

Trabajo Fin de Máster

Relación entre la concentración plasmática de
Lipoproteína(a) y la expresión del gen LPA

Autora

Ana Aramburu Carmona

Directores

Ana Cenarro Lagunas
Fernando Civeira Murillo

Laboratorio de Investigación Molecular
Hospital Universitario Miguel Servet

Facultad de Ciencias
2011-2012

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	5
1.1. Estructura y características de la Lp(a)	5
1.2. Concentración plasmática de Lp(a)	7
1.3. Genética	8
1.4. Metabolismo	9
1.5. Modelos de estudio	11
2. OBJETIVOS	12
3. METODOLOGÍA	13
3.1. Procesamiento de la muestra	13
3.2. Determinación de la concentración plasmática de Lp(a)	13
3.3. Extracción de RNA total	13
3.4. Retrotranscripción	18
3.5. PCR cuantitativa en tiempo real	20
4. RESULTADOS	24
4.1. Concentración plasmática de Lp(a)	24
4.2. Extracción de RNA	26
4.3. Retrotranscripción	27
4.4. PCR cuantitativa en tiempo real	28
4.5. Análisis estadístico	30
5. DISCUSIÓN	32
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38

1. ANTECEDENTES

La lipoproteína (a) [Lp(a)] es una partícula lipoproteica descubierta por Kåre Berg en 1963 ¹; desde entonces han sido numerosos los estudios que han tratado de caracterizarla. El interés de esta lipoproteína ha ido en aumento al establecer su relación con las enfermedades cardiovasculares, llegando a determinarse su alta concentración plasmática como un factor independiente de riesgo cardiovascular ². La función fisiológica de la Lp(a) se desconoce, pero, por su homología con el plasminógeno, parece estar implicada en los procesos de coagulación sanguínea.

El sistema fibrinolítico asociado al endotelio juega un papel crítico en la aterosclerosis y se ha visto que las partículas de Lp(a) se depositan en las placas ateroscleróticas, a través de diferentes mecanismos, engrosando la lesión. La aterogenicidad de esta partícula también viene dada por su efecto proliferativo sobre las células de músculo liso ³, así como por su capacidad quimiotáctica sobre monocitos y leucocitos ^{4, 5}.

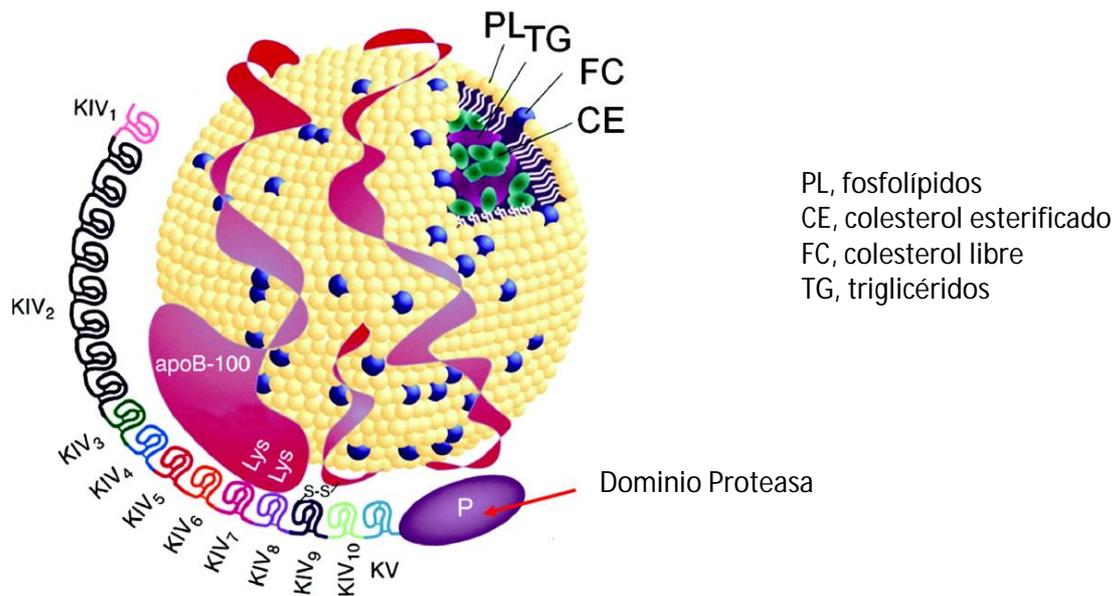
En condiciones normales, la concentración plasmática de Lp(a) en un sujeto es constante a lo largo de toda su vida y no se ve afectada, como otras lipoproteínas, por la dieta, el ejercicio, la edad, el sexo, u otros factores ambientales ⁶. Asimismo, se ha demostrado que esta lipoproteína no responde al tratamiento con fármacos que sí disminuyen los niveles plasmáticos de otras lipoproteínas ^{7, 8}. Por tanto, se hace necesaria una profundización en el estudio de la Lp(a), con el fin de determinar una posible diana terapéutica para disminuir su concentración plasmática de esta lipoproteína; aunque son numerosos los estudios realizados sobre hasta la fecha, la Lp(a) es una lipoproteína que presenta una gran complejidad y son aún muchos los aspectos que quedan por dilucidar.

1.1. Estructura y características de Lp(a)

La complejidad de la Lp(a) radica fundamentalmente en su gran variabilidad, tanto morfológica, como de concentración plasmática. Básicamente, su estructura consiste en una lipoproteína de baja densidad (LDL) unida a una glicoproteína

denominada apolipoproteína (a) [apo(a)]. La fracción lipídica está contenida en la partícula LDL y ésta se encuentra rodeada por una molécula altamente hidrofóbica de 512 KDa, la apolipoproteína B-100 (apo B-100) ⁹. La unión entre ésta y la apolipoproteína específica de Lp(a), la apo(a), se establece mediante un puente disulfuro entre la Cys 4057 de apo(a) y la Cys 4326 de apo B-100 (Figura 1).

Figura 1: Estructura de la Lipoproteína (a)



La gran heterogeneidad de tamaño que existe entre las distintas partículas de Lp(a) es debida a la apo(a), ya que su tamaño varía, aproximadamente, entre 280 y 800 KDa ¹⁰. La secuencia aminoacídica de apo(a) forma unas estructuras características denominadas *kringles* (K): son secuencias de 80 a 90 aminoácidos que se disponen formando una estructura terciaria rígida y estable en forma de lazo, separadas entre sí por secuencias espaciadoras. Para denominar los *kringles*, estos se agrupan bajo distinta numeración (KI-KV). La estructura de apo(a) presenta una alta homología con el plasminógeno (PLG); sin embargo, apo(a) tiene un tamaño mucho mayor, ya que, a pesar de carecer de los KI-KIII, presenta una amplificación del KIV, que está repetido 10 veces; además, la secuencia que codifica el KIV-2 es variable y puede estar a su vez, repetida entre 2 y 43 veces, lo que explica el polimorfismo de tamaño de apo(a) ¹¹. Por otro lado, el KV contiene un dominio proteasa, que parece no ser funcional.

