

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi

**Aspectes metabòlics i paper de l'agregat genètic Al-CIII-AIV
en la hiperlipèmia familiar combinada**

Josep Ribalta Vives

Tesi Doctoral

1997

C 1342-93360

0096-69260

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi

**Aspectes metabòlics i paper de l'agregat genètic AI-CIII-AIV
en la hiperlipèmia familiar combinada**

T 100

Josep Ribalta Vives

Tesi Doctoral

1997

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
BIBLIOTECA



1700130191



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

CARRER SANT LLORENÇ, 21
TEL. 977 - 75 93 00
FAX 977 - 75 93 22
43201 - REUS -

Lluís Masana Marín, Catedràtic de Medicina de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili,

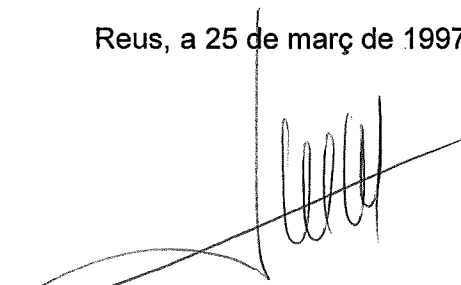
CERTIFICA :

Que Josep Ribalta Vives

ha realitzat sota la meva direcció la tesi doctoral titulada **Aspectes metabòlics i paper de l'agregat genètic AI-CIII-AIV en la hiperlipèmia familiar combinada** i que aquesta està en condicions de ser presentada per a l'obtenció del grau de Doctor.

Per a que així consti i tingui els efectes oportuns, signo la present.

Reus, a 25 de març de 1997



Prof. Lluís Masana Marín





UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

CARRER SANT LLORENÇ, 21
TEL. 977 - 75 93 00
FAX 977 - 75 93 22
43201 - REUS -

José Luis Paternain Suberviola, Professor Titular de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICA :

Que Josep Ribalta Vives

ha treballat sota la meva tutoria la Tesi Doctoral que porta per títol **Aspectes metabòlics i paper de l'agregat genètic AI-CIII-AIV en la hiperlipèmia familiar combinada** i que està en condicions de ser presentada per a l'obtenció del grau de Doctor.

Ho certifico a Reus el 25 de març de 1997.

Dr. José Luis Paternain Suberviola



A l'Elisabet i en Joan

Agraïments

A la Núria i en Josep, els meus pares, que sempre m'han donat prou llibertat per equivocar-me i aprendre.

Al professor Lluís Masana, perquè es un plaer treballar amb algú que creu en la recerca i en el seu equip. M'ha ensenyat a no oblidar que darrera de les xifres hi ha una malaltia i un malalt.

A la Merche Heras i a la Dra. Agnes La Ville perquè són la veritable garantia de qualitat de les anàlisis d'aquest estudi. Sense elles aquest treball no hauria estat possible.

Al Dr. Peter R Turner per haver pensat en mi l'any 1990. D'ell he après moltes coses, algunes de tant importants com llegir i escriure.

Al Jimmy Vallvé i la Josefa Girona per la generositat amb que m'han ofert la seva col·laboració en tot moment. A la Sílvia Olivé que s'ha preocupat dels meus nivells de sucre en sang. Ells són els millors companys de laboratori. Són "*estupendus*".

A la Dra. Rosa Solà, pels seus consells i, sobretot, perquè quan cal un cop de mà ella sempre hi és.

Als Drs. Núria Plana, Pilar Sardà i Carlos Alonso Villaverde per la seva col·laboració en la selecció dels pacients i la recollida de mostres.

Al professor Steve Humphries i a la Dra. Philippa Talmud per la seva hospitalitat i pels seus consells en relació a les anàlisis genètiques.

A la Dra. Fanli Xu per la seva paciència durant el meu aprenentatge de les tècniques de biologia molecular i per la seva deliciosa companyia.

A l'Alexandre Xifró i al Dr. Joan Fernández que són capaços de fer que l'estadística sigui una eina i no pas un enemic.

Al Dr. Jordi Balanyà i a en Quim Margalef pel seu ajut i estímul durant els inicis d'aquest estudi.

A les famílies Vilella, Olivé, Vallvé, Girona, Plana, Garcia, Nogués, Masana, Giralt, Solà, Labad, Polo i a L'Eva Ortoll pel seu inestimable ajut en l'obtenció dels controls.

A la Dra. Elisabet Vilella per la saludable influència que el seu inconformisme, la seva capacitat de reflexió, el seu gust per la discussió i la seva tossuderia infinita tenen sobre mi i la meva feina. Perquè creu de debò en allò de 'fer un món millor'.

De manera molt especial, als pacients i els seus familiars per la seva paciència i col·laboració.

INDEX

1. Introducció	7
1.1. La cardiopatia isquèmica, l'arteriosclerosi i les hiperlipoproteïnèmies	9
1.2. Elements del transport i del metabolisme dels lípids	10
1.2.1. Lipoproteïnes	10
1.2.2. Apolipoproteïnes	13
1.2.3. Enzims i proteïnes transportadores	18
1.2.4. Receptors	21
1.3. Metabolisme de les lipoproteïnes	23
1.3.1. Transport dels lípids exògens	23
1.3.2. Transport dels triglicèrids endògens	24
1.3.3. Transport centrífug de colesterol	25
1.3.4. Transport centrípet de colesterol	26
1.4. Alteracions del metabolisme de les lipoproteïnes	27
1.5. Hiperlipèmia familiar combinada	29
1.5.1. Característiques analítiques	29
1.5.2. Característiques clíniques	31
1.5.2. Diagnòstic	33
1.5.3. Bases metabòliques	35
1.5.4. Bases genètiques	37
1.5.5. Models animals	41
2. Hipòtesi i Objectius	43
2.1. Hipòtesi	45
2.2. Objectius	45
3. Pacients i Mètodes	47
3.1. Pacients	49
3.1.1. Criteri diagnòstic.	49
3.1.2. Composició de les famílies.	51

3.2. Mètodes	60
3.2.1. Fraccionament lipoproteic. Ultracentrifugació seqüencial.	60
3.2.2. Hibridació amb oligonucleòtids específics (ASO).	63
3.2.3. Determinació de les concentracions plasmàtiques de retinol.	67
3.2.4. Determinació de l'activitat de l'enzim LCAT.	68
3.2.5. Determinació del genotip d'apo E.	70
<p>Vallvé JC, Margalef J, <u>Ribalta J</u>, Turner PR, Masana L. 1996. <i>Comparación de la determinación de genotipos y fenotipos de las isoformas de apolipoproteína E. Clin Invest Arteriosclerosis 8 : 59-65.</i></p>	
4. Resultats i Discussió	82
4.1. Resum dels Estudis	84
4.2. ESTUDI 1	89
<p>Detecció i caracterització del fenotip hiperlipèmic en infants i adolescents descendents de pacients amb hiperlipèmia familiar combinada.</p> <p><u>Ribalta J</u>, La Ville AE, Heras M, Plana N, Masana L. <i>Hiperlipèmia familiar combinada: Detección y caracterización del fenotipo hiperlipémico en niños y adolescentes. Med Clin (Barc).</i> (En premsa)</p>	
4.3. ESTUDI 2	107
<p>Estudi de la influència del gen de l'apolipoproteïna C-III sobre el perfil lipoproteic d'individus hiperlipèmics i normolipèmics pertanyents a famílies diagnosticades d'hiperlipèmia familiar combinada.</p> <p><u>Ribalta J</u>, La Ville AE, Vallvé JC, Turner PR, Humphries SE, Masana L. <i>A variation in the apolipoprotein C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hyperlipidemia. J Lipid Res.</i> (En premsa)</p>	

4.4. ESTUDI 3	129
Estudi de les concentracions plasmàtiques de retinol en individus afectes d'hiperlipèmia familiar combinada.	
<u>Ribalta J</u> , La Ville AE, Girona J, Vallvé JC, Masana L. <i>Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia.</i> (En revisió pel consell editorial de la revista <i>Arch Intern Med</i>).	
4.5. ESTUDI 4	145
Estudi de les lipoproteïnes d'alta densitat i la seva relació amb l'activitat de l'enzim LCAT en pacients amb hiperlipèmia familiar combinada .	
<u>Ribalta J</u> , La Ville AE, Vallvé JC, Girona J, Masana L. <i>Lecithin :cholesterol acyltransferase activity is not altered in familial combined hyperlipidemia.</i> (En revisió pel consell editorial de la revista <i>Atherosclerosis</i>)	
4.6. Resum dels resultats	167
5. Conclusions globals	169
6. Referències bibliogràfiques	173

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La cardiopatia isquèmica, l'arteriosclerosi i les hiperlipoproteinèmies.

Les malalties cardiovasculars són la principal causa de morbiditat i mortalitat en el món occidental. En podem destacar l'infart de miocardi, l'angina de pit i la mort sobtada. Totes aquestes patologies són el resultat d'un procés de lenta i progressiva oclusió de les artèries que s'anomena arteriosclerosi. L'inici i el desenvolupament de l'arteriosclerosi estan determinats per la interacció de factors genètics i ambientals vinculats al control de la pressió arterial, el sistema de coagulació, la resposta immunitària, la resposta inflamatòria i, de forma especialment rellevant, el metabolisme dels lípids. Alteracions d'aquest metabolisme poden resultar en elevacions en les concentracions de lípids en sang que comporten, a la seva vegada, un augment considerable del risc cardiovascular. Encara que el metabolisme dels lípids es pot veure fortament alterat per factors ambientals com la dieta, un percentatge important de la població presenta alteracions que tenen una base genètica. Una de les més freqüents, i sobre la que tracta aquest estudi, és la que es coneix amb el nom d'Hiperlipèmia Familiar Combinada.

1.2. Elements del transport i metabolisme dels lípids.

1.2.1. Lipoproteïnes

Concepte

Les lipoproteïnes són complexos macromoleculars que tenen la funció de vehiculitzar lípids insolubles en el plasma. Transporten els lípids des del budell i el fetge cap als teixits perifèrics i els retornen cap al fetge per a la seva eliminació en forma de sals biliars.

La partícula lipoproteica té un nucli hidròfob format per lípids no polars, triglicèrids i colesterol esterificat, i una superfície hidròfila que conté colesterol no esterificat, fosfolípids i proteïnes. Aquestes proteïnes reben el nom d'apoproteïnes o apolipoproteïnes.

Classificació

La classificació de les lipoproteïnes es basa en les seves característiques físicoquímiques i el seu comportament en els processos de purificació. Aquests estan basats en la seva mobilitat electroforètica o bé en la seva densitat.

En electroforesi realitzada a pH bàsic es poden observar tres bandes mòbils i una d'estàtica. Les β -lipoproteïnes amb mobilitat β -globulina, les pre- β -lipoproteïnes amb mobilitat α_2 -globulina i les α -lipoproteïnes amb mobilitat α_1 -globulina. La banda estàtica correspon als quilomicrons.

A partir d'ultracentrifugació del plasma en gradient de densitat o seqüencialment s'obtenen les següents classes de lipoproteïnes: els **quilomicrons** de densitat inferior a 0.95 g/ml; les **lipoproteïnes de molt baixa densitat** (*Very low density lipoproteins*, *VLDL*) de densitat entre 0.95 g/ml i 1.006 g/ml; les **lipoproteïnes de densitat intermèdia** (*Intermediate density lipoproteins*; *IDL*) de densitat entre 1.006 i 1.019 g/ml; les **lipoproteïnes de baixa densitat** (*Low density lipoproteins*, *LDL*) de densitat entre 1.019 i 1.063 g/ml i les **lipoproteïnes d'alta densitat** (*High density lipoproteins*; *HDL*) amb densitat entre 1.063 i 1.210 g/ml. Les HDL poden diferenciar-se en HDL₂ de densitat entre 1.063 i 1.125 g/ml i HDL₃ de densitat entre 1.125 i 1.210 g/ml. Es detecta també una altra classe lipoproteica, quantitativament poc important, i que se separa entre les densitats 1.080 i 1.100 g/ml anomenada lipoproteïna (a) (Lp(a)) (Berg K, 1963). (Taula 1)

Cadascuna de les bandes obtingudes per electroforesi es correspon unívocament amb les diferents classes de lipoproteïnes separades per ultracentrifugació, excepte en el cas de la Lp(a).

TAULA 1. PROPIETATS FÍSQUES DE LES LIPOPROTEÏNES PLASMÀTIQUES

	Mobilitat electroforètica	Diàmetre (nm)	Pes molecular	Densitat (Kg/L)
QUILOMICRONS	origen	75-1200	4×10^6	0.93
VLDL	pre- β	30-80	$10-80 \times 10^6$	0.93-1.006
IDL	pre- β	25-35	$5-10 \times 10^6$	1.006-1.019
LDL	β	18-25	2.3×10^6	1.019-1.063
Lp(a)	β - pre- β	26-30	$4-8 \times 10^6$	1.050-1.100
HDL ₂	α	9-12	3.6×10^5	1.063-1.125
HDL ₃	α	5-9	1.7×10^5	1.125-1.210

Extret de Gotto AM *et al*, 1986; Dolphin PJ, 1985.

Descripció

Quilomicrons : Són lipoproteïnes d'origen intestinal d'un gran mida. Més del 85% del pes de la lipoproteïna correspon als triglicèrids mentre que només un 2% és proteïna. Els quilomicrons transporten els lípids absorbits en el budell cap al fetge i la resta de teixits. A més de triglicèrids poden transportar colesterol, altres esterols de la dieta i vitamines liposolubles. La vida mitjana dels quilomicrons en plasma és de l'ordre de minuts. La seva degradació resulta en l'aparició de **quilomicrons residuals** que són comparativament més petits i més rics en colesterol que les partícules de les que es deriven. Dos trets composicionals diferencien els quilomicrons de la resta de lipoproteïnes. Per una banda

posseeixen l'apolipoproteïna (apo) B-48 que se sintetitza exclusivament en els enteròcits. A més, són les úniques lipoproteïnes que contenen ésters de retinol. (Havel RJ, 1994).

Lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) : Les VLDL són d'origen hepàtic. Els seu component majoritari, els triglicèrids, representa el 55% de la massa de la partícula. La seva funció més rellevant és la de transportar triglicèrids des del fetge a la resta de teixits. Juntament amb els quilomicrons constitueixen les anomenades "lipoproteïnes riques en triglicèrids". Contenen una molècula de l'apo B-100 i són més pobres en apos A que els quilomicrons. A mesura que les VLDL es van degradant disminueix el seu contingut en apos E, C i triglicèrids. Mitjançant tècniques com la cromatografia en gel d'agarosa amb heparina o anticossos contra l'apo E s'han pogut detectar varies subpoblacions de VLDL amb diferent contingut en apo E i també diferent comportament metabòlic (Gómez Coronado D *et al*, 1989).

Lipoproteïnes de densitat intermèdia (IDL) : Són minoritàries en condicions fisiològiques normals i producte de la degradació plasmàtica de les VLDL. Anàlisis en gels de poliacrilamida permeten diferenciar dues subpoblacions que, tal com succeeix amb les VLDL, són funcionalment diferents. La primera d'elles, les IDL-1, són catabolitzades a LDL. Les IDL-2 no entren en aquesta ruta catabòlica i esdevenen un factor important de risc cardiovascular (Krauss RM *et al*, 1987).

Lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) : El seu component majoritari és el colesterol esterificat que representa un 40% del pes sec de la partícula. La seva funció principal és el transport de colesterol entre teixits. El seu únic component proteic és l'apo B-100, de la qual tenen una sola molècula. Al igual que amb els anteriors tipus lipoproteïcs es poden diferenciar subpoblacions de LDL. En concret tres, LDL-I, LDL-II i LDL-III. És interessant constatar que l'abundància d'aquestes subpoblacions està determinada genèticament (Austin MA *et al*, 1988). Mentre que en el 85% de la població predominen les LDL-II (patró A), les LDL-III (patró B) estan associades a un major risc cardiovascular (O'Brien R, 1994).

Lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) : Són les lipoproteïnes de menor mida i major relació superfície/volum i presenten una alta proporció de proteïnes i fosfolípids comparat amb ésters de colesterol. El número d'aquestes partícules en plasma és de 10-20 vegades

superior al dels altres tipus lipoproteics. Hi ha tres subpoblacions que poden identificar-se per ultracentrifugació (Levy RI *et al*, 1965). Les HDL₁ són la subpoblació minoritària. Són les de major mida, relativament riques en colesterol i amb un alt contingut en apo E. Les HDL₂ són considerablement més petites i la seva proteïna majoritària és l'apo A-I. Les HDL₃ són les més denses i abundants. Algunes HDL₃ només tenen apo A-I, d'altres només apo A-II i la resta totes dues apoproteïnes (Cheung MC *et al*, 1984). També poden contenir apos C, D i E. Mitjançant ultracentrifugació en gradient o electroforesi en gel de poliacrilamida es poden detectar noves subpoblacions: HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b} i HDL_{3c} de menor a major densitat i de major a menor mida.

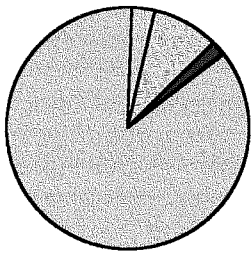
En la Figura 1 es detalla el contingut en lípids i proteïna de cadascuna d'aquestes fraccions lipoproteiques.

1.2.3. Apolipoproteïnes

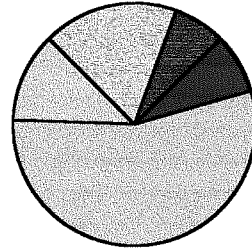
Les apolipoproteïnes (apos) tenen un paper molt important en el metabolisme dels lípids mitjançant les seves tres funcions més destacades: mantenen l'estructura de les lipoproteïnes i faciliten així el seu transport a través del medi intern, determinen el destí dels lípids en ser algunes d'elles reconegudes per receptors específics de membrana i modulen l'activitat de determinats enzims (Taula 2). Les apolipoproteïnes pertanyen a una mateixa família genètica que es caracteritza per presentar repeticions en tàndem de 11 codons (Luo C-C *et al*, 1986).

Apolipoproteïna A-I: És l'apolipoproteïna més abundant en el plasma humà (100-150 mg/dl). En ser el component majoritari de les HDL la seva concentració és indicativa de la d'aquesta lipoproteïna. L'apo A-I se sintetitza en el fetge i el budell en forma de pre-pro-pèptid del qual s'escindeix un pèptid senyal de 18 aa donant lloc a una pro-apo A-I de 249 aa que surt a la circulació. La forma madura té 243 aa i un pes molecular de 28 kD.

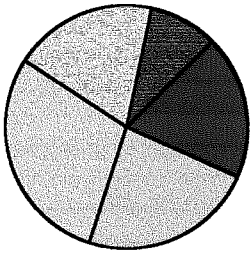
A més d'estabilitzar les HDL l'apo A-I realitza dues funcions importants. Per una banda és l'activador de la LCAT (*Lecithin cholesterol acyl transferase*), l'enzim que esterifica el colesterol que transporta la pròpia HDL en la seva superfície (Nichols AV *et al*, 1985). A més, se li atribueix el paper de lligand per un receptor o acceptor de membrana (Oram JF *et al*, 1983) que s'ha identificat recentment com a membre de la família dels receptors *Scavenger* (Acton S *et al*, 1996).



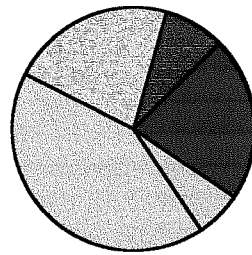
Quilomicró



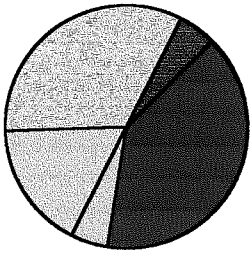
VLDL



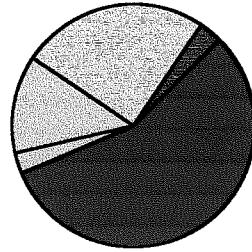
IDL



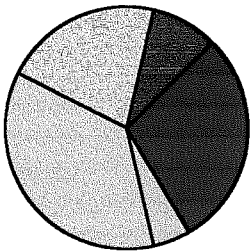
LDL



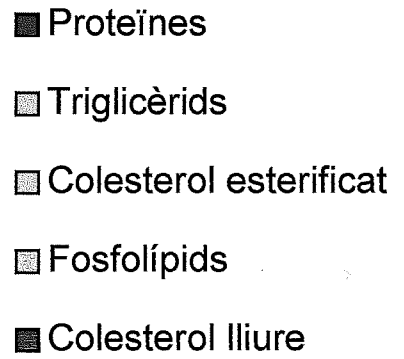
HDL2



HDL3



Lp(a)



El gen que codifica per l'apolipoproteïna A-I es troba en el cromosoma 11 formant part de l'agregat genètic AI-CIII-AIV (Figura 3).

Apolipoproteïna A-II : És la segona proteïna més abundant de les HDL i, a diferència de l'apo A-I, la seva concentració no es correlaciona amb la de la HDL. La seva concentració en plasma humà oscil·la entre 30 i 50 mg/dl. Se sintetitza principalment en el fetge en forma d'un pre-pro-pèptid del que s'escindeix un pèptid senyal de 18 aa. El pro-pèptid que en resulta surt al plasma on és processat per una tiolproteasa (Gordon JI *et al*, 1986) per donar una apo A-II madura de 77 aa. L'apo A-II circula en sang en forma d'un dímer de 17.4 kD. També pot formar un heterodímer amb l'apo E. Es detecten varies isoformes de l'apo A-II segons el seu contingut en àcid siàlic, la forma més abundant és la que no en presenta.

Potser degut a la seva gran afinitat pels fosfolípids, l'apo A-II és capaç de desplaçar a l'apo A-I en la superfície de les HDL (Mahley RW *et al*, 1984). No està clara la relació que hi pugui haver entre aquest fet i la capacitat que l'apo A-II té d'inhibir la LCAT *in vitro*. Experiments amb animals transgènics per l'apo A-II humana suggereixen que un augment relatiu d'aquesta apolipoproteïna en la HDL s'acompanya d'una disminució de la seva eficàcia per a realitzar el transport revers de colesterol (Schultz JR *et al*, 1992).

El gen que codifica per l'apolipoproteïna A-II es troba al cromosoma 1.

Apolipoproteïna A-IV : S'associa als quilomicrons i a la HDL tot i que la major part es troba lliure, no associada a lipoproteïnes (Dolphin PJ, 1985). La seva concentració en plasma és d'uns 15 mg/dl. Se sintetitza al budell en forma de pre-apo A-IV de la que s'escindeix un pèptid senyal de 20 aa que dona una apo A-IV madura de 376 aa amb un pes molecular de 45 kD. Tot i que aquesta proteïna no es glicosila se'n poden trobar diverses isoformes en la naturalesa.

Se li atribueix una capacitat activadora de la LCAT (Ohta T *et al*, 1984) i un paper facilitador de l'intercanvi d'apo C-II entre HDL i quilomicrons d'importància en la hidròlisi dels triglicèrids. Estudis amb animals han posat de manifest una certa capacitat de l'apo A-IV de regular la gana i per tant la ingesta d'aliment (Merrill AH Jr, 1993).

El gen que codifica l'apolipoproteïna A-IV es troba al cromosoma 11.

Apolipoproteïna B : Hi ha dues formes d'apo B, l'apo B-48 i l'apo B-100 (Kane JP *et al*, 1983). L'apo B-48 es troba en els quilomicrons i l'apo B-100 és constituent de les VLDL, IDL i LDL (Olofsson S-O *et al*, 1987). L'apo B-48 se sintetitza exclusivament a l'enteròcit mentre que l'apo B-100 és de procedència hepàtica. L'apo B-100, que és una de les proteïnes monomèriques més grans que es coneixen, té 4.536 aa i un pes molecular de 512 kD. L'apo B-48 té 2.152 aa i un pes molecular que és el 48% del de l'apo B-100 (Marcel YL *et al*, 1982). Totes dues estan codificades pel mateix gen però el RNA missatger (RNAm) resultant és processat de forma diferent en fetge o budell (Chen S-H *et al*, 1987). En el budell el RNAm pateix una transformació que consisteix en un canvi de citosina per uracil en la posició 2.153 i que genera un codó de parada prematur. Aquest canvi es introduït per un enzim que rep el nom de APOBEC-1 (*Apo B mRNA editing component-1*) (Teng BB *et al*, 1993).

Tant l'apo B-100 com l'apo B-48 són essencials per la síntesi i secreció de les lipoproteïnes de les que formen part. A més, però, l'apo B-100 té un domini que interactua amb el receptor LDL (rLDL) i condiona la destinació metabòlica d'aquestes partícules. Aquest domini se situa entorn els aminoàcids 3.352 i 3.371 i, per tant, no és present a l'apo B-48 (Caladaras C *et al*, 1986). Les apos B, a diferència de totes les altres apolipoproteïnes, no es transfereixen entre lipoproteïnes (Schumaker VN *et al*, 1994).

El gen que codifica per les apolipoproteïnes B es troba al cromosoma 2.

Apolipoproteïnes C : Aquesta família inclou tres polipèptids de baix pes molecular : les apos C-I, C-II i C-III. Es troben en VLDL, quilomicrons i HDL i es transfereixen amb facilitat entre aquestes lipoproteïnes. Poden sintetitzar-se al budell tot i que la seva síntesi és majoritàriament hepàtica. També se sintetitzen amb un pèptid senyal que és escindit intracel·lularment.

L'apolipoproteïna C-I té 57 aa i un pes molecular de 6.500 D, per tant és la més petita de les apolipoproteïnes. És una apolipoproteïna minoritària no glicosilada que es troba a unes concentracions aproximades de 6 mg/dl en plasma. S'ha observat que *in vitro* activa la LCAT i inhibeix la lipoproteïna lipasa (LPL) (Jackson RJ *et al*, 1976). El gen que la codifica es troba al cromosoma 19.

L'apolipoproteïna C-II se segrega a la circulació con una molècula de pro-apo C-II que pot tenir una (C-II-1) o dues (C-II-2) molècules d'àcid siàlic. En el plasma perd l'àcid siàlic (C-II-0) donant lloc a la seva forma majoritària de 79 aa i 8.850 D de pes molecular.

Curiosament, aquesta no és la forma madura de la proteïna (C-II-1/2) que s'obté després de la hidròlisi de 6 aa de l'extrem N terminal. Les concentracions d'apo C-II en plasma ronden els 4 mg/dl. En la seva regió C-terminal presenta un domini d'interacció amb la lipoproteïna lipasa de la qual n'és el cofactor activador (LaRosa JC *et al*, 1970 ; Havel RJ *et al*, 1970). El gen que codifica per l'apolipoproteïna C-II es troba en el cromosoma 19.

L'apolipoproteïna C-III és la més abundant de les apos C (8-15 mg/dl) i la trobem a les VLDL i HDL. Té 79 aa i pot estar associada a 1 o 2 molècules d'àcid siàlic. L'apo C-III aconsegueix dues funcions importants, modula la interacció entre l'apo E i els receptors hepàtics (Shelburne F *et al*, 1980) i pot inhibir, almenys *in vitro*, l'activitat de la LPL (Cardin AD *et al*, 1982). El gen que la codifica es troba al cromosoma 11 formant part de l'agregat genètic (*cluster*) AI-CIII-AIV (Figura 3).

Apolipoproteïna D : Inicialment se la va denominar apo A-III i és una apolipoproteïna minoritària (5-6 mg/dl). La seva síntesi és hepàtica i té un pes molecular de 32 kD (Drayna DT *et al*, 1987). Es troba associada a les HDL de major densitat (HDL₃).

La seva funció podria estar relacionada amb l'enzim LCAT.

El gen que la codifica es troba al cromosoma 3.

Apolipoproteïna E : Té 299 aa i un pes molecular de 34 kD. La seva concentració en plasma és de 3-6 mg/dl i es troba present a totes les lipoproteïnes excepte la LDL. Se sintetitza en el fetge i d'altres teixits i de manera escassa en el budell. Tot i que se segrega al plasma sialitzada, el 80% de les molècules perden l'àcid siàlic. Hi ha diferents polimorfismes de l'apo E en humans que provoquen canvis en un o més aminoàcids. Aquests poden ser fàcilment identificats per isoelectroenfocament ja que les variants proteiques presenten diferents punts isoelèctrics (pI). Les isoformes més freqüents en humans són les anomenades E2, E3 i E4, respectivament (Warnick GR *et al*, 1979 ; Utermann G *et al*. 1984a,b).

