). El complex funciona després com a potent enzim que activa el factor X i condueix finalment a la generació de trombina. El *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) és el regulador endogen més important del TF i forma un fort complex amb ambdós factors de la coagulació VII i X.

In vitro, la Lp(a) i l'apo(a) i el plasminogen, no així les LDL, són capaços d'unir-se a TFPI. A més, la Lp(a) inhibeix la seva activitat de forma dependent de la concentració, mentre el plasminogen no té aquest efecte [Caplice et al., 2001]. Aquestes dades suggereixen un nou mecanisme pel qual la Lp(a) mitjançant la funció LBS de l'apo(a) promouria la trombosi.

2.4.3. Paper dels factors genètics en la capacitat aterotrombòtica de la Lipoproteïna (a)

Que el locus de l'apo(a) tingui un efecte dominant en els nivells plasmàtics de Lp(a) i que aquests a la seva vegada es relacionin amb la malaltia cardiovascular, subratlla la importància del gen de l'apo(a). Ara bé, valorar la contribució global del gen de l'apo(a) a la capacitat aterotrombòtica no és senzill si es té en compte que la major part dels individus tenen dos al·lels de mida diferent amb efectes diferents en el potencial aterotrombòtic de la Lp(a) [Scanu i Fless, 1990; Utermann, 1995].

Ja que els processos postranscripcionals actuen afavorint l'acumulació en el plasma de isoformes petites, els individus que hereten una apo(a) de baix PM incrementen el risc de patir una malaltia cardiovascular. Reforça aquesta hipòtesi la demostració *in vitro* que les isoformes petites tenen més avidesa per la fibrina immobilitzada [Hervio et al., 1993]. I els estudis epidemiològics que troben que els pacients amb infart de miocardi tendeixen a presentar isoformes petites (< 23 *kringles*) quan es comparen amb els controls en els que s'incrementa la freqüència de formes intermèdies o grans [Wild et al., 1997 Kronenber et al., 1999].

Malgrat tot el concepte d'una relació inversa entre la mida de l'apo(a), la concentració plasmàtica de Lp(a) i el risc cardiovascular no és compatible amb un seguit d'observacions. (i) En la major part dels estudis fets en afroamericans els nivells de Lp(a) no es correlacionen amb un increment en el risc de patir malaltia cardiovascular. (ii) El punt de tall de la concentració de Lp(a) a considerar com a patològica és incert degut a la gran variació ètnica i per la manca d'estandardització de les determinacions. (iii) Existeixen evidències de que el potencial aterotrombòtic de la Lp(a) pot ésser influenciat per altres factors com els nivells plasmàtics de LDL, HDL o homocisteïna [Cantin et al., 1998].

Independentment dels nivells plasmàtics, les mutacions que afecten la funció d'unió a la lisina del *kringle* IV₁₀ poden disminuir o augmentar el potencial cardiovascular de la partícula lipoproteica [Scanu et al., 1994]. Al contrari, els individus que exhibeixen un fenotip de "superunió" podrien patir un risc cardiovascular més elevat [Scanu et al., 1997]. Malgrat tot

no hi ha encara evidències clíniques de què aquestes dues darreres observacions o d'altres per descriure tinguin una influència real.

2.4.4. Paper dels factors postranscripcionals en la capacitat aterotrombòtica de la Lipoproteïna (a)

L'observació, *in vitro*, de modificacions en la Lp(a) planteja la pregunta de si successos similars tenen lloc *in vivo*. És important ressaltar que la localització de la Lp(a) es dona principalment en àrees de la paret de l'artèria afectes de processos ateroscleròtics [Rath et al., 1989; Pepin et al., 1991] si bé es coneix poc de la seva naturalesa com a Lp(a) intacta o modificada, apo(a) lliure o fragmentada. Durant la transferència del plasma a la paret de l'artèria, la Lp(a) probablement pateix un seguit de canvis estructurals que depenen de la naturalesa de la partícula i de l'estat funcional de les estructures macromoleculares i els components vasculars. Comparativament, les LDL ha rebut més atenció en aquest procés i se'n coneix més del seu poder aterogènic.

Consideracions similars a les descrites per les LDL poden ser aplicades al component LDL de la Lp(a). El component LDL d'aquesta partícula pot incorporar-se a l'acumulació de partícules de LDL de l'intima arterial i contribuir a la transformació de les cèl·lules musculars llises i els macròfegs en cèl·lules escumoses. En absència de trencament dels ponts disulfur però, les LDL pot romandre unida a l'apo(a) i seguir el destí de la Lp(a). Entre aquests es troba la producció de mini-Lp(a) per acció de metal·lo-proteinases [Edelstein et al, 1996; 1997].

L'apo(a) per la seva part se li atribueixen propietats protrombòtiques degut a la seva capacitat entre altres d'interferir en la generació de plasmina [Miles et al., 1989], d'unir-se directament a la fibrina [Loscalzo et al, 1990], d'inhibir la formació de β -TGF [Grainger et al., 1993, 1994] o d'unir-se a diferents components de la matriu extracel·lular [Klezovitch et al., 1998]. Considerant la localització de l'apo (a) principalment en les àrees ateroscleròtiques on es detecta una inflamació subjacent, una qüestió sorgeix en l'estudi dels mecanismes protrombòtics d'aquesta apoproteïna. Quina és la contribució dels fragments d'apo(a) a aquest procés?

Scanu i els seus col·laboradors han postulat que en aquestes àrees hi actuen les elastases generant fragments que tenen capacitat d'unir-se a components de la matriu extracel·lular [Klezovitch et al., 1998]. Emergeix per tant un nou concepte, que en l'artèria inflamada es generen fragment bioactius que tenen capacitat aterogènica.

També s'ha trobat que l'apo(a) indueix l'adquisició d'activitat quimiotàctica en monòcits [Poon et al., 1997] i augmenta l'expressió de molècules d'adhesió [Ragab et al., 1996] que facilita el reclutament de leucòcits en l'endoteli i la seva migració a la matriu subendotelial. De nou en aquest cas els enzims alliberats per aquestes cèl·lules poden modificar l'apo(a) i generar fragments amb diferents capacitats aterotrombogèniques.