Tabla 1: Características de Lp(a) y apo(a)

Lp(a)	Densidad	1,040 – 1,131 g/mL
	Peso molecular	3,8 – 4,66 x 10 ⁶ Da
	Diámetro molecular	250 Å
	Concentración plasmática	0 – 200 mg/dl
	Colesterol libre	750 mol/mol
	Colesterol esterificado	2000 mol/mol
	Triglicéridos	350 mol/mol
	Fosfolípidos	1110 mol/mol
	Vida media	3,32 – 3,93 días
	apo(a)	Peso molecular
Aminoácidos		4529

En la Tabla 1 se presentan las principales características de Lp(a) y apo(a). La fracción lipídica de Lp(a) constituye entre un 64 y un 74% de la molécula: los fosfolípidos se disponen envolviendo la lipoproteína, mientras que en la zona central se encuentra fundamentalmente, el colesterol esterificado. El porcentaje restante lo constituye la fracción glicoproteica. El diámetro de Lp(a) es aproximadamente, de 250 Å y su densidad varía entre 1,04 y 1,13 g/mL¹².

1.2. Concentración plasmática de Lp(a)

Un aspecto bien caracterizado de la Lp(a) es la existencia de una correlación inversa entre el tamaño de apo(a) y la concentración plasmática de Lp(a)^{13, 14}; de esta forma, los sujetos con isoformas grandes presentan bajas concentraciones de lipoproteína, mientras que los individuos con isoformas de pequeño tamaño muestran altos niveles plasmáticos de Lp(a). Este factor hace necesario el uso de un método adecuado para determinar la concentración de la lipoproteína, que no se vea afectado

por la heterogeneidad de las isoformas. Si no se tiene esto en cuenta, se podrían sobreestimar los niveles de Lp(a) en sujetos con partículas grandes, mientras que la concentración se subestimaría en aquellos que presentan las isoformas pequeñas¹⁵. Por tanto, al utilizar técnicas inmunoquímicas, es esencial que el epítipo de reconocimiento se encuentre en un fragmento que no sea repetitivo. Debido a que este es un problema exclusivo de este analito, la mayoría de los laboratorios clínicos determinan su concentración, en vez de reflejar el dato en unidades molares, que sería la medida adecuada, ya que se determinaría el número de partículas que presenta cada sujeto.

En cualquier caso, teniendo en cuenta estas premisas, se ha establecido la concentración de 30 mg/dL como valor por encima del cual aumentan los eventos cardiovasculares¹⁶.

Como ya se ha comentado anteriormente, la concentración plasmática de Lp(a) es constante para cada individuo a lo largo de su vida y no se ve influenciada por factores ambientales; no obstante, en determinadas condiciones patológicas este valor sí se ve alterado. Por ejemplo, los sujetos con hipercolesterolemia familiar presentan unos niveles de Lp(a) superiores a la media¹⁷. Por otro lado, las patologías que afectan directamente al hígado, órgano de síntesis de Lp(a), también modifican la estabilidad de este valor⁴³.

1.3. Genética

El gen LPA que codifica la proteína apo(a) se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 6 (6q27)¹⁸ y tiene un tamaño de 130 Kb, aproximadamente. La región reguladora del extremo 5' presenta sitios de unión para diversos factores de transcripción como son el estrógeno, la hormona del crecimiento o el factor nuclear hepático (HNF-1 α)¹⁹.

Aunque existe cierta controversia sobre este punto, puede considerarse que la concentración de Lp(a) es un rasgo genético cuantitativo²⁰, y su herencia es de carácter autosómico¹³. Progresivamente se han ido describiendo distintos alelos del gen LPA, según el número de repeticiones del KIV-2; actualmente se considera que son

más de 34 las variantes diferentes que determinan el tamaño de apo(a), incluyendo alelos nulos^{21, 22}. La herencia de estos alelos parece seguir un patrón de codominancia¹³. Los sujetos heterocigotos presentan dos isoformas de apo(a) en plasma, cada una en una concentración característica para esa isoforma. De esta manera, puede decirse que si el tamaño de apo(a) está determinado genéticamente, también lo estará la concentración plasmática de Lp(a).

Los estudios epidemiológicos muestran que existe una distribución de concentraciones de Lp(a) heterogénea entre las poblaciones. La concentración dentro de un mismo grupo puede variar del orden de 1000 veces (de 0,2 a 200 mg/dL). Como norma general, la raza negra presenta los mayores niveles de Lp(a) y algunos asiáticos, la menor concentración de Lp(a). Por el momento no se ha encontrado una explicación razonable para las grandes diferencias interpoblacionales, en los niveles medios de Lp(a).

1.4. Metabolismo

El principal órgano de producción de Lp(a) es el hígado, aunque también se ha descrito cierta actividad en testículo, cerebro, glándulas adrenales, pulmón y pituitaria. Está ampliamente demostrado que la concentración plasmática de Lp(a) viene determinada por su síntesis, más que por su catabolismo²³.

El proceso de síntesis es el siguiente: el RNAm transcrito a partir del gen es traducido por los ribosomas, dando lugar a un precursor de apo(a) de menor peso molecular²², que deberá sufrir un proceso de maduración. En primer lugar, la proteína queda retenida durante un tiempo prolongado (30-120 min) en el retículo endoplásmico (RE)²⁴, donde es plegada correctamente gracias a la actividad de la chaperona calnexina, y tras glicosilarse es secretada al citoplasma. Posteriormente, se transporta al aparato de Golgi para terminar su maduración y poder ser liberada al exterior de la célula²⁵.

Existen varios trabajos que explican algunos mecanismos postranscripcionales como posibles moduladores de la concentración plasmática de Lp(a), encaminados a localizar potenciales dianas terapéuticas. Por un lado, se ha descrito la acción

proteolítica del proteosoma sobre el precursor de apo(a) que no llega a madurar; de esta manera, las isoformas de mayor tamaño, al no poder plegarse correctamente serían degradadas por esta vía ²⁶.

Para concluir el proceso de síntesis de la lipoproteína es necesario el ensamblaje entre la fracción lipídica y la proteína apo(a) sintetizada. Aunque no está del todo aclarado, parece que este proceso es extracelular, o bien asociado a la membrana plasmática del hepatocito ⁹.