L'apo E pot reconèixer el LRP (*Low density lipoprotein receptor related protein*) també anomenat "receptor de remanents". El domini de reconeixement per aquest receptor es troba entre els aminoàcids 140-150. L'apo E també és reconeguda pel receptor LDL i amb major afinitat que la pròpia apo B-100 ja que el rLDL pot reconèixer 4 molècules d'apo E simultàniament. L'afinitat pel rLDL depèn de la isoforma d'apo E. Així, les formes E4 i E2

tenen major i menor afinitat pel rLDL, respectivament, que la forma més comú E3. *In vitro*, l'apo E és capaç d'activar la LCAT i d'inhibir la LPL.

El gen que la codifica es troba al cromosoma 19.

Apolipoproteïna (a) : És un pèptid molt polimòrfic en humans que pot presentar pesos moleculars des de 400 fins 800 kD (Fless GM *et al*, 1984). Se sintetitza en el fetge i en el plasma s'associa a l'apo B-100 mitjançant un pont disulfur conformant l'anomenada lipoproteïna (a) o Lp(a) (Ehnholm C *et al*, 1972). La concentració de Lp(a) en plasma és inversament proporcional a al mida de l'apo (a) sintetitzada. Aquesta relació s'explica per diferències en la producció i no pas en el catabolisme (Rader DJ *et al*, 1994) d'aquesta partícula. L'apo (a) presenta una alta homologia amb el plasminogen (McLean JW *et al*, 1987). Conté dos tipus de dominis semblants als *Kringle domains* IV i V del plasminogen (Eaton DL *et al*, 1987), concretament, una còpia del *kringle* 5 i vàries del *kringle* 4. Això permet que l'apo (a) competeixi amb el plasminogen per la unió als seus acceptors cel·lulars la qual cosa redueix la producció de plasmina. La seva homologia estructural també li permet d'enllaçar-se amb la fibrina i el fibrinogen. La inhibició que la Lp(a) exerceix sobre la capacitat fibrinolítica de l'organisme pot significar un allargament de la vida del trombo i podria relacionar-se amb el risc cardiovascular associat a aquesta partícula.

1.2.4. Enzims i proteïnes transportadores

HMG-CoA Reductasa : Abreviatura de 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzim A Reductasa (EC 1.1.88). És l'enzim clau en la síntesi plasmàtica de colesterol. La seva activitat està regulada per les concentracions intracel·lulars d'esterols. Aquesta regulació es pot dur a terme tant transcripcionalment com post-transcripcional (Lutton C, 1991).

LCAT (*Lecithin :Cholesterol AcylTransferase*) : És un enzim de 59 kD sintetitzat al fetge. Catalitza la transferència de l'àcid gras en posició 2 de la fosfatidil colina o lecitina al OH-3 del colesterol. El seu activador és l'apolipoproteïna A-I (Albers JJ *et al*, 1981). També té activitat lisolecitina aciltransferasa, fosfolipasa i colesterol esterasa. La LCAT viatja en el plasma associada a les HDL i la seva deficiència s'associa a concentracions molt baixes d'aquesta lipoproteïna (Rader DJ *et al*, 1994). La sobreexpressió de la LCAT en animals

TAULA 2. PROPIETATS FÍSQUES, DISTRIBUCIÓ I FUNCIÓ DE LES APOPOPROTEÏNES

Apoproteïna	PM (kD)	Nº aa	Origen	Distribució	Funció
A-I	28	243	Budell, fetge	HDL, Qn	Activació LCAT Unió receptor
A-II	17	2x77	Budell, fetge	HDL, Qn	?
A-IV	46	376	Budell	HDL, Qn	Activació LCAT Intercanvi apo C-II Regulació gana
(a)	400 a 800		Fetge	Lp(a)	?
B-100	550	4.536	Fetge	VLDL, LDL	Estructural Unió receptor B/E
B-48	275	2.152	Budell	Qn, Qr	Estructural
C-I	7	57	Fetge	Q, VLDL, HDL	Activació LCAT ? Inhibició LPL ?
C-II	9	79	Fetge	Q, VLDL, HDL	Activació LPL
C-III	9	79	Fetge	Q, VLDL, HDL	Inhibició LPL i receptor apo B/E i E
D	33		Fetge	HDL	Regulació LCAT ?
E	34	299	Fetge	Q, VLDL, HDL	Unió receptor E i B/E

Qn = Quilomicró naixent ; Qr = Quilomicró residual.

Actualitzat de Dolphin PJ, 1985

transgènics comporta un augment molt important dels ésters de colesterol de les HDL i un enlentiment del catabolisme de les apos A-I i A-II (Francone OL *et al*, 1995).

LPL (Lipoproteïna Lipasa): La LPL (EC 3.1.1.34) és una glicoproteïna de 67 kD que se sintetitza a diversos teixits diferenciats (múscul esquelètic, glàndula mamària, teixit adipós) però no al fetge. La seva funció més reconeguda és la hidròlisi dels triglicèrids transportats per quilomicrons i VLDL que realitza en forma de dímer no covalent (Osborne JC *et al*, 1985). Els seu activador és l'apolipoproteïna C-II i el seu inhibidor, almenys *in vitro*, l'apolipoproteïna C-III (Cardin AD *et al*, 1982). Actua ancorada a la superfície luminal de les cèl·lules endotelials que, d'altra banda no poden sintetitzar-la. Altres funcions de la LPL relacionades amb el metabolisme lipoproteic són la seva capacitat de retenir lipoproteïnes en la paret vascular, de regular la secreció de lipoproteïnes (Williams KJ *et al*, 1991) i d'actuar com a lligand del LRP (Nykjaer A *et al*, 1993). La sobreexpressió de la LPL en animals transgènics resulta en una disminució dels triglicèrids i un augment del colesterol LDL (Liu M-S *et al*, 1994).

Lipasa hepàtica : La lipasa hepàtica (EC 3.1.1.3) és un pèptid de 53 kD de pes molecular que hidrolitza triglicèrids i fosfolípids i es troba a les membranes cel·lulars dels sinusoides hepàtics. No necessita cofactors apoproteics i la seva síntesi sembla estar regulada pel contingut intracel·lular hepàtic de colesterol. La seva funció està relacionada amb la conversió hepàtica d' IDL a LDL (Nozaki S *et al*, 1986), amb facilitar la retirada de quilomicrons remanents del plasma (Diard P *et al*, 1994) i amb la conversió de HDL₂ a HDL₃. La sobreexpressió de la lipasa hepàtica en animals transgènics (Fan J *et al*, 1994) resulta en una clara disminució de les lipoproteïnes riques en colesterol.

CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein): La proteïna de transferència d'ésters de colesterol és un pèptid glicosilat de 476 aa i un pes molecular de 70kD (Hesler C *et al*, 1987). La CETP s'expressa en fetge, budell i sobretot a la melsa i teixit adipós (Jiang X *et al*, 1991). La CETP fa de mitjancer en els processos de transferència de lípids neutres en el plasma humà. Això inclou la transferència recíproca d'ésters de colesterol i triglicèrids entre HDL i LDL i VLDL (Yen FY *et al*, 1989) i de fosfolípids entre lipoproteïnes. La deficiència d'aquesta proteïna s'associa a nivells elevats de colesterol HDL (Inazu A *et al*, 1990) i aquesta associació s'ha pogut constatar també amb l'estudi d'animals transgènics per la

CETP (Marotti KR *et al*, 1992). La comprensió que es té sobre la funció biològica d'aquesta proteïna és encara molt incerta.

1.2.5. Receptors

Receptor LDL o receptor apo B/E : El descobriment d'aquest receptor va obrir el camí per què Goldstein i Brown desvetllessin els mecanismes involucrats en l'homeostasi del colesterol (Brown MS i Goldstein JL, 1986). El receptor LDL (rLDL) és una glicoproteïna de membrana de 160 kD i 839 aa, abocada a l'espai extracel·lular. És receptor de dues proteïnes, l'apo B-100, única proteïna de les LDL i l'apo E, present als quilomicrons, VLDL, IDL i alguna subclasse de HDL. Les lipoproteïnes riques en apo E tenen molta més afinitat pel rLDL que les riques en apo B-100 (Innerarity TL *et al*, 1978). Un cop completada la seva síntesi, que es dona a totes les cèl·lules, els receptors són desplaçats a la superfície cel·lular on es reuneixen en uns pous recoberts de la proteïna clatrina (*Coated pits*). Aquí és on reconeixen el seu lligand que posteriorment internalitzen en uns endosomes o pous recoberts (*Coated endosomes*). Els receptors es dissocien d'aquesta estructura i són reciclats tornant a la superfície cel·lular. Aquesta operació pot repetir-se unes 100 vegades. En aquest procés hi intervenen els 5 dominis en que es divideix el receptor. El domini 1 té 292 aa i és el responsable de la unió al lligand. El domini 2, que té 400 aa, presenta homologia amb l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) i la seva alteració afecta la unió amb el lligand i la taxa de recanvi del receptor. El domini 3 té 58 aa i és punt d'unió de cadenes oligosacàrides. El domini 4 té 22 aa hidròfobs que travessen la membrana plasmàtica (Brown MS *et al*, 1986). El cinquè domini té 50 aa responsables de les interaccions proteïna-proteïna que manté amb la clatrina dels pous recoberts (Davis CG *et al*, 1987)

L'expressió del rLDL està regulada per diversos mecanismes. La regulació per producte final (*Down regulation*) que exerceix el colesterol sembla ser la més important (Brown MS *et al*, 1986). A més cal considerar la regulació hormonal (Havel RJ, 1988) i la regulació per fosforilació depenent de proteïnes quinasa (Kishimoto A *et al*, 1987).

El receptor LDL és el vehicle de captació de LDL, i per tant de colesterol, de les cèl·lules dels teixits. Aquest punt queda plenament confirmat amb l'estudi d'animals que sobreexpressen el rLDL (Hoffmann SL *et al*, 1988). Encara que degut a la seva capacitat d'unir apo E el rLDL pot actuar com a receptor de remanents (Willnow E *et al*, 1994),

aquesta no és una de les seves funcions principals tal com demostra el fet que els individus amb deficiència de rLDL no acumulin partícules remanents.

LRP (LDL receptor-related protein): Estudis *in vivo* i *in vitro* indicaven que els quilomicrons remanents eren eliminats per les cèl·lules hepàtiques a través d'un receptor diferent del receptor B/E (Mahley RW *et al*, 1981). Aquest va ser identificat com una proteïna de membrana molt semblant al receptor apo B/E (Beisiegel U *et al*, 1989) i al receptor de l'alfa-2-macroglobulina activada (Kristensen T *et al*, 1990). El LRP és una proteïna de membrana de 4.544 aa i un pes molecular d'uns 500 kD que conté seqüències reiterades del receptor apo B/E. El LRP interacciona de forma directa amb l'apo E (Beisiegel U *et al*, 1989), la LPL i la lipasa hepàtica (Nykjaer A *et al*, 1994). La unió del LRP amb el seu lligand és fortament dependent de Ca^{2+} . Igual que el receptor apo B/E, la seva activitat provoca acumulació d'ésters de colesterol però aquests no regulen la seva expressió en la superfície cel·lular (Kowal RC *et al*, 1989). Associada al LRP s'ha identificat una proteïna de 39 kD anomenada RAP (*Receptor-Associated Protein*) que regula la seva activitat. Totes dues proteïnes són força abundants en el cervell (Bu G *et al*, 1994).

Receptor Scavenger: A finals dels anys 70 Goldstein i els seus col·laboradors van descobrir un receptor que *in vitro* reconeixia les LDL acetilades (Goldstein JL *et al*, 1979). Més tard es veié que tenia afinitat per qualsevol modificació que representés un fort increment de les càrregues negatives de la LDL. Això fa que reconeguin un ventall molt ampli de lligands i d'aquí els ve el nom de *scavenger*, o sigui, recollidor de deixalles. Es divideixen en dos tipus, I i II. Les funcions fisiològiques i patofisiològiques d'aquests receptors no estan ben establertes però es creu que participen en tres processos fonamentals: arteriosclerosi, adhesió i defensa. En l'arteriosclerosi el seu paper està sobretot relacionat amb l'acumulació de lípids a l'íntima arterial. En macròfags madurs, aquests receptors poden estar involucrats en el reconeixement entre cèl·lules o amb la matriu extracel·lular (Krieger M, 1992).

Receptor VLDL (VLDLr): El receptor VLDL va ser inicialment identificat en conills (Shimano H *et al*, 1994) i posteriorment en humans (Sakai J *et al*, 1994) com un receptor de lipoproteïnes que contenen apo E i amb una gran semblança amb el receptor LDL. S'expressa en teixits diferenciats (múscul esquelètic, cor, ronyó) que metabolitzen àcids

grassos com a font d'energia i gairebé no s'expressa al fetge (Webb JC *et al*, 1994). La transcripció del gen que codifica aquest receptor no està regulada pels esterols. La seva funció en mamífers és encara incerta.

Receptor HDL : De l'estudi de la unió de les HDL amb les membranes de diferents tipus cel·lulars (Reichil D *et al*, 1989) es despenia que aquesta unió estava mitjançada per un receptor. Aquest receptor ha estat identificat com un receptor *scavenger* de la classe B anomenat SR-BI (Acton S *et al*, 1996) que té una molt elevada afinitat per les HDL i que s'expressa sobretot en el fetge.

1.3. Metabolisme de les lipoproteïnes

Un 80% del carboni i l'hidrogen dels substrats energètics es troba en forma d'algun intermediari lipídic abans de ser oxidats i donar els productes finals. La major part d'aquests intermediaris lipídics viatgen en la sang en forma d'àcids grassos lliures o triglicèrids. Aquest trànsit el realitzen associats a proteïnes. L'associació lípid-proteïna més simple és la dels àcids grassos lliures amb l'albumina mentre que del transport de lípids més complexes se n'encarreguen les lipoproteïnes. Les lipoproteïnes acompleixen quatre funcions bàsiques relacionades amb el transport dels lípids. Les dues primeres són el transport de triglicèrids d'origen exògen i endògen, respectivament, als teixits. La tercera és el transport de colesterol al teixits. La quarta és la retirada de l'excés de colesterol d'aquests teixits.

1.3.1 Transport dels lípids exògens

És la ruta de transport que segueixen els lípids que ingerim amb la nostra dieta i que duen a terme les lipoproteïnes conegudes com quilomicrons.

Els triglicèrids de la dieta són digerits per la lipasa pancreàtica per donar β -monoglicèrids i àcids grassos lliures que són absorbits pels enteròcits. Els enteròcits, a més, absorbeixen colesterol lliure producte de la hidròlisi dels ésters de colesterol d'origen animal. Aquests lípids absorbits comencen a associar-se a l'apolipoproteïna B-48 immediatament després de la seva traducció i quan aquesta abandona el reticle endoplasmàtic (RE). Un augment en la ingesta de triglicèrids no implica un augment en la síntesi d'apo B-48 (Imaizumi K *et al*,

1978) sinó la secreció d'unes partícules més voluminoses. En un segon pas, el complex apo B-48-lípids es fusionarà amb una vesícula lipídica en un procés dirigit per la proteïna MTP (*Microsomal Triglyceride Transfer Protein*) (Wetterau JR *et al*, 1992). La partícula resultant serà transportada a l'aparell de Golgi on serà enriquida en fosfolípids i apos A (AI, AII i AIV) per donar lloc al **quilomicro naixent**. Aquest abandona la cèl·lula i passa a la limfa on immediatament intercanvia apo A per apos C i E amb les HDL previ al seu pas definitiu al torrent sanguini.

La hidròlisi d'aquests quilomicrons té lloc a l'endoteli vascular on es dona una complexa interacció entre el quilomicro, la lipoproteïna lipasa (LPL) i els proteoglicans endotelials (Olivecrona T *et al*, 1993). Aquesta hidròlisi resulta en l'alliberament d'àcids grassos i glicerol i és responsable de la pèrdua d'un 70% del contingut inicial en triglicèrids del quilomicro i de la disminució del diàmetre de la partícula. A més, hi ha una cessió de fosfolípids i colesterol lliure a les HDL dirigit per una proteïna transferidora de fosfolípids (LPT-II) (Tollefson JH *et al*, 1988) relacionada evolutivament amb la CETP. Aquesta transferència amb les HDL també afecta les apos C i E. La partícula resultant d'aquest procés, més pobre en triglicèrids i apos C i E, s'anomena **quilomicro remanent**. El temps que transcorre entre la secreció del quilomicro i la seva transformació en quilomicro remanent és, en un individu normal, d'uns 15 minuts (Stalenhoef AFH *et al*, 1984).

Els quilomicrons remanents són retirats de la sang pels hepatòcits (Shafi S *et al*, 1994). Aquest procés d'endocitosi és molt eficaç i està dirigit per receptors que reconeixen l'apo E. D'entre aquests, el LRP és el que es considera responsable de l'eliminació dels quilomicrons remanents (Brown MS *et al*, 1991). La lipasa hepàtica facilita el reconeixement entre quilomicro i receptor enriquint el primer en apo E (Sultan F *et al*, 1990). A diferència del que passa amb els remanents de VLDL, no es formen "lipoproteïnes filles" a partir dels quilomicrons remanents.

1.3.2. Transport dels triglicèrids endògens

És la ruta de transport dels triglicèrids de síntesi hepàtica que viatgen en les lipoproteïnes conegudes com VLDL.

La via de la VLDL permet que el fetge exporti triglicèrids, colesterol, apolipoproteïnes intercanviables i tocoferol. Els àcids grassos emprats en la síntesi de triglicèrids provenen

de diverses fonts la més important de les quals és la hidròlisi intracel·lular que té lloc en el teixit adipós. El regulador més potent d'aquesta hidròlisi és la insulina.

La VLDL humana conté una única còpia d'apo B-100 (Kane JP *et al*, 1994) i no conté apo B-48. Durant la traducció de l'apo B-100 alguns lípids se li associen. Aquesta associació lípid-proteïna determinarà que l'apo B-100 segueixi acumulant lípid per formar una VLDL o bé sigui degradada (Thrift RN *et al*, 1992). Igual que en el cas dels quilomicrons, la proteïna MTP és important en el progressiu acoblament de la VLDL. Un cop repleta de lípids, la VLDL passa a l'aparell de Golgi on es glicosilen les apolipoproteïnes (apo B-100, apo C i apo E). Des d'aquí la VLDL serà transportada a la membrana i alliberada a l'espai de Disse on comença l'intercanvi de fosfolípids i apolipoproteïnes amb les HDL.

Els augments en la síntesi de triglicèrids no fan augmentar la síntesi d'apo B-100 sinó la mida de les VLDL. Factors que afecten la síntesi i secreció de l'apo B-100 són la insulina (Patsch W *et al*, 1983), que les inhibeix, i els estrògens (Tam S-P *et al*, 1986), que les estimulen.

Un cop secretades, les VLDL són hidrolitzades per la LPL. La vida mitjana d'una VLDL en plasma és de 30 a 60 minuts (Stalenhoef AFH *et al*, 1984). La hidròlisi de les VLDL és modulada per l'apolipoproteïna C-III. L'apo C-III evita que la VLDL s'uneixi de forma prematura al receptor LDL. A mesura que la VLDL va perdent el seu contingut en triglicèrids també es va empobrint en apos C. Això fa que la LPL sigui cada cop menys eficaç. En aquest punt, la VLDL s'ha convertit en una IDL enriquida en ésters de colesterol. Aproximadament la meitat d'aquestes IDL, probablement les més riques en apo E, són eliminades pels receptors LDL hepàtics. La resta es convertiran en unes partícules encara més riques en ésters de colesterol anomenades LDL.

1.3.3. Transport centrífug de colesterol

És la ruta de transport del colesterol de síntesi hepàtica que viatja en les lipoproteïnes anomenades LDL.

La lipasa hepàtica és l'enzim responsable de convertir els remanents de VLDL en partícules LDL que només contenen un 3-6% de triglicèrids. La LDL, a l'igual que la VLDL, té una sola molècula d'apo B-100 tot i que aquesta presenta una conformació molt diferent en els dos casos (Chen GC *et al*, 1989).

TAULA 3. CLASSIFICACIÓ DE LES HIPERLIPOPROTEINÈMIES PRIMÀRIES.

Hiperlipoproteinèmia	Etiopatogènia	Base metabòlica	Prevalença
HIPERCOLESTEROLÈMIES PRIMÀRIES			
Hipercolesterolèmia familiar	Mutació receptor LDL	↓ Catabolisme LDL ↑ Síntesi LDL	1/500 Heterozigot 1/10 ⁶ Homozigot
Apoproteïna B-100 defectuosa familiar	Mutació apo B Residu 3.500	↓ Catabolisme LDL	≅ 1/500
Hipercolesterolèmia poligènica	Multifactorial genètica i ambiental	↓ Catabolisme LDL ↑ Síntesi LDL	≅ 2/100
Hiperlipèmia familiar combinada	Desconeguda	↑ Síntesi apo B	1/100
HIPERLIPÈMIES MIXTES			
Disbetalipoproteinèmia tipus III	Fenotip apo E _{2/2}	↓ Catabolisme IDL	1/10.000
Hiperlipèmia familiar combinada	Desconeguda	↑ Síntesi apo B	1/100
HIPERTRIGLICERIDÈMIES PRIMÀRIES			
Dèficit de LPL	Mutacions LPL	↓ Catabolisme Quilomicrons	1/10 ⁶
Dèficit d'apo C-II	Mutacions apo C-II	↓ Catabolisme Quilomicrons	≅ 1/10 ⁶
Hipertrigliceridèmia familiar moderada	Desconeguda	↓ Catabolisme VLDL	1/100
Hipertrigliceridèmia familiar greu	Desconeguda	↓ Catabolisme VLDL i quilomicrons	
Hiperlipèmia familiar combinada	Desconeguda	↑ Síntesi apo B	1/100

Modificat de Farreras P i Rozman C, 1995.

i les **secundàries**. Les formes secundàries són aquelles que no resulten d'alteracions pròpies del metabolisme lipoproteic tot i que sovint, però, coexisteixen amb formes primàries. En la Taula 3 es detallen les hiperlipèmies primàries, el seu mecanisme patogènic i la seva prevalença.

D'entre elles destaca, per la seva elevada prevalença entre la població general i pel poc coneixement que es té de la seva etiopatogènia, la **hiperlipèmia familiar combinada**.

1.5. Hiperlipèmia familiar combinada

La Hiperlipèmia familiar combinada (HLFC) va ser descrita per primera vegada el 1973 (Goldstein JL *et al*, 1973 ; Rose HG *et al*, 1973) com una síndrome dislipèmica detectada en famílies de supervivents d'infart agut de miocardi prematur. Entre els propis supervivents d'infart de miocardi, la HLFC va resultar ser l'alteració lipídica hereditària més freqüent (11.3%) (Goldstein JL *et al*, 1973). Aquesta alteració es caracteritzava per elevacions en el colesterol o els triglicèrids plasmàtics que també es podien presentar de forma combinada. A més, els individus afectes podien presentar alteracions associades com ara hipertensió, obesitat, diabetis o l'anomenada síndrome X, totes elles prevalent en la malaltia coronària.

Avui es considera a la HLFC com la Hiperlipèmia genètica més freqüent en l'home i com un dels factors més influents en el desenvolupament de la malaltia coronària prematura.

1.5.1. Característiques analítiques

L'analítica de la HLFC està típicament associada a elevacions en les fraccions VLDL i LDL i, molt rarament a quilomicronèmia (Brunzell JD *et al*, 1983). Seguint la classificació de Fredrickson (Taula 4) es poden presentar els fenotips IIa (elevacions de LDL), IIb (elevacions de VLDL i LDL) i IV (VLDL molt elevada) (Beaumont JL *et al*, 1970). Una de les característiques de la HLFC és que el patró lipoproteic varia entre els membres afectes de la família i fins i tot en el propi pacient al llarg del temps. Les alteracions en les lipoproteïnes no només afecten la seva concentració en plasma sinó també la seva composició. Així, les VLDL són més nombroses i petites. Les LDL presenten una heterogeneïtat de mides on predominen unes partícules petites i denses pobres en colesterol i riques en apo B-100 (Teng B *et al*, 1983). Les HDL es veuen afectades de forma variable encara que tendeixen a

estar reduïdes, sobretot en la fracció HDL₂ (Brunzell JD *et al*, 1983). Són particularment característics de la HLFC les alteracions composicionals de la LDL que afecten el seu contingut proteic (Hiperapobetalipoproteinèmia) i la seva mida (subfraccions de LDL).

TAULA 4. CLASSIFICACIÓ DE LES HIPERLIPOPROTEINÈMIES (OMS 1970).

Fenotip	Lipoproteïna acumulada	Hiperlipèmia predominant
Tipus I	Quilomicrons	Hipertrigliceridèmia
Tipus IIa	LDL	Hipercolesterolèmia
Tipus IIb	LDL i VLDL	Hipertrigliceridèmia Hipercolesterolèmia
Tipus III	IDL	Hipertrigliceridèmia Hipercolesterolèmia
Tipus IV	VLDL	Hipertrigliceridèmia
Tipus V	Quilomicrons i VLDL	Hipertrigliceridèmia

Extret de Farreras F, Rozman C, 1995.

Hiperapobetalipoproteinèmia : Se la va descriure inicialment com un augment desproporcionat del contingut d'apo B-100 de les LDL comparat amb el seu contingut en colesterol (Sniderman A *et al*, 1980). Ve definida per valors de LDL-*apo B* > 130 mg/dl i colesterol LDL < percentil 90 segons edat i sexe (Kwiterovich Jr PO *et al*, 1993) i pot trobar-se en pacients tant normotrigliceridèmics com hipertrigliceridèmics. La rellevància clínica de l'hiperapobetalipoproteinèmia queda patent en un estudi on se la descriu com el fenotip més freqüent (34%) entre individus amb malaltia coronària prematura (Kwiterovich Jr PO *et al*, 1993). En relació a la HLFC, una conseqüència important de la hiperapobetalipoproteinèmia és que resulta en unes LDL més petites, nombroses i denses (Teng B *et al*, 1983) que han estat identificades en aquests pacients (Brunzell JD *et al*, 1983).

Subclasses de LDL : Mitjançant electroforesi de poliacrilamida en gradient, Austin i col·laboradors (Austin MA *et al*, 1986 ; Austin MA *et al*, 1988) van demostrar que en la població general es detectaven 2 subpoblacions de LDL. Les del patró A, més grans (Ø 26.6 nm) i les del patró B, més petites (Ø 24.8 nm) mentre que en alguns pacients era possible detectar un patró intermedi.

El fet que en famílies dislipèmiques l'existència de LDL del patró B tripliqués el risc de patir infart de miocardi de forma no independent a la presència d'hipertrigliceridèmia (Austin MA *et al*, 1987) ha fet que es denominés aquesta subclasse de LDL com el "**fenotip lipoproteic aterogènic**" (Austin MA *et al*, 1990).

En pacients HLFC el patró B de les LDL és especialment predominant en individus amb hipertrigliceridèmia. En els pacients amb HLFC, el patró B de les LDL segueix una distribució bimodal si se l'estudia en funció de les concentracions d'apo B. Això suggereix que hi ha un subgrup d'individus HLFC amb LDL del patró B que tenen una susceptibilitat genètica a nivells més alts d'apo B (Austin MA *et al*, 1992).

1.5.1. Característiques clíniques

La HLFC és una alteració extesa entre la població que es presenta amb una freqüència del 0.3-2% (Goldstein JL *et al*, 1973 ; Grundy SM *et al*, 1987). Representa més del 10% de les formes d'hiperlipèmia genètica en supervivents d'infart de miocardi en comparació al 3% associat a la hipercolesterolèmia familiar. També és la hiperlipèmia familiar més freqüent entre pacients d'accident vascular no embòlic d'etiologia desconeguda (Bansal BC *et al*, 1986).

La hiperlipèmia familiar combinada, que alguns estudis suggereixen que es transmet de forma autosòmica dominant (Glueck CJ *et al*, 1973) presenta una clínica molt pobre on senyals clínics o símptomes característics com xantomes i xantel·lasmes són molt menys freqüents que en altres dislipèmies.