En cuanto al catabolismo, a pesar de lo que en un principio se pensó, la eliminación de la lipoproteína del torrente circulatorio no está mediada por el receptor LDL (LDLR). Se ha observado que, tanto los pacientes con hipercolesterolemia familiar (FH) debida a mutación en el LDLR, como los que presentan apo B-100 defectuosa familiar (FDB) presentan un aumento en la concentración de Lp(a); sin embargo, estos datos no evidencian la implicación del LDLR en la eliminación de Lp(a), ya que los fármacos que disminuyen los niveles de LDL en estos pacientes estimulando la actividad del LDLR, no tienen ningún efecto sobre la concentración plasmática de Lp(a) ^{27, 43}.

Algunos estudios señalan el riñón como órgano principal para la eliminación de Lp(a), por la aparición de fragmentos de apo(a) en orina ²⁸. Sin embargo, la cantidad que se encuentra es demasiado baja. Otro de los datos que evidencian cierto papel del riñón es la elevación de Lp(a) en los trastornos renales; y además, se ha descrito la presencia glomerular de apo(a) por inmunohistoquímica. Por otro lado, se han propuesto otras vías alternativas para la eliminación de Lp(a), como la internalización por parte de los macrófagos.

Un último aspecto a señalar es que la regulación de la concentración de Lp(a) es independiente de la regulación de otras lipoproteínas que contienen apo B-100, de modo que los niveles de Lp(a) no están asociados ni correlacionan con otros componentes del metabolismo lipídico, a excepción de los triglicéridos ^{29, 30}.

1.5. Modelos de estudio

El estudio de Lp(a) se ve dificultado por el hecho de que únicamente está presente en algunos primates y en el erizo (*Erinnaceus Europeans*)³¹. El uso de otras especies como el ratón o el conejo requieren la producción de transgénicos para apo(a) y aún así, no reflejan correctamente el modelo fisiológico de la especie humana.

Otra alternativa es el trabajo con cultivos celulares primarios, pero también presenta sus limitaciones, ya que el aislamiento de hepatocitos humanos requiere un procedimiento complejo y la duración de los cultivos es muy limitada. Por otro lado están los cultivos de la línea HepG2; sin embargo, estas células no expresan el gen LPA, por lo que requieren un proceso de transfección que también complica el estudio.

Aunque son numerosos los esfuerzos realizados para caracterizar la Lp(a) y su relación con las enfermedades cardiovasculares, la complejidad misma de esta lipoproteína, así como la carencia de modelos de estudio adecuados, hacen difícil la obtención de datos definitivos que permitan definir líneas claras de acción en cuanto al diagnóstico y la terapia.

2. OBJETIVOS

Existe interés por definir qué factores determinan la concentración plasmática de la Lp(a): su tasa de transcripción, la estabilidad del RNAm, el procesamiento intracelular, la secreción, el ensamblaje... y así poder caracterizar mejor dicha lipoproteína con el fin de definir posibles dianas terapéuticas. En este contexto, el objetivo principal de este trabajo es analizar la relación existente entre la expresión del gen LPA en tejido hepático humano y la concentración plasmática de Lp(a).

Objetivos específicos:

- Determinar el valor de la concentración plasmática de Lp(a) de cada uno de los sujetos en estudio.
- Analizar la expresión del gen LPA en cada sujeto.
- Determinar si existe correlación entre la expresión del gen LPA y la concentración plasmática de Lp(a).

3. METODOLOGÍA

3.1. Procesamiento de la muestra

En el estudio se incluyeron 65 sujetos que fueron sometidos a cirugía por el servicio Quirúrgico Hepatobiliar del Hospital Universitario Miguel Server. Las causas de las intervenciones fueron patologías diversas, principalmente hepatocarcinomas. Todos ellos firmaron el consentimiento informado para la manipulación de las muestras.

Tras extraer un segmento hepático de tejido sano en cada intervención, se incluyó en la solución de Belzer (*Universidad de Wisconsin*); al mismo tiempo se obtuvo una muestra de sangre de cada paciente por punción venosa, tras ayuno previo de 10-12 horas. Se extrajeron 10mL de sangre en tubos con 1mg/dL de EDTA como anticoagulante. El material se transportó en hielo y en el menor tiempo posible.

De cada muestra de tejido obtenida, se extrajeron, en condiciones estériles y libres de RNasas, varios fragmentos de 1 mm³, que se incluyeron en RNA Later (Sigma) y posteriormente se congelaron a -80°C.

3.2 Determinación de la concentración plasmática de Lp(a)

Las muestras de sangre se centrifugaron en una centrifuga Allegra X-15R (Beckman Coulter), a 3000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C; parte del plasma obtenido se alicuotó y se conservó a -80°C para análisis posteriores.

La determinación de la concentración plasmática de Lp(a) se llevó a cabo en el Servicio de Bioquímica del Hospital Universitario Miguel Servet, por medio de una técnica de inmunonefelometría en un equipo IMMAGE 800 (Beckman Coulter).

3.3 Extracción de RNA total

Todo el proceso de extracción de RNA se realizó en una campana de extracción Filtair 824 (Captair). El experimento se llevó a cabo en condiciones estériles y libres de

RNAsas, utilizando RNasa Zap (Life Technologies) y procurando trabajar a la mayor velocidad posible. Para extraer el RNA se utilizaron dos métodos diferentes, con el fin de mejorar el rendimiento del proceso, así como para evitar la degradación del producto. En cualquier caso, el protocolo fue precedido de una etapa de homogeneización de la muestra.

Homogeneización:

- Tras descongelar el tejido, se tomó un fragmento de 50 mg aproximadamente.
- Se introdujo en TRIZOL (Life Technologies) y se homogeneizó con un homogeneizador Ultra-Turrax (IKA) hasta obtener un lisado de aspecto homogéneo.

Extracción con TRIZOL

La ventaja de este método es la alta concentración de RNA que se obtiene de cada muestra, aunque el grado de impurezas es mayor y además, dada la duración del protocolo, existe mayor riesgo de que el producto se degrade. El reactivo sobre el que se homogeneiza la muestra es el TRIZOL (Guanidina Tiocianato-Fenol-Cloroformo) (Life Technologies), sustancia tóxica y volátil que conviene manipular en campana. Se utilizó 1 mL de reactivo por muestra.

- En primer lugar se incubaron las muestras homogeneizadas, durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir una completa disociación de los complejos nucleoproteicos.
- Pasada la incubación, se centrifugaron a 12.000 g, durante 10 minutos, a 5°C; el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. De esta forma, se eliminan los restos celulares.
- Se añadieron 200 μ L de cloroformo y se agitó durante 15 segundos, dejando después incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente.