L'expressió de la HLFC, entesa com el desenvolupament d'una hiperlipèmia detectada de forma analítica, no es dona abans dels 20 anys (Goldstein JL *et al*, 1973 ; Rose HG *et al*, 1973) encara que un fenotip equivalent ha estat descrit en descendents de pacients amb malaltia arterial coronària (Sniderman A *et al*, 1985). Tot i que aquest criteri és àmpliament acceptat, hi ha estudis posteriors que suggereixen que aquest fenotip podria manifestar-se en la infantesa (Cortner JA *et al*, 1990).

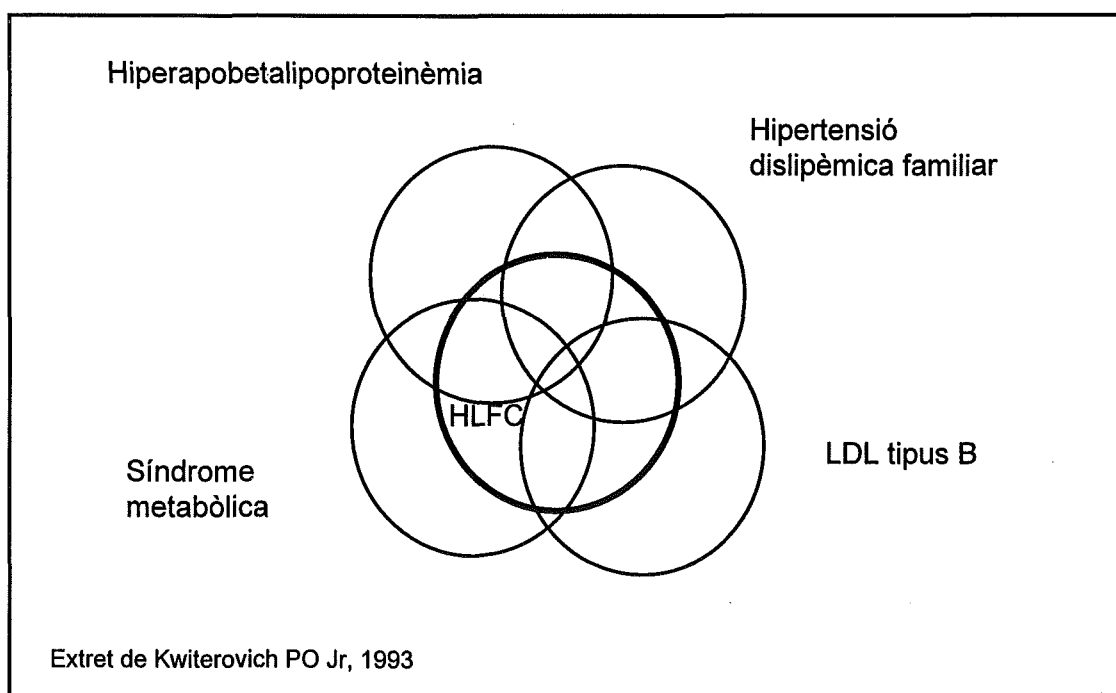
La HLFC tot i estar mancada d'una simptomatologia clara es presenta sovint associada a síndromes com la hipertensió dislipèmica familiar (HDF) i la síndrome metabòlica.

Hipertensió dislipèmica familiar : Aquesta síndrome d'hipertensió prematura (< 60 anys) pot anar acompanyada d'alguna de les següents alteracions lipídiques : a) Elevacions del colesterol LDL b) Elevacions dels triglicèrids c) Disminució del colesterol HDL (Williams RR *et al*, 1988). Arrel d'aquesta observació Hunt i col·laboradors van explorar la possibilitat d'un vincle amb la HLFC (Hunt SC *et al*, 1989) que va demostrar que un 30% dels pacients amb HDF presentaven el fenotip HLFC. La major part d'aquests individus presentaven també hiperinsulinèmia. Això suggereix que la hiperlipèmia, la hipertensió i la hiperinsulinèmia poden tenir una base genètica comú.

Síndrome metabòlica : El terme original de síndrome X va ser proposat per Reaven (Reaven GM, 1988) per descriure un conjunt d'alteracions que podien aparèixer plegades : resistència a la insulina, intolerància a la glucosa, hiperinsulinèmia, elevacions en la VLDL, disminucions en la HDL, hipertensió i obesitat.

Sembla, doncs, que la hiperapobetalipoproteinèmia, la hipertensió dislipèmica familiar, la síndrome metabòlica i la hiperlipèmia familiar combinada comparteixen una sèrie de característiques encara que no es coneix en quin grau ho fan (Figura 2).

Figura 2



1.5.2. Diagnòstic

Alguns autors han suggerit que el fenotip IIb d'hiperlipèmia mixta podria ser un marcador específic per a la hiperlipèmia familiar combinada (Nikkilä EA *et al*, 1973 ; Glueck CJ *et al*, 1973). Abans, però, cal descartar la possibilitat d'una hiperlipèmia secundària a : diabetis mellitus, malaltia hepàtica, hipotiroidisme, malaltia renal, malabsorció, obesitat (Brunzell *et al*, 1974), ingesta excessiva d'alcohol (Phillips NR *et al*, 1981) o l'ús de medicació que pugui influenciar el perfil lipoproteic (corticosteroides, andrògens, beta-bloquejants) entre d'altres.

El patró més consistent de diagnòstic inclou (Brunzell JD *et al*, 1984):

1. **Múltiples tipus d'hiperlipèmia dins d'una mateixa família.**
2. **Historial familiar de malaltia coronària prematura (< 60 anys).**

A més hi ha d'altres paràmetres bioquímics i característiques clíniques que recolzen el diagnòstic de la HLFC (Taula 5). Un diagnòstic segur haurà de tenir sempre en compte l'estudi de la família del pacient.

TAULA 5. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques I BIOQUÍMIQUES DE DIAGNÒSTIC.

Característiques clíniques i bioquímiques que donen suport al diagnòstic de la HLFC
1. Múltiples tipus d'hiperlipèmia en familiars de primer grau.
2. Antecedents familiars d'arteriosclerosi prematura.
3. Concentracions elevades d'apo B plasmàtica.
4. Absència de xantomes en familiars de primer grau.
5. Absència d'hiperlipèmia en familiars menors de 20 anys.
6. Presència de fenotips IIa, IIb, IV o V.
7. Baixa relació LDLc / apo B.
8. Baixes concentracions de HDL2.

LDLc = colesterol LDL . Extret de Castro Cabezas *et al*, 1992.

Quan es descarta una hiperlipèmia secundària cal incloure en el diagnòstic diferencial la hipertrigliceridèmia familiar (HTGF), la disbetalipoproteinèmia familiar (DF) i la hipercolesterolèmia familiar (HF) (Taula 6).

HLFC : Sobreproducció de VLDLs normals i més aviat petites. Nivells plasmàtics d'apo B elevats (Brunzell JD *et al*, 1983). Forta associació amb arteriosclerosi prematura.

HTGF : Producció normal de VLDLs riques en triglicèrids. Nivells d'apo B normals. Poca associació amb arteriosclerosi prematura (Brunzell JD *et al*, 1989).

DF : Acumulació d'IDL. Homozigositat per apo E2/E2 (Weisgraber KH *et al*, 1982) encara que també s'han descrit altres mutacions en el gen de l'apo E (Zannis VI *et al*, 1980). Presència de xantomes. Colesterol elevat en VLDL i disminuït en LDL (gregg RE *et al*, 1988)

HF : Acumulació de LDL aïllada. Possible presència de xantomes (Brown MS *et al*, 1973). Poden presentar sovint xantel·lasmes i arc corneal. Es manifesta aviat en la vida del pacient.

TAULA 6. DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL DE LA HLFC.

	HLFC	HTGF	DF	HF
Arteriosclerosi prematura	++	±	++	++
Xantomes				
Tendó d'Aquiles	-	-	±	+
Tendons extensors	-	-	±	+
Palmells	-	-	±	+
Tuberós	-	-	+	+
Sobreproducció apo B	+	-	-	-
Funció deficient del rLDL	-	-	+	+
Hiperlipèmia <20 anys	-	+	-	+

++ Sempre present + Present ± Pot presentar-se rLDL = Receptor LDL

Extret de Castro Cabezas *et al*, 1992.

Alguns d'aquests criteris són avui motiu de debat i la seva validesa es discuteix en algunes seccions d'aquest treball.

1.5.3. Bases metabòliques

Encara que l'etiopatogènia de la hiperlipèmia familiar combinada és encara desconeguda, hi ha alguns trets metabòlics que s'han trobat de forma consistent en un nombre considerable d'aquests pacients, si bé no en tots. Això fa pensar que aquests mecanismes poden estar involucrats en l'etiologia d'aquesta alteració. Aquests trets són la sobreproducció hepàtica d'apolipoproteïna B, el retard en l'aclariment de lipoproteïnes post-pandrials i l'estat d'heterozigotat per la deficiència de LPL.

Sobreproducció hepàtica d'apolipoproteïna B-100

Diversos estudis cinètics, els primers d'ells emprant isòtops radioactius (Chait A *et al*, 1980 ; Janus ED *et al*, 1980) i alguns de posteriors utilitzant isòtops estables (Cortner JA *et al*, 1991 ; Venkatesan S *et al*, 1993), indiquen que hi ha una sobreproducció hepàtica d'apo B-100, que resulta en un augment del nombre de partícules VLDL, en pacients diagnosticats d'HLFC. Aquesta és una característica que la HLFC comparteix amb la hiperapobetalipoproteinèmia, on també s'ha descrit una major síntesi de VLDL apo B i un major *pool* de partícules VLDL (Teng B *et al*, 1986).

Un aspecte important d'aquests treballs és que es va descriure que en totes dues alteracions el catabolisme de les VLDL era més lent. Molt lent en el cas de la hiperapobetalipoproteinèmia i només lleugerament en la HLFC. Aquest fenomen ha estat confirmat recentment en el cas de la HLFC (Aguilar-Salinas CA *et al*, 1997).

L'augment en la síntesi de VLDL apo B té com a conseqüència un increment de partícules LDL sense que això estigui acompanyat de cap defecte en el catabolisme d'aquestes partícules. Ja s'ha comentat anteriorment que les LDL obtingudes en aquestes condicions són més petites i denses.

No es coneix quin mecanisme hi ha implicat en aquest procés de sobreexpressió hepàtica tot i que s'ha proposat que hi podria haver involucrats defectes en el tractament post-traducciona l de la proteïna (La Belle M *et al*, 1990). Aquesta afirmació es basa en el menor grau de glicosilació que les LDL del tipus B presenten respecte a les del tipus A i que implicaria alteracions en el procés d'elaboració de la LDL a través del reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi.

Una altra hipòtesi més versemblant està relacionada amb un augment del flux d'àcids grassos lliures cap el fetge i es discuteix en el següent apartat sobre el retard en l'aclariment post-pandrial.

Retard en l'aclariment de lipoproteïnes post-pandrials

És característic de la hiperapobetalipoproteinèmia (Genest J *et al*, 1986) i de la HLFC (Castro Cabezas M *et al*, 1993a) un retard en l'aclariment de lipoproteïnes post-pandrials riques en triglicèrids (quilomicrons) fortament associat a les concentracions plasmàtiques basals d'apo C-III.

En tots dos casos això provoca un augment anormal en les concentracions plasmàtiques post-pandrials d'àcids grassos lliures que sovint s'observa associat a un fenomen de resistència insulínica (Sniderman A *et al*, 1987 ; Castro Cabezas M *et al*, 1993b).

Actualment s'especula amb la possibilitat que aquest augment elevaria el flux d'àcids grassos cap el fetge i estimularia la síntesi hepàtica de triglicèrids i, per tant, la síntesi de VLDL.

Baixa activitat de la lipoproteïna lipasa

Babirak i col·laboradors van ser els primers de proposar que l'estat d'heterozigositat per la deficiència de LPL podria trobar-se en un subgrup de pacients HLFC (Babirak SP *et al*, 1989). En concret van trobar els fenotips IV i IIb en individus amb valors de massa i activitat post-heparina de la LPL que corresponien aproximadament a un 50% de la normalitat. Aquests fenotips hiperlipèmics, a més, variaven al llarg del temps. El mateix Babirak va estimar més tard que 1/3 dels pacients HLFC podrien presentar aquest defecte (Babirak SP *et al*, 1992).

Les alteracions en l'activitat de la LPL tindrien 3 implicacions fisiològiques i metabòliques fonamentals :

Per una banda afectaria el que és la funció més ben coneguda de la LPL, és a dir, la hidròlisi de triglicèrids per donar una molècula de glicerol i àcids grassos lliures (Auwerx J *et al*, 1992).

En segon lloc afectaria el nombre de partícules VLDL que, un cop sintetitzades, serien alliberades a la sang. Williams i col·laboradors van demostrar que una part important de les VLDL sintetitzades era immediatament recaptada per les cèl·lules hepàtiques, *in vitro* (Williams KJ *et al*, 1991). Aquesta recaptació estava provocada per modificacions en la

lipoproteïna induïdes per la LPL. Un funcionament reduït de la LPL podria resultar, doncs, en una aparent sobreproducció de VLDL.

En últim lloc podria afectar la retirada de remanents de lipoproteïnes en triglicèrids que es veu facilitada per la unió de la LPL als proteoglicans situats en la superfície cel·lular i adjacents als receptors hepàtics (Eisenberg S *et al*, 1992).

Integrant tota aquesta informació es podria hipotetitzar que en aquests pacients hi ha un flux exagerat d'àcids grassos cap el fetge que estimula la síntesi d'apo B. Això resulta en una hipersecreció de VLDL que provoca hipertrigliceridèmia. El posterior processament d'aquestes VLDL explicarà els diferents fenotips observats. Si també hi ha augment de la lipòlisi es potencia la formació de LDL (fenotip IIa), quan la lipòlisi no pot compensar la sobreproducció de VLDL hi ha una hipertrigliceridèmia aïllada (fenotip IV). El cas intermedi donarà lloc al fenotip IIb.

Aquesta és una hipòtesi versemblant però que no explica quins factors determinen el grau de lipòlisi o d'aclariment de les lipoproteïnes remanents.

1.5.5. Bases genètiques

La presència d'un component genètic en la HLFC es posa de manifest amb elements com l'existència d'antecedents familiars de cardiopatia isquèmica prematura o la presència de diversos individus afectes dins d'una mateixa família. Són diverses les estratègies que s'han utilitzat per conèixer les característiques genètiques d'aquesta alteració.

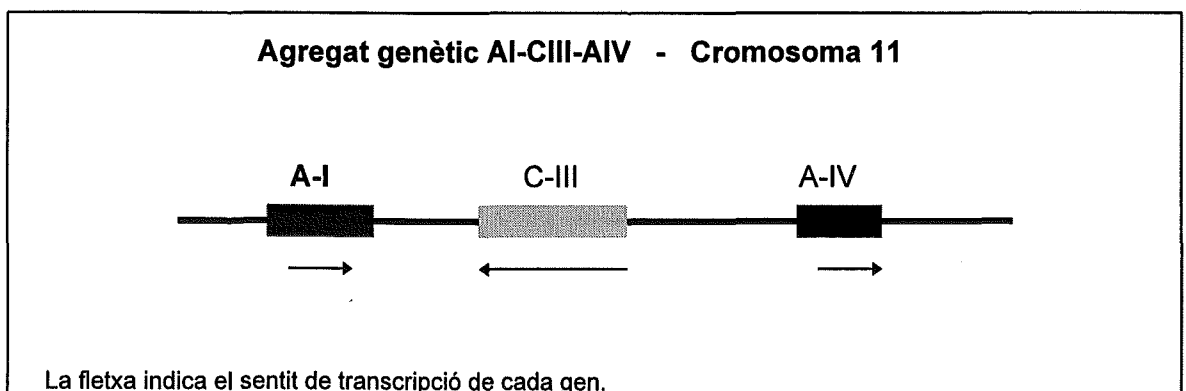
Una d'elles es basa en les anomenades *Complex segregation analysis*, o anàlisi de segregació complexa, on es dissenyen models genètics hipotètics i es posen a prova aplicant-los a famílies afectes. Els resultats obtinguts emprant aquesta metodologia fan pensar que hi ha un gen (desconegut de moment) amb un efecte molt important sobre els triglicèrids en la HLFC (Cullen P *et al*, 1994). Altres estudis suggereixen l'existència d'un *locus* amb un efecte important sobre les elevacions plasmàtiques d'apo B específiques de la HLFC (Jarvik GP *et al*, 1993). No s'ha trobat, però, cap evidència d'un gen que tingui un efecte similar sobre el colesterol. S'ha senyalat que hi hauria un *locus* responsable de les elevacions plasmàtiques d'apo B i un de diferent que actuaria sobre el fenotip de les LDL.

(Austin MA *et al*, 1991) i que tots dos tindrien un efecte additiu en l'expressió de la HLFC (Jarvik GP *et al*, 1994).

Una metodologia més extesa és la que es basa en l'estudi de **gens candidats**. Aquests gens es consideren candidats a ser portadors d'una variant genètica que participi en l'etiologia de la HLFC degut al paper que la proteïna que codifiquen té en la fisiopatologia de l'alteració. Aquestes variants o mutacions genètiques, que si són relativament freqüents en la població general s'anomenen **polimorfismes genètics**, poden ser responsables d'un canvi estructural en la proteïna introduint alhora un canvi **funcional** que es relacioni amb la malaltia. És possible també que aquestes mutacions no alterin la proteïna que codifiquen però que estiguin relacionades amb la presència de la malaltia o amb algun tret clínic o analític. En aquests casos es diu que la mutació o polimorfisme està en **desequilibri d'unió** amb la mutació responsable del tret o la malaltia estudiats. La presència de **desequilibri d'unió** entre una mutació i un tret és indicatiu que en una regió **pròxima** a la de la mutació detectada es troba la **mutació funcional**, és a dir la que altera l'estructura o l'expressió de la proteïna, responsable de l'alteració que estem estudiant.

Són tres els gens o regions genètiques que s'han estudiat més a fons en relació a la HLFC : el gen de l'apo B, el gen de la lipoproteïna lipasa i l'agregat o *cluster* genètic que conté els gens de les apo A-I, C-III i A-IV (Figura 3). L'elecció d'aquests gens candidats s'ha fet sobre la suposició que les concentracions elevades d'apo B en plasma d'aquests pacients són el resultat d'un dels següents processos : sobreproducció d'apo B en el fetge, lipòlisi deficient de les VLDL relacionada amb un mal funcionament de la LPL, unió deficient de l'apo B al receptor LDL o un defecte en el propi receptor.

Figura 3



Gen de l'apolipoproteïna B

Fetes aquestes precisions, el gen de l'apo B semblava en un principi ser el candidat més lògic a afectar les seves pròpies concentracions en plasma. No obstant, els estudis realitzats fins ara indiquen clarament que el gen de l'apo B no és el gen clau en la regulació de les concentracions plasmàtiques d'apo B (Coresh J *et al*, 1992) així com tampoc és responsable de les LDL aterogèniques del tipus B (LaBelle M *et al*, 1991). Aquests resultats han estat també constatats en relació a la hiperlipèmia familiar combinada (Raugh G *et al*, 1990 ; Austin MA *et al*, 1991).

Gen de la lipoproteïna lipasa

L'interès en l'estudi d'aquest gen es va suscitar arrel del descobriment que un subgrup de pacients heterozigots per la deficiència de LPL presentaven un fenotip lipoproteic semblant al de la HLFC (Babirak SP *et al*, 1989). L'existència de baixa activitat LPL en pacients HLFC ha estat confirmada amb posterioritat (Seed M *et al*, 1994), no obstant, estudis genètics duts a terme en pacients HLFC (Gagné E *et al*, 1994) i en pacients HLFC amb baixa activitat LPL (Nevin DN *et al*, 1994) indiquen d'una forma prou convincent que mutacions en el gen de la LPL no són la principal causa de les alteracions de la LPL associades a la hiperlipèmia familiar combinada. El que van fer aquests treballs va ser suggerir que les alteracions en l'activitat LPL que presentaven alguns pacients HLFC eren d'origen funcional. Això va centrar part de l'interès en les proteïnes reguladores de l'activitat d'aquest enzim, les apolipoproteïnes C-II i C-III, sobretot en aquesta última per motius que s'exposen a continuació.

Agregat genètic AI-CIII-AIV

L'interès de l'agregat AI-CIII-AIV en relació a la HLFC el marca un estudi publicat per Wojciechowski i col·laboradors (Wojciechowski AP *et al*, 1991) on es descrivia un marcador genètic (Xmnl) que co-segregava amb la HLFC en set famílies estudiades. Tot i que alguns aspectes sobre el disseny d'aquest estudi són qüestionables i que els resultats no han estat confirmats amb posterioritat (Wijsman EM *et al*, 1992) aquest va ser el punt de partida d'un gran nombre d'estudis sobre la variabilitat genètica d'aquesta regió. Aquests estan referits sobretot al gen de l'apo A-I, on s'han detectat variacions relacionades amb les concentracions d'apo A-I i colesterol HDL (Sigurdsson G Jr *et al*, 1992 ; Xu CF *et al*, 1993), i

al gen de l'apo C-III on les variacions es relacionen amb les concentracions de la pròpia apo C-III i dels triglicèrids (Shoulders CC *et al*, 1991 ; Ordovas JM *et al*, 1991).

En relació a la HLFC s'ha trobat que variacions en aquesta regió genètica modulen les concentracions de triglicèrids (Xu CF *et al*, 1994) i les de colesterol LDL (Dallinga-Thie G *et al*, 1996).

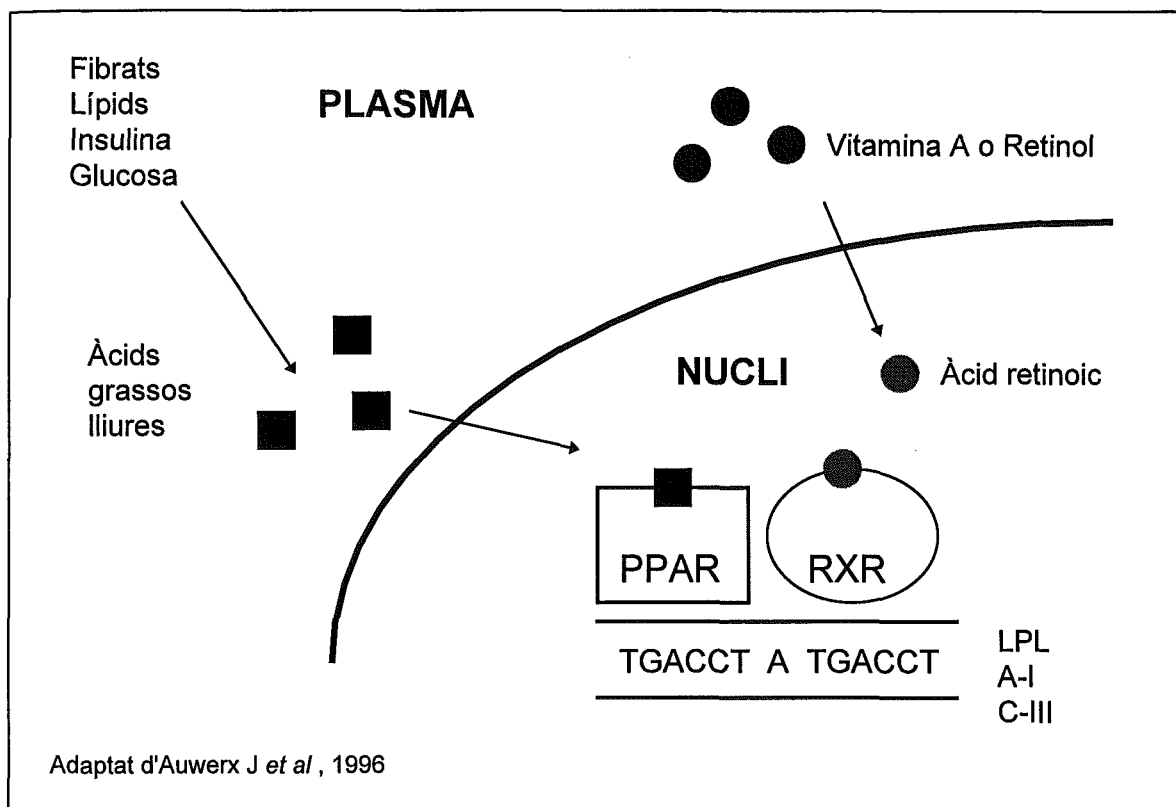
Dins de l'estudi de les bases genètiques de la HLFC no només són importants les alteracions en la seqüència del gen que puguin modificar l'estructura o l'expressió de la proteïna, també ho són aquells mecanismes que regulen la transcripció, i per tant de síntesi, d'aquestes proteïnes. En el context de la HLFC un d'aquests mecanismes és especialment rellevant ja que controla l'expressió, entre d'altres, dels gens de la LPL i l'apo C-III.

El sistema de regulació PPAR/RXR

Els gens de la LPL i l'apo C-III són regulats per agents com els fibrats o els àcids grassos de la dieta (Auwerx J *et al*, 1996). Aquests tenen un efecte estimulador sobre el gen de la LPL (Schoonjans K *et al*, 1996) i inhibidor sobre el gen de l'apo C-III (Staels B *et al*, 1995). Més concretament, la pertorbació metabòlica que indueixen aquests factors provoca l'activació d'una classe de proteïnes que pertanyen a la superfamília de receptors nuclears PPAR (*Peroxisome proliferator activated receptors*) (Schoonjans K *et al*, 1996). Aquestes formen heterodímers amb el RXR (*9-cis-retinoic acid receptor*) que reconeixen regions específiques dels promotors dels gens esmentats i que, per tant, controlen la seva expressió. Aquests dos elements, PPAR i RXR, han d'ésser activats per promoure aquest efecte regulador. Els PPARs s'activen, tal com s'ha dit, a partir de l'acció d'agents hipolipemians com els fibrats o d'altres estímuls dietètico-ambientals. El RXR és activat per l'àcid retinoic, la forma activa intracel·lular de la vitamina A (Figura 4).

Per tant hom podria interpretar que la regulació d'aquests gens, i per extensió del metabolisme dels triglicèrids, està regulada per un sistema l'eficàcia del qual podria dependre de la disponibilitat de vitamina A.

Figura 4



1.5.5. Models animals

Només hi ha un model animal acceptat com a model de la hiperlipèmia familiar combinada. Aquest és el conill hiperlipèmic desenvolupat al *St. Thomas Hospital* per La Ville i col·laboradors (La Ville AE *et al*, 1987). Aquest conill és una soca hiperlipèmica del conill *New Zealand White* que pot presentar hipercolesterolèmia i/o hipertrigliceridèmia, patrons lipoproteics variables, arteriosclerosi prematura, sobreproducció hepàtica d'apo B en VLDL i LDL i activitat del receptor LDL normal.

Les noves tècniques de manipulació genètica que permeten obtenir animals que sobreexpressen una proteïna humana (transgènics) o que estan mancats d'un gen concret (*knockout*) tot i que són molt útils per conèixer la funció fisiològica de determinades proteïnes no han permès encara obtenir un model genèticament manipulat de la HLFC. No

obstant les característiques d'alguns ratolins on s'han manipulat els gens d'apolipoproteïnes humanes fan pensar que això pot ser possible en un futur. Així, el ratolí *knockout* per l'apo A-II té baixes concentracions plasmàtiques d'àcids grassos lliures, glucosa i insulina així com un augment en la retirada de remanents. El cas contrari és característic de la HLFC, per tant, aquests resultats suggereixen que un excés d'apo A-II podria provocar un fenotip semblant al de la HLFC (Weng W *et al*, 1996). Un segon exemple és el del ratolí transgènic per l'apo C-I humana que desenvolupa hiperlipèmia combinada (Shachter NS *et al*, 1996).

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

2.1. Hipòtesi

Alteracions dels gens de les apolipoproteïnes codificades en l'agregat genètic AI-CIII-AIV i dels seus mecanismes de regulació participen en la patogènia de la hiperlipèmia familiar combinada.

2.2. Objectius

Aquest treball té com objectiu general millorar el coneixement d'aspectes metabòlics i genètics de la hiperlipèmia familiar combinada que contribueixin a entendre la seva etiopatogènia. Els objectius concrets han estat:

- Estudiar la relació entre el polimorfisme C₁₁₀₀-T del gen de l'apolipoproteïna C-III i el perfil lipoproteic dels pacients amb HLFC.
- Mesurar les concentracions plasmàtiques de retinol en pacients amb HLFC com a indicador de possibles alteracions dels mecanismes de regulació gènica dependents d'àcid retinoic.
- Estudiar la relació entre les HDL d'aquests pacients, l'activitat de l'enzim LCAT i el polimorfisme G₇₅-A del gen de l'apolipoproteïna A-I.