- Las muestras se centrifugaron a 12.000 g, durante 10 minutos, a 5°C, de modo que la solución se separó en tres fases: la inferior, de fenol y cloroformo, la intermedia y la superior, incolora que contenía el RNA. Se tomó cuidadosamente esta última fase y se transfirió a un tubo nuevo.
- Para provocar la precipitación del RNA, se añadieron 0,5 mL de alcohol isopropílico y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Se centrifugó a 12.000 g, durante 10 minutos, a 3°C y se obtuvo un precipitado blanquecino que contenía el RNA.
- Se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado añadiendo 1 mL de etanol 75% y agitando con un agitador tipo vórtex.
- Las muestras se centrifugaron a 7.500 g, durante 5 minutos, a 5°C y se volvió a desechar el sobrenadante, con cuidado de no recoger el precipitado.
- El precipitado se dejó secar al aire durante 6 minutos aproximadamente, evitando que se secase completamente, ya que esto disminuiría posteriormente su solubilidad.
- El RNA contenido en el precipitado se resuspendió en 30 µl de H₂O estéril tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), incubándolo a 55°C y, tras una breve centrifugación, se almacenó a -80°C.

Extracción mediante columna

En este caso, aunque el reactivo de homogeneización es también el TRIZOL, la extracción se realiza por adhesión del RNA a una columna. El kit Direct-zol RNA Miniprep (Zymo Research) está diseñado para extraer el RNA total de cualquier tipo de muestras, incluidos tejidos humanos. La ventaja de este método es que es muy rápido, lo que disminuye el riesgo de degradación; sin embargo, la concentración de RNA obtenida es menor.

- El tejido se homogeneizó en 500 μL de TRIZOL y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Para eliminar los restos celulares, se centrifugó a 12.000 g, durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.
- Se añadieron 500 μL de etanol absoluto y se mezcló con vórtex. La solución se aplicó directamente en la columna y se centrifugó a 12.000 g, durante 1 minuto a temperatura ambiente. De esta forma, el RNA quedó adherido a la columna. Se desechó, por tanto, el eluido y se transfirió la columna a un nuevo tubo colector.
- Sobre la columna se añadieron 400 μL de la solución de prelavado y después se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior. Esta etapa se repitió una vez más.
- Se añadieron 700 μL de la solución de lavado, volviendo a centrifugar a 12.000 g, durante 1 minuto a temperatura ambiente y desechando el eluido. De esta forma se consiguió eliminar las impurezas de la columna.
- Para secar la columna se centrifugó en un tubo vacío a 12.000 g, durante 2 minutos a temperatura ambiente. Después se transfirió cuidadosamente la columna a un tubo nuevo.
- Para eluir el RNA, se calentó previamente el H_2O DEPC a 70°C y, tras añadir 70 μL sobre la matriz de la columna, se dejó incubar durante 5 minutos. Después se hizo una última centrifugación a velocidad máxima, durante 1 minuto, a temperatura ambiente.
- El RNA disuelto en H_2O DEPC se almacenó a -80°C .

Cuantificación del RNA extraído

Para determinar la concentración de RNA total, se realizó un análisis espectrofotométrico con un equipo Nanodrop2000 (Thermo Scientific),

utilizando como blanco el H₂O DEPC en la que se disolvió el RNA extraído. Para cada muestra se midió la absorbancia a 260 nm. Para definir la pureza de cada muestra, se determinó que la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} fuera igual o superior a 1,7. Las muestras cuya concentración fuera menor de 400 ng/ μ L se descartaron, volviendo a repetir el proceso de extracción, ajustando las condiciones.

Determinación de la calidad del RNA

La espectrofotometría aporta información sobre la concentración de RNA y el grado de impureza de la muestra, pero no determina la calidad del RNA extraído, de modo que es necesaria otra técnica para analizar la integridad del RNA. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. El dato que determina la adecuada calidad del RNA es la visualización clara de dos bandas correspondientes a las dos subunidades del RNA ribosómico de 28S y 18S, siendo la banda superior de mayor intensidad que la inferior; la aparición de una banda difusa y continua indica que el producto está degradado.

Tras probar distintas condiciones para la electroforesis, se utilizaron las que se describen a continuación:

- Se preparó un gel de 40 mL al 1,2% de Agarosa (Life Technologies) en TAE 1x con 1 μ L de SYBR safe (Life Technologies).
- En cada pocillo del gel se aplicaron 5 μ L de RNA y 5 μ L de tampón de carga 2x (Azul de Bromofenol).
- Como marcador de peso molecular se utilizó O'Gene Ruler DNA Ladder Mix (MBI-Fermentas) y se aplicaron 3 μ L con 5 μ L de tampón de carga.
- La electroforesis se realizó a 80 V, durante 1 hora y 15 minutos.
- La visualización del gel se realizó en un transiluminador BT-20.M (UVI Tec), con el programa informático UVI Photo MW.

Aquellas muestras que presentaron un patrón de RNA degradado, se descartaron y se repitió el proceso de extracción.

3.4 Retrotranscripción

Con el fin de cuantificar posteriormente la expresión del gen LPA, se realizó una retrotranscripción del RNA total a cDNA. Las siguientes técnicas se realizaron en hielo y en cabina de flujo Mini-V/PCR (Telstar), específica para PCR. En cada una de las etapas se añadió un blanco con H₂O DEPC, para comprobar que no hubiera contaminaciones.

Tratamiento con DNasa

En primer lugar se sometieron las muestras a un tratamiento con DNasa para eliminar la posible contaminación con DNA del experimento anterior.

- Tras descongelar las muestras de RNA se tomaron entre 2,5 y 4 µg de RNA total según las concentraciones obtenidas por espectrofotometría.
- Se añadió a cada muestra 1 µL de tampón 10x (Ambion) para la reacción de la DNasa, 0,4 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de TURBO DNasa I (Ambion) de 2U/µL y el volumen correspondiente de H₂O DEPC hasta un total de 10 µL.
- Las muestras se incubaron en un termociclador System 9700 (Applied Biosystems) con un programa térmico de dos etapas: una de 45 minutos a 37°C y otra de 10 minutos a 65°C para inactivar la DNasa I.
- Se volvieron a poner las muestras en hielo y se centrifugaron.

Retrotranscripción

Se realizó una retrotranscripción con cebadores al azar, lo que requirió una etapa previa de ensamblaje de cebadores.

- A los 10 µl obtenidos en el proceso anterior, se añadieron 0,5 µL de cebadores al azar a una concentración de 300 ng/µL y se completó con H₂O DEPC hasta un volumen total de 11 µL.
- Se incubó en el termociclador a 65°C durante 5 minutos.

- Se volvieron a poner las muestras en hielo y se centrifugaron.
- A cada muestra se añadió 1 μL de una mezcla de dNTP (Life Technologies) 10 mM, 4 μL de First Strand Buffer 5x (Life Technologies), 2 μL de DTT 0,1 M (Life Technologies) para desnaturalizar las estructuras secundarias, 1 μL de la enzima RNasa-OUT (Life Technologies) de 40U/ μL para evitar la degradación del RNA y finalmente, 1 μL de la enzima de retrotranscripción SuperScript III de 200U/ μL (Life Technologies).
- El programa térmico aplicado fue de tres etapas: una primera de 10 minutos a 25°C, la segunda de 1 hora a 50°C y la tercera de 15 minutos a 70°C, para inactivar la reacción.

PCR de comprobación

Para constatar que la retrotranscripción se había realizado correctamente, se amplificó el cDNA del gen ABCA1, por medio de una reacción de PCR. Como control positivo de la reacción se añadió una muestra de DNA genómico.

- Sobre el producto de la reacción anterior, se hizo una dilución para tener el cDNA a una concentración de 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. De cada una se tomó un volumen de 5 μL . De DNA genómico se añadieron 2 μL y se completó el volumen con 3 μL de H₂O DEPC.
- A cada una se añadieron 2 μL de tampón de PCR 10x (Life Technologies), 0,6 μL de MgCl₂ 50 mM y 9,9 μL de H₂O estéril.
- Posteriormente se añadieron 1,6 μL de una mezcla de dNTP 2,5 mM (Life Technologies), 0,4 μL de cada uno de los cebadores, D R219K y R R219K a una concentración de 10 μM , y finalmente 0,1 μL de Taq DNA Polimerasa de 5U/ μL (Life Technologies).
- El programa térmico aplicado fue el siguiente: una primera etapa de 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el DNA y 40 ciclos en las siguientes condiciones: 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C; por

último, una etapa de 10 minutos a 72°C, para permitir la extensión completa de todas las hebras de DNA.

- El producto de la retrotranscripción, tanto el original, como la dilución, se conservaron en congelador a -20°C.

Análisis del producto de PCR

Para comprobar la amplificación del cDNA y por tanto, confirmar la reacción de retrotranscripción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa en las siguientes condiciones:

- Se preparó un gel de 40 mL al 1% de Agarosa (Life Technologies) en TAE 1x con 1µL de SYBR safe (Life Technologies).
- En cada pocillo del gel se aplicaron 10 µL del producto de amplificación (para el DNA genómico sólo se añadieron 3 µL) y 4 µL de tampón de carga (Xylene Cyanole 1x)
- La electroforesis se corrió a 90 V, durante 40 minutos.
- La visualización del gel se realizó en un transiluminador BT-20.M (UVI Tec), con el programa informático UVI Photo MW.

3.5 PCR cuantitativa en tiempo real

Esta técnica constituye la última etapa para la cuantificación de la expresión del gen LPA. La técnica seleccionada fue la de cuantificación relativa mediante la utilización de sondas TaqMan. El material utilizado fue el siguiente:

- Sonda TaqMan y cebadores del gen diana, LPA, de Applied Biosystems, asociados a una zona no variable del gen.
- Sonda TaqMan y cebadores del gen elegido como control endógeno, GAPDH.

- TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), que contiene entre los reactivos de PCR necesarios, la DNA Polimerasa AmpliTaq Gold. Además incluye un control interno pasivo de fluorescencia (ROX).
- Equipo ViiA7 de Applied Biosystems y el programa, ViiA7 Software v 1.1.

Todo el experimento se realizó en la cabina de flujo específica para PCR y sobre hielo. El proceso se diseñó en dos etapas:

Determinación de la concentración óptima de cDNA

En primer lugar se construyó una recta estándar para determinar la concentración adecuada de cDNA para poder cuantificar posteriormente la expresión tanto del gen de interés, LPA, como del control endógeno GAPDH. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

- En primer lugar se preparó una mezcla con el cDNA de todos los sujetos, obtenido tras la retrotranscripción y utilizado para realizar la PCR de comprobación. A partir de ésta se prepararon 3 diluciones seriadas a una concentración 1:10 en H₂O destilada; de esta manera, las concentraciones de cDNA por fueron:

Dilución 1	10 ng/μL de cDNA
Dilución 2	1 ng/μL de cDNA
Dilución 3	0,1 ng/μL de cDNA
Dilución 4	0,01 ng/μL de cDNA

- En cada pocillo de la placa de PCR se aplicaron 10 μL de la mezcla de reacción, 4 μL de H₂O destilada, 1 μL de la solución con los cebadores y la sonda TaqMan del gen correspondiente, y los 5 μL de cada una de las cuatro diluciones preparadas, por triplicado para cada gen. También se añadió un blanco para cada uno, sustituyendo el cDNA por H₂O destilada.

Antes de colocar la placa en el equipo, se selló y se centrifugó durante 3 minutos a 3.000 rpm para eliminar las burbujas formadas.

- El programa térmico aplicado presentaba una primera etapa de desnaturalización de 10 minutos a 95°C y otra segunda, con 50 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. La lectura de la fluorescencia emitida por la liberación del fluorocromo reportero se realizó en esta última etapa de cada uno de los ciclos.
- De los resultados obtenidos se seleccionó la dilución a la cual la señal de fluorescencia comenzaba a aumentar entre los ciclos 20 y 25. En ambos casos, tanto para el gen GAPDH como para el gen LPA resultó ser la dilución 1, es decir, aquella cuya concentración de cDNA era máxima: 10 ng/μL.

Análisis de la expresión génica

Una vez determinada la concentración óptima de cDNA, se pasó a cuantificar la expresión del gen LPA de cada sujeto.

- En cada pocillo de la placa de PCR, se aplicaron 10 μL de la mezcla de reacción, 4 μL de H₂O destilada, 1 μL de la solución con los cebadores y la sonda TaqMan de cada gen, y 5 μL de la dilución 1 del cDNA de cada sujeto, por triplicado para cada gen. También se añadió un blanco para cada uno de los genes, sustituyendo el cDNA por H₂O destilada.. Antes de colocar la placa en el equipo, se selló y se centrifugó durante 3 minutos a 3.000 rpm.
- El programa térmico consistió, como en el caso anterior, en una primera etapa de 10 minutos a 95°C de desnaturalización y otra segunda, con 50 ciclos repetitivos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. La lectura de la fluorescencia emitida se realizó en la última etapa de cada ciclo.