Objectius secundaris:

- Determinar la prevalença d'hiperlipèmia entre els descendents dels pacients amb HLFC i caracteritzar el seu perfil lipoproteic.
- Comparar diferents mètodes per a determinar les isoformes de l'apolipoproteïna E.

3. PACIENTS I MÈTODES

3.1. Pacients

Els 16 pacients HLFC del present estudi es van seleccionar del Dispensari de Lípids de l'Hospital Universitari de Sant Joan de Reus. Un cop identificats es van reclutar les seves famílies amb un total de 106 individus. D'aquests, 32 van ser hiperlipèmics i 74 normolipèmics.

3.1.1. Criteri diagnòstic

Es va diagnosticar HLFC a tots aquells individus amb concentracions plasmàtiques de colesterol i triglicèrids superiors a 6.4 mmol/l i 2.8 mmol/l, respectivament, i amb almenys un familiar de primer grau amb colesterol o triglicèrids plasmàtics superiors als esmentats valors. Dos mesos abans de l'estudi els pacients van deixar de prendre fàrmacs hipolipemiants tot i que van seguir les dietes recomenades. En la taula 1 es mostren els seus valors lipídics en el moment de la selecció (A) i a l'inici de l'estudi (B).

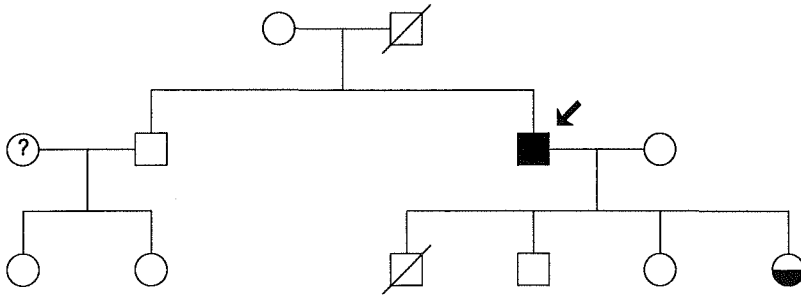
TAULA 1. Valors lipídics, en mmol/l, dels 16 pacients HLFC.

Família	Pacient	Edat	Sexe	Chol A/B	Trig A/B	HDLc	ApoE
1	1	51	H	7.1/6.5	3.1/2.9	1.2	3/4
2	2	29	H	8.1/6.8	3.0/2.0	1.1	3/3
3	3	54	D	8.7/6.0	4.8/2.6	1.7	3/3
4	4	48	H	8.7/8.2	3.3/3.3	1.4	3/4
5	5	42	H	6.9/6.5	6.5/2.1	1.0	3/3
6	6	44	H	6.4/5.8	5.0/2.4	0.9	3/3
7	7	54	H	7.8/6.5	6.6/2.0	1.1	3/3
8	8	59	D	7.0/6.1	4.4/2.8	1.5	3/3
9	9	62	H	8.3/6.7	3.3/3.1	1.1	3/3
10	10	47	H	7.3/6.3	4.5/3.2	0.7	3/4
11	11	46	H	6.9/6.7	6.8/2.2	0.7	3/4
12	12	57	D	9.4/7.6	3.2/2.9	1.3	3/3
13	13	51	H	7.8/8.2	3.6/3.5	2.1	3/4
14	14	53	H	6.3/5.2	9.1/1.5	1.7	3/3
15	15	36	H	6.6/6.3	3.9/1.9	0.9	3/3
16	16	32	H	9.8/7.6	5.9/2.1	0.9	3/3
16		48(9)		7.7(1.0)	4.8(1.7)	1.2(0.4)	

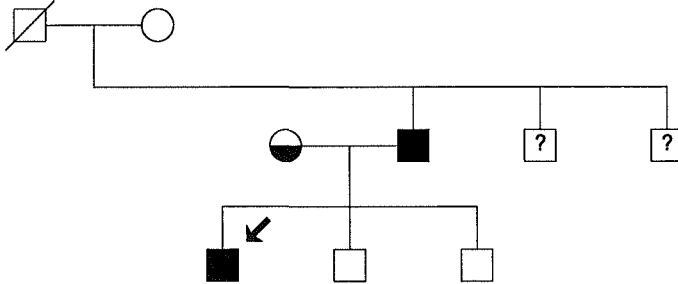
Es va excloure tots aquelles individus amb hiperlipèmies secundàries i es va determinar el genotip d'apo E per detectar una possible hiperlipèmia tipus III.

3.1.2. Composició de les famílies

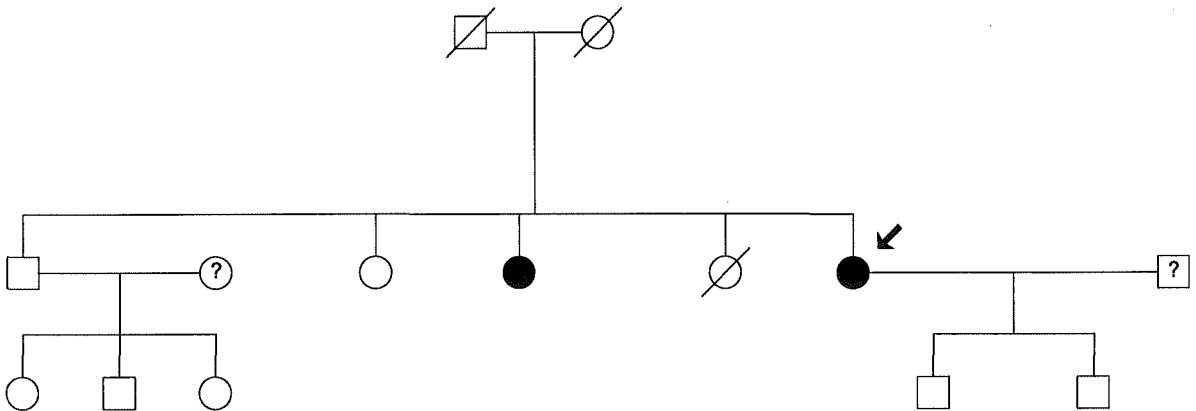
Família 1



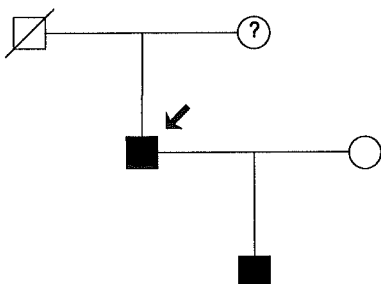
Família 2



Família 3



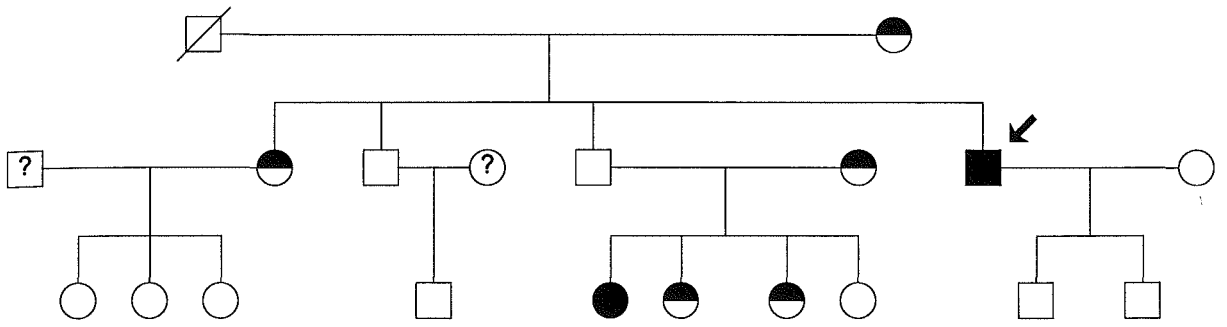
Família 4



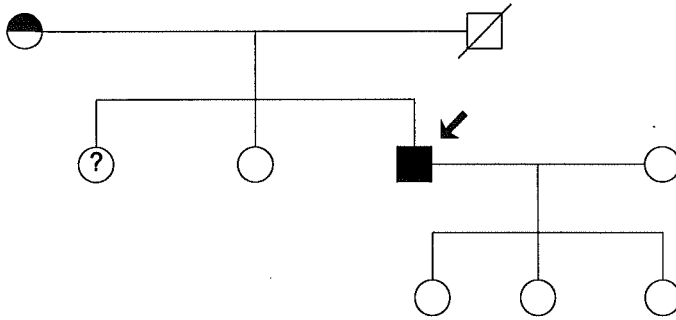
Symbol definitions

- ○ No afecte
- ● Hipercol + hipertrig
- ? ? No disponible
- ◻ ◐ Hipertrigliceridèmia

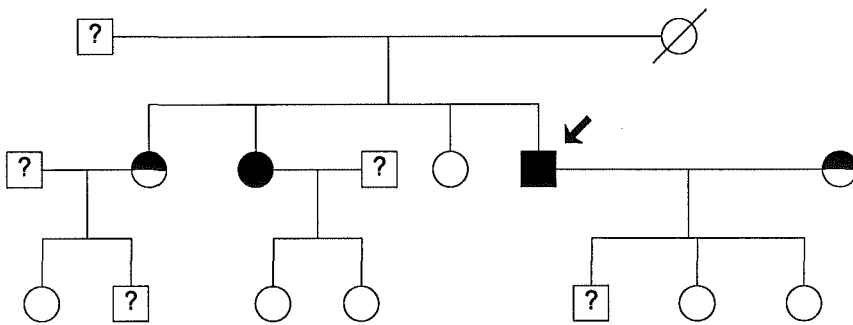
Família 5



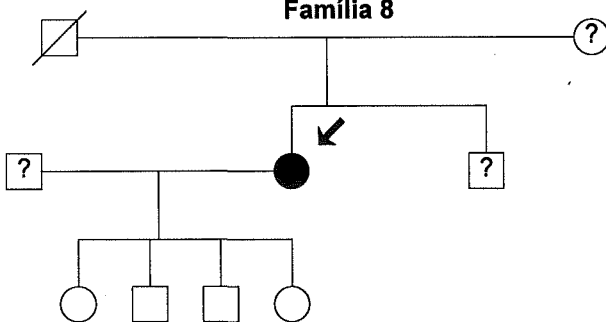
Família 6



Família 7



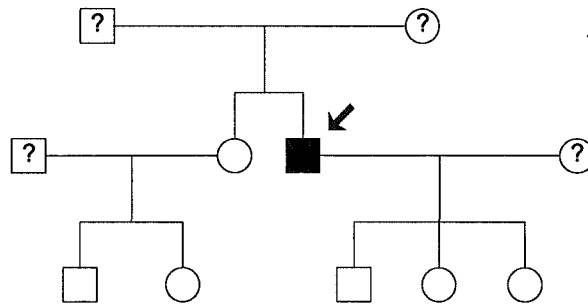
Família 8



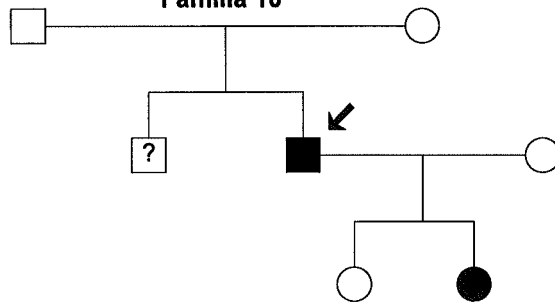
Symbol definitions

- ○ No afecte
- ● Hipercol + hipertrig
- ? ○ ? No disponible
- ● Hipercolesterolèmia

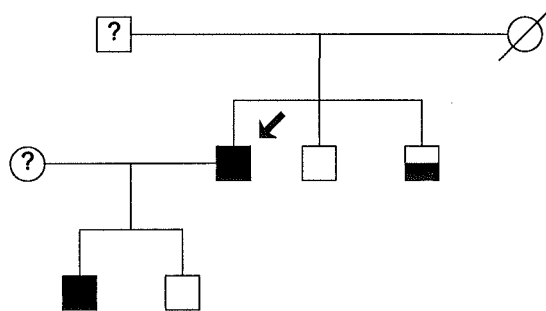
Família 9



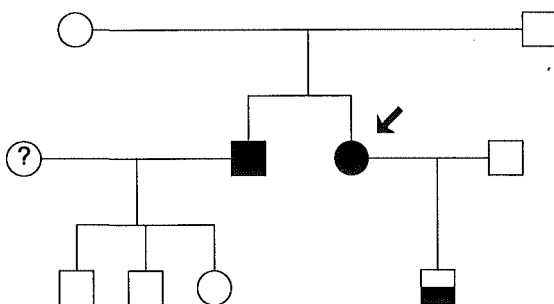
Família 10



Família 11



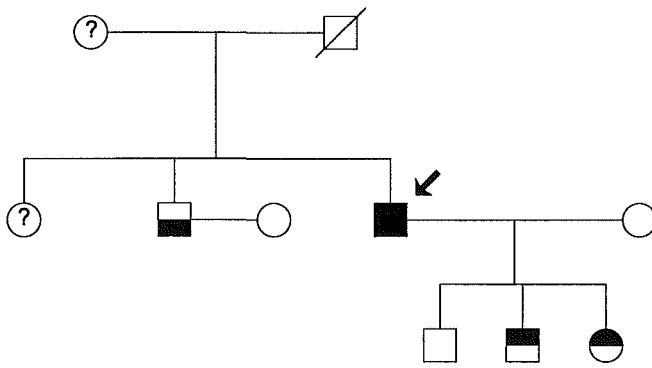
Família 11



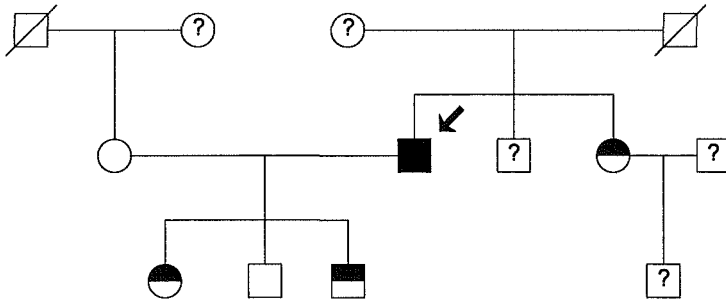
Symbol definitions

- ○ No afecte
- ● Hipercol + hipertrig
- ? ? No disponible
- ◻ ◐ Hipertrigliceridèmia