Análisis de datos

Dado que la eficiencia de la reacción de amplificación del gen diana y la del control endógeno fue igual, el cálculo de la expresión génica se realizó por el método $\Delta\Delta C_t$ (C_t = Ciclo umbral).

En primer lugar, de los triplicados de Ct, se eliminaron aquellos valores que elevaban la desviación estándar por encima de 0,38; con los Ct restantes se calculó una media para cada sujeto.

La normalización de los datos se llevó a cabo calculando el valor de ΔCt , a partir del control endógeno. Para poder determinar el $\Delta\Delta Ct$ se seleccionó como control el sujeto cuyo valor de ΔCt fuera mayor, de modo que en los resultados finales, todos los valores estuvieran por encima de éste. Es decir, se seleccionó el que presentaba la expresión de LPA menor.

Finalmente, a partir de la siguiente fórmula, se calculó el número de veces que se sobreexpresaba el gen, con respecto al control.

$$FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

(FC, número de veces de cambio con respecto al control)

Cada una de las placas se analizó por separado y, posteriormente, se realizaron los cálculos para combinar los datos y poder establecer la comparación de la expresión de cada sujeto con respecto a un solo control.

4. RESULTADOS

4.1. Concentración plasmática de Lp(a)

Dado que los sujetos en estudio sufren distintas patologías, para poder realizar una correcta estimación de la concentración de Lp(a), se recogieron, además del primer valor de Lp(a) plasmática, hasta un máximo de cinco determinaciones diferentes de la concentración de Lp(a) de cada uno. Además, se procuró que la toma de muestras estuviera separada por un espacio de tiempo superior a una semana.

De los valores de Lp(a) obtenidos se descartaron aquellos que iban asociados a niveles de albúmina inferiores a 3 g/dL, ya que este valor sirve de indicativo de una correcta función hepática. Posteriormente se calculó la media con los valores restantes.

La concentración plasmática de Lp(a) de cada sujeto seleccionado para este estudio se presenta en la Tabla 2: La primera columna corresponde al número de muestra asignado a cada sujeto; la segunda, recoge el número de determinaciones analíticas incluidas en el estudio; la tercera, presenta la concentración plasmática de Lp(a) del día en que se tomó la muestra de tejido hepático; la cuarta, muestra el valor medio de todas las determinaciones analíticas de Lp(a) calculado para cada sujeto; y la última, corresponde al ratio de Lp(a) con respecto a la concentración de albúmina, determinada con los datos de la primera analítica.

De las 65 muestras recogidas, se pudo obtener una adecuada estimación de la concentración plasmática de Lp(a) en 44 casos. La exclusión del estudio de los 21 sujetos restantes se debió a la falta de más de una analítica fiable, bien por fallecimiento o porque el paciente no correspondía al sector médico del Hospital.

Tabla 2: Resultados de las determinaciones analíticas de Lp(a) plasmática.

MUESTRA	Nº DE ANALÍTICAS	1ª CONCENTRACIÓN Lp(a) (mg/dL)	CONCENTRACIÓN MEDIA Lp(a) (mg/dL)	RATIO 1ª Lp(a) / Albúmina
2262	3	45,7	120	14,3
2271	3	0	0	0
2294	5	11	71,18	3,3
2295	3	34,7	44,1	
2302	4	26,4	41,3	8,3
2381	3	10,4	20,25	4,3
2420	5		97,95	
2432	4	0	2,59	
2442	4	17,1	37,17	
2448	3	10,5	4,77	3,3
2450	4	54,9	60,4	16,1
2468	3	19,2	22,1	
2472	3	0	1,3	
2505	4	3,2	3,31	1,2
2559	4	92,1	107,25	27,9
2560	3	43,1	109,7	14,4
2574	4	44,3	86,5	14,8
2582	3	83,8	78,67	23,3
2588	3	6,6	7,89	1,7
2593	2	5,4	5,56	1,7
2594	2	4,6	6,58	1,2
2600	3	5,8	7,28	1,7
2623	3	70,6	50,43	22,1
2628	2	5,2	10,02	1,4
2636	4	3,5	7,82	
2645	2	8,2	7,79	1,9
2653	3	0	0,94	0
2656	4	38,9	44	12,5
2676	4	73,1	59,33	20,3
2683	2	3,7	3,35	1
2696	3	2,2	2,36	0,7
2713	4	3,4	4,36	0,9
2719	3	15,3	15,3	5,3

2727	3	54,3	49,37	17,5
2739	3	3,7	4,16	1,1
2749	4	112	86,85	40
2776	3	42,8	32,97	
2779	2	97,5	129,75	25
2781	2	3,1	3,1	0,9
2824	2	16	16	3,2
2825	1	7,7	7,7	2,5
2826	3	43,8	38,7	13,7
2829	2	17,6	18,75	5,3
2856	1	0	0	0

Como puede observarse en la Tabla 2, el rango de concentración plasmática de Lp(a) entre los distintos sujetos es muy amplio, adoptando valores entre 0 y 130 mg/dL. La variación existente entre las distintas determinaciones de cada paciente es relativamente pequeña en la mayoría de los casos y puede deberse, tanto a la falta de sensibilidad del método inmunoquímico utilizado, como a variaciones en el estado general del paciente. Con el fin de minimizar estas variaciones, se calculó el ratio de concentración de Lp(a) con respecto a la concentración de albúmina. No fue posible calcular este ratio en 5 sujetos, porque no se disponía del valor de albúmina correspondiente.

4.2. Extracción de RNA

Del tejido hepático de cada uno de los sujetos pudo aislarse el RNA total, obteniéndose unos valores ligeramente distintos según el método de extracción: los RNAs extraídos con el protocolo de TRIZOL presentaron una concentración media de 1.300 ng/ μ L, mientras que de la extracción mediante columna se obtuvo un valor medio de 650 ng/ μ L. En cuanto a la evaluación de la pureza del RNA, calculado a partir del ratio de absorbancias A_{260}/A_{280} , para el primer método resultó ser de $1,8 \pm 0,09$, mientras que para el segundo, el ratio fue de $1,91 \pm 0,1$. Por tanto, la extracción de RNA mediante el método de columna permitió obtener un producto con menor grado de impurezas.

En cuanto a la integridad del RNA evaluado por electroforesis, los primeros experimentos realizados revelaron un patrón de bandas que no correspondían con las esperadas para el RNAr de 28S y

18S, pero tampoco mostraban una imagen difusa como en el caso de la degradación. Esto supuso una revisión exhaustiva del protocolo y las condiciones de trabajo, para minimizar los riesgos de degradación del producto. Fue en este punto cuando se decidió cambiar de método de extracción. Finalmente, se

optó por variar las condiciones de la electroforesis, así como el material utilizado hasta el momento.

En la Figura 2 se presenta una imagen de un gel de agarosa en el que se ha realizado la electroforesis de RNA de diferentes sujetos. Como puede observarse, los diferentes RNAs obtenidos a partir de tejido hepático resultaron estar íntegros. Únicamente una muestra de tejido resultó estar degradada por su procesamiento inicial, por lo que hubo que desecharla.

4.3 Retrotranscripción

En la Figura 3 se muestra la electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación tras la reacción de PCR, realizada con el cDNA obtenido tras la retrotranscripción. Como puede observarse en la figura, se consiguió una buena amplificación de todos los cDNAs, lo que indicaba que la retrotranscripción había funcionado correctamente.

Figura 2: Electroforesis de RNA en gel de agarosa

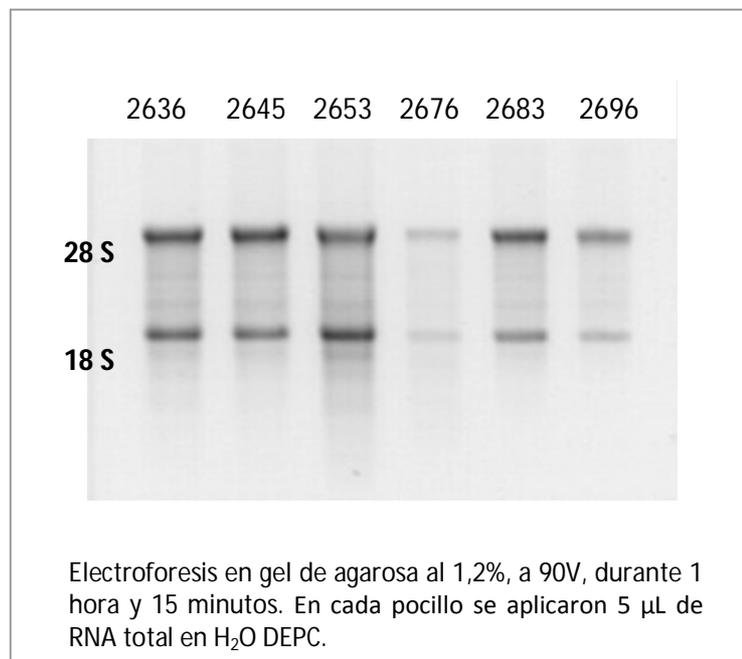
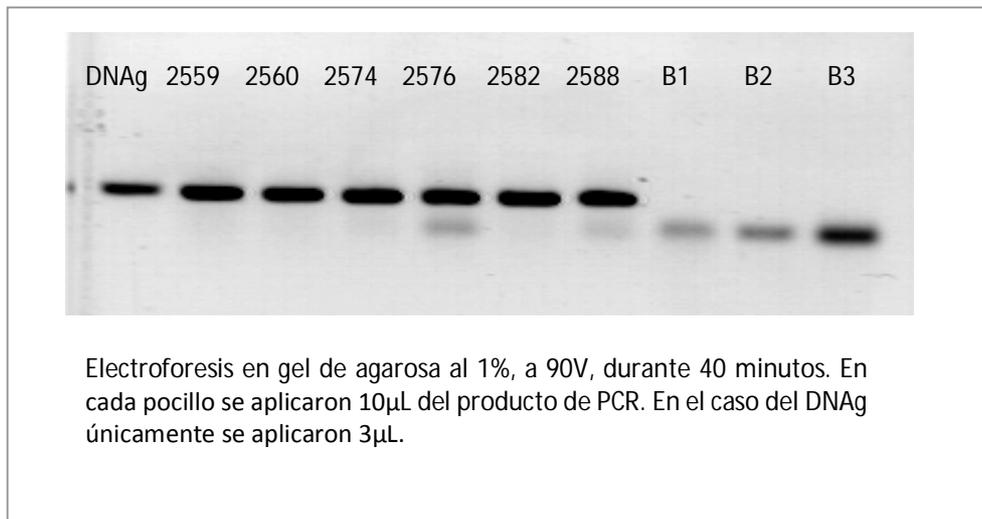


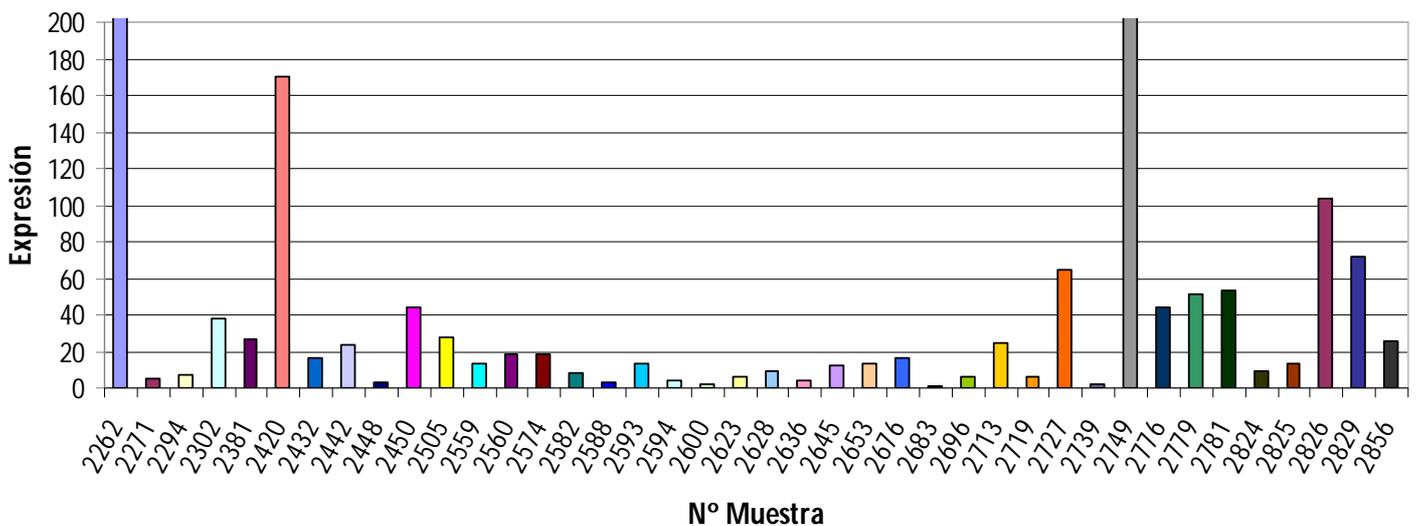
Figura 3: Electroforesis del producto de amplificación por PCR del cDNA



4.4 PCR cuantitativa a tiempo real

El análisis de la expresión del gen LPA reveló que todos los sujetos expresaban dicho gen en mayor o menor medida. Como puede verse en la Figura 4, el rango de variabilidad de la expresión fue muy elevado, igual que el de la concentración plasmática. En el gráfico se muestra el número de veces que el gen LPA está sobreexpresado con respecto al control seleccionado, el sujeto 2683.