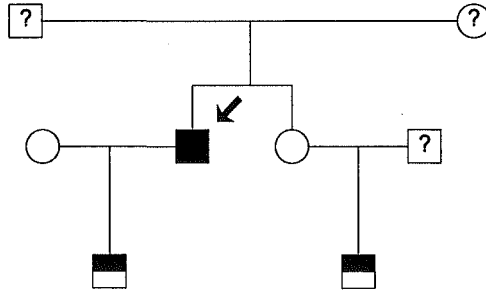
Família 13



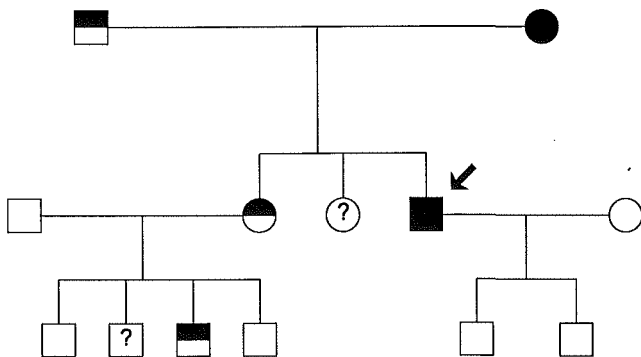
Família 14



Família 15



Família 16



Symbol definitions

- ○ No afecte
- ● Hipercol + hipertrig
- ? ○ ? No disponible
- ● Hipercolesterolèmia
- ● Hipertrigliceridèmia

3. 2. Mètodes

En aquest apartat es descriuen en detall les tècniques més rellevants emprades en aquest estudi. Donat que el format de determinades revistes científiques exigeix que la metodologia utilitzada sigui referenciada i presentada de forma resumida, aquesta secció recull tots els detalls metodològics no contemplats en els articles.

3.2.1. Fraccionament lipoproteic. Ultracentrifugació seqüencial.

El perfil lipoproteic dels individus estudiats es va obtenir pel mètode d'ultracentrifugació seqüencial preparativa (Havel RJ *et al*, 1955). Aquest mètode es basa en la diferent flotabilitat que tenen les partícules lipoproteiques sotmeses a força centrífuga. Per a la separació es va utilitzar una ultracentrífuga model Teknicon T-1055 i un rotor 45'6 Kontron (Kontron, Suïssa). Es van emprar tubs de polialòmer, d'una capacitat de 6 ml.

Aïllament de les VLDL (0.95 - 1.006 g/ml)

Les VLDL es van aïllar a partir de 2 ml de plasma als que es van afegir 3ml de solució de densitat 1.006 g/ml en capa. Es van centrifugar a 37.000 rpm, a 4°C durant 20 hores. Després es van recollir 2ml del sobrenedant que contenien les lipoproteïnes de densitat inferior a 1.006 g/ml.

Aïllament de les IDL (1.006 - 1.019 g/ml)

Als 3 ml d'infranedant de densitat 1.006 g/ml que restaven s'hi va afegir 1 ml de solució de la mateixa densitat. Es va afegir 1 ml de solució de densitat 1.071 g/ml per obtenir una densitat mitjana de 1.019 g/ml que després de la centrifugació a les mateixes condicions permetés de recollir les IDL.

Aïllament de les LDL (1.019 - 1.063 g/ml)

Es va repetir el procés anterior però es va afegir 1 ml de solució 1.239 g/ml. Després de la ultracentrifugació es van recollir els 2 ml del sobrenedant que contenien les LDL.

Aïllament de les HDL (1.063 - 1.210 g/ml)

Es van afegir 2 ml de solució 1.063 g/ml i 1 gram de bromur sòdic (NaBr). Després de la ultracentrifugació a 37.000 rpm, 4°C i 40 hores es va obtenir la fracció que contenia les HDL.

REACTIUS I SOLUCIONS**Solució conservant**

0.5 g cloramfenicol levògic pur

1.0 g sulfat de gentamicina

4.1 g EDTA Na₂

100 ml aigua destil·lada

pH 7.4

Utilitzar 10 µl de solució per cada ml de mostra.

Solucions de densitat**Densitat 1.006 (g/ml) :**

20.7 g NaCl

0.2 g EDTA Na₂

2 ml NaOH 1 M

2 L aigua destil·lada

Densitat 1.239 (g/ml) :

328 g NaBr

1 L aigua destil·lada

Densitat 1.019 (g/ml) :

4 :1, 1.006 - 1.071

Densitat 1.063 (g/ml) :

4 :1, 1.019 - 1.239

Densitat 1.071 (g/ml) :

4 :1, 1.239 - 1.019

Densitat 1.291 (g/ml) :

410 g NaBr

1 L solució 1.063 g/ml

EQUACIONS PER A LA ULTRACENTRIFUGACIÓ SEQÜENCIAL

- I. Equació de Radding - Steinberg (Radding CHM i Steinberg D, 1960)

$$V_0 D_0 + X = d(V_0 + V_X)$$

On X és la quantitat de NaBr a afegir, en grams, V_0 és el volum inicial en ml, D_0 la densitat inicial, d la densitat desitjada i V_X el volum específic aparent del NaBr en la solució final.

- II. Equació de Havel (Havel RJ *et al*, 1955)

$$(AY) + (BZ) = (A + B) X$$

On A és el volum de sèrum o infranadant, B el volum de solució de densitat, Y la densitat de la mostra que ha de ser modificada, Z la densitat de la solució de densitat i X la densitat de la barreja o densitat desitjada.

Precipitació selectiva de les HDL

S'utilitzen dues solucions de polietilènglicol (PEG) que difereixen en la seva concentració i el seu pH. Amb la primera de les solucions es precipiten les lipoproteïnes que contenen apo B (LDL i VLDL) i això permet recuperar en el sobrenadant la HDL total. En una reacció paral·lela, i mitjançant la segona de les solucions, es precipiten totes les lipoproteïnes excepte la HDL₃. Després es determina la concentració de colesterol en la HDL total i la HDL₃. La diferència entre aquests valors ens permetrà saber el colesterol contingut en la fracció HDL₂.

3.2.2. Hibridació amb oligonucleòtids específics (ASO).

Aquesta tècnica permet determinar el genotip d'un individu per una regió polimòrfica concreta del genoma. És una tècnica que es basa en l'amplificació de la regió que conté el polimorfisme mitjançant la tècnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), la transferència d'aquest ADN amplificat a un suport sòlid (membrana de niló) i la hibridació d'aquest ADN amb dues sondes, una amb la seqüència salvatge i l'altra amb la seqüència mutada.

Un dels trets característics d'aquesta tècnica és que permet determinar de forma simultània el genotip d'un elevat nombre d'individus.

Amplificació mitjançant la PCR

La seqüència dels oligonucleòtids emprats i les condicions pel que fa a temperatura, temps i número de cicles estan descrites en la secció *Resultats i Discussió* dins dels estudis 2 i 4 en els que aquesta tècnica ha estat emprada.

Doble transferència de l'ADN a una membrana de niló

L'objectiu d'aquesta tècnica és transferir l'ADN amplificat d'un suport semi-sòlid com és un gel d'agarosa a un suport sòlid i manejable com és una membrana de niló. Aquesta transferència facilitarà en gran manera totes les operacions posteriors. Un altre aspecte important d'aquesta transferència doble és que permet tenir dues membranes amb còpies idèntiques d'ADN. Els passos a seguir es descriuen a continuació :

1. Mantenir el gel durant 40 minuts en solució desnaturalitzant i agitació orbital.
2. Disposar el gel sobre una superfície sòlida.
3. Disposar una membrana de niló Hybond N⁺ (Amersham), sense sucari en solució desnaturalitzant, sobre el gel. Fer unes marques sobre la membrana que permetin identificar amb posterioritat la part inferior i la superior.
4. Disposar a sobre de la membrana un paper Watman 3M sucari en solució desnaturalitzant.
5. Cal evitar que en els passos 3 i 4 quedin bombolles.
6. Posar un gruix de 4 cm de paper absorbent.

7. Donar la volta a l'estructura de manera que el paper absorbent quedi en contacte amb el taulell i l'altra cara del gel a la superfície.
8. Repetir l'operació (passos 1-6) sobre la cara lliure del gel.
9. Esperar unes 4 hores per a que es produeixi la transferència.
10. Retirar les dues membranes i posar-les en solució desnaturalitzant durant 30 minuts.
11. Esvandir-les durant uns 20 segons amb 5 x SSC.
12. Guardar-les entre dos fulls de paper Watman 3M.
13. Si es fa servir una membrana de nylon no cal exposar-la a llum UV per fixar l'ADN a la membrana.

REACTIUS I SOLUCIONS

Solució desnaturalitzant

0.5 M NaOH

1.5 M NaCl

20 x SSC

3.0 M NaCl

0.3 M $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$

pH 7.0

Marcatge de les sondes

Abans d'hibridar l'ADN del pacient amb les sondes salvatge i mutada cal marcar aquestes sondes per a poder detectar-les amb posterioritat. En aquest estudi hem dut a terme un marcatge de tipus radioactiu utilitzant el radioisòtop ^{32}P . Els passos de què consta el marcatge d'aquests oligonucleòtids es detallen a continuació :

1. Preparar la barreja de reacció amb la sonda, la quinasa i el seu tampó, i el radioisòtop.
2. Incubar a 37°C durant 1 hora.

3. Preparar unes columnes de Sephadex G-25 per a purificar la sonda marcada.
4. Un cop finalitzada la reacció de marcatge de la sonda, afegir-hi 50 μ l d'aigua destil·lada.
5. Carregar el contingut en una de les columnes de Sephadex i centrifugar 3 minuts a 1.500 rpm.
6. Recollir la sonda purificada i fer un contactge de la radioactivitat que ha incorporat la sonda.

REACTIUS I SOLUCIONS

Barreja de reacció

0.3 μ l (1 μ g/ μ l)	ADN
5.0 μ l	Tampó de quinasa
38 μ l	Aigua destil·lada
2-5 μ l	(α - 32 P) dATP
2 μ l	Quinasa T4

Hibridació específica

En aquest pas una de les membranes amb l'ADN del pacient és hibridada amb la sonda salvatge i l'altre amb la sonda mutada. Segons hi hagi unió o no, podem establir les condicions d'homozigot salvatge, homozigot mutant o heterozigot en cadascun dels pacients. Els passos de què consta aquesta hibridació específica es detallen a continuació :

1. Disposar les dues membranes en dos flascons d'hibridació.
2. Afegir 10 ml de solució de pre-hibridació als flascons i incubar en un forn d'hibridació durant uns 10-15 minuts a una temperatura 5°C inferior a la temperatura de *melting* de l'oligonucleòtid.
3. Llençar la solució de pre-hibridació i afegir-n'hi 3 ml.
4. Afegir la sonda marcada amb cura de dipositar-la al fons del flascó. Afegir unes 1×10^6 cpm per ml de solució d'hibridació.

5. Incubar durant 1 hora a la mateixa temperatura.
 6. Retirar les membranes dels flascons d'hibridació i procedir a rentar l'excés de sonda.
 7. Escalfar en una safata solució de rentat a una temperatura pròxima a la temperatura de *melting* de l'oligonucleòtid.
 8. Quan aquesta hagi assolit la temperatura desitjada, introduir-hi la membrana durant uns 2 minuts.
 9. Retirar la membrana, assecar-la lleugerament amb paper Watman i preparar-la per a exposar-hi pel·lícula d'autoradiografia.
-

REACTIUS I SOLUCIONS

Solució de pre-hibridació / hibridació

5 x SSPE

5 x Solució de Denhardt

0.5 % SDS

20 x SSPE

174 g NaCl

27.6 g NaH₂PO₄·H₂O

7.4 g EDTA

800 ml aigua destil·lada

pH 7.4 ajustar el volum a 1 litre

50 x Solució de Denhardt

5g Ficoll

5g Polivinilpirrolidona

5g BSA

500 ml Aigua destil·lada

Filtrar-ho

Solució de rentat

5 x SSC

0.1 % SDS Per 1 litre

3.2.3. Determinació de les concentracions plasmàtiques de retinol.

En l'estat post-absortiu la vitamina A es troba en plasma associada a la proteïna RBP (*Retinol Binding Protein*) i la seva concentració és un bon indicador de l'*status* de vitamina A en la població o els individus estudiats. Els passos per a la determinació d'aquestes concentracions es detallen a continuació :

Recollida de la mostra

És preferible extraure les mostres en tubs amb heparina ja que l'oxalat, el citrat i l'EDTA poden induir certes pèrdues en el retinol. Cal prendre les mesures apropiades per protegir la mostra de la llum i l'oxigen, a les quals la vitamina A és sensible. Aquestes mesures s'han de mantenir durant el procés d'extracció.

Extracció

Per a l'extracció de les vitamines de la resta de components del plasma se segueixen els següents passos :

1. Pipetejar 100 μ l de plasma en un tub de 1.5 ml.
2. Afegir 100 μ l d'una solució etanòlica d'acetat *all-trans* de retinol (1 μ g/ml) que es farà servir com estàndard intern. La missió d'aquest estàndard intern, que és una forma química del retinol que no es troba en plasma, és avaluar la pèrdua de vitamina que es produeix durant el procés d'extracció.
3. Barrejar amb *vortex* durant 15 segons.
4. Afegir 200 μ l de n-hexà i barrejar amb *vortex* durant 30 segons. Mantenir els tubs en rotació horitzontal durant 30 minuts.
5. Centrifugar en una micro-centrifuga durant 5 minuts i separar la fase superior (hexà) de la fase inferior (aigua-etanol).
6. Transferir la fase superior (hexà) a un tub net. Assecar sota un flux de nitrogen.
7. Immediatament abans d'injectar la mostra en el HPLC, reconstituir-la amb 100 μ l d'etanol i barrejar-ho breument amb *vortex*.
8. Injectar 20 μ l de la mostra reconstituïda en la columna.