Figura 4: Gráfico de la expresión génica de LPA



Por otro lado, cabe señalar que aunque la mayoría de los sujetos presentaron valores inferiores a 50, 5 sujetos presentaron valores de expresión génica por encima de 100; en concreto el sujeto 2262 presentó un valor de 318 veces mayor que el control y el 2749, de 559 veces.

De los sujetos en estudio hubo que eliminar aquellos cuyos valores medios de expresión génica presentaban una desviación estándar superior a 0,38, de modo que el tamaño muestral final fue de 40. En la Tabla 3 se muestran los valores de expresión génica de cada sujeto (Columna 2), junto con las concentraciones plasmáticas de Lp(a) previamente determinadas: la columna 3 corresponde a la determinación analítica tomada el día en que se extrajo el tejido hepático; la cuarta, a la media calculada para los valores de Lp(a) disponibles de cada sujeto; y la última, al ratio de Lp(a) con respecto a la concentración de albúmina, correspondiente al momento de la toma de muestra de tejido.

Tabla 3: Valores de expresión génica de LPA y de concentración plasmática de Lp(a)

MUESTRA	EXPRESIÓN	1ª CONCENTRACIÓN Lp(a) (mg/dL)	CONCENTRACIÓN MEDIA Lp(a) (mg/dL)	Ratio Lp(a) / Albúmina
2262	317,912	45,7	120,00	14,3
2271	5,437	0,0	0,00	0,0
2294	7,636	11,0	71,18	3,3
2302	37,874	26,4	41,30	8,3
2381	26,326	10,4	20,25	4,3
2420	170,536	28,9	97,95	11,1
2432	16,614	0,0	2,59	
2442	24,083	17,1	37,17	
2448	2,695	10,5	4,77	3,3
2450	44,245	54,9	60,40	16,1
2505	27,820	3,2	3,31	1,2
2559	13,076	92,1	107,25	27,9
2560	18,878	43,1	109,65	14,9
2574	18,097	44,3	86,50	15,3
2582	8,228	83,8	78,67	23,3
2588	2,743	6,6	7,89	1,7
2593	12,952	5,4	5,56	1,7

2594	4,034	4,6	6,58	1,2
2600	2,029	5,8	7,28	1,7
2623	6,547	70,6	50,43	22,1
2628	9,078	5,2	10,02	1,4
2636	3,733	3,5	7,82	
2645	12,686	8,2	7,79	1,9
2653	13,275	0,0	0,94	0,0
2676	15,966	73,1	59,33	20,3
2683	1	3,7	3,35	1,0
2696	5,800	2,2	2,36	0,7
2713	24,331	3,4	4,36	0,9
2719	6,444	15,3	15,30	5,3
2727	64,450	54,3	49,37	17,5
2739	2,511	3,7	4,16	1,1
2749	558,651	112,0	86,85	40,0
2776	44,260	42,8	32,97	
2779	51,600	97,5	129,75	25,0
2781	52,975	3,1	3,10	0,9
2824	9,633	16,0	16,00	3,2
2825	13,010	7,7	7,70	2,5
2826	103,268	43,8	38,70	13,7
2829	72,185	17,6	18,75	5,3
2856	25,675	0,0	0,00	0,0

4.5 Análisis estadístico

Con el fin de evaluar la relación entre la concentración plasmática de Lp(a) y la expresión del gen LPA se llevó a cabo un análisis estadístico con el programa SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

Dado que el análisis de la normalidad de las variables reveló que éstas presentaban una distribución no normal, se aplicó un test de Spearman para determinar la correlación existente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4; como puede observarse, existe una correlación positiva entre la expresión génica de LPA y cualquiera de los valores de concentración plasmática de Lp(a).

Tabla 4: Test de Spearman

		1 ^a Concentración Lp(a)	Concentración media Lp(a)	Ratio Lp(a)/Albúmina
Expresión	Coefficiente de correlación	0,444	0,465	0,414
	P	0,004**	0,002**	0,012*

* P<0,05

** P<0,01

A continuación se realizó un análisis de regresión lineal para determinar en qué grado la expresión génica condiciona la concentración plasmática de Lp(a). Para ello se utilizó el dato de la primera concentración obtenida, ya que era la correspondiente al día en que se tomó la muestra de tejido y por tanto, el valor más aproximado. Dado que la variable dependiente (1^a concentración Lp(a)), seguía una distribución no normal, se hizo necesario normalizarla calculando el Ln.

En la ecuación de la recta de regresión se muestra el modo en que varía el Ln de la concentración de Lp(a) en función de la expresión génica de LPA. El valor de R² corregida, para el análisis es de 0,128, lo que indica que la expresión del gen LPA determina en un 12,8% la concentración plasmática de Lp(a).

$$\text{Ln [Lp(a)]} = 2,168 + 0,006 \times \text{Expresión génica}$$

5. DISCUSIÓN

La lipoproteína(a) es una lipoproteína definida como factor de riesgo cardiovascular independiente ²; y el hecho de que esté implicada en el proceso aterogénico ha favorecido que sean numerosos los esfuerzos dedicados a su estudio. Estos esfuerzos se han visto incrementados tanto por la complejidad de la partícula en sí, como por la carencia de modelos de investigación adecuados.

La principal apolipoproteína de Lp(a), apo(a), está codificada por un gen que presenta más de 34 alelos, incluyendo alelos nulos ^{21, 22}; esta diferencia de tamaño génico, que viene dada por el número de repeticiones del fragmento que codifica el Kringle IV-2, produce una proteína, que presenta múltiples isoformas con distintos pesos moleculares (de 280 a 800 KDa) ¹⁰, siendo en cualquier caso, de un tamaño superior que la mayoría de las proteínas de la especie humana. Cada sujeto presentará una o dos isoformas de apo(a) y de la lipoproteína resultante. Por otro lado, existe una relación inversa entre el tamaño de apo(a) y la concentración plasmática de Lp(a)²³, que será constante para cada individuo a lo largo de su vida. Como describe Marcovina S. en numerosos artículos ^{15, 32}, a esto hay que añadir la complicación que genera la presencia de las múltiples repeticiones del Kringle IV-2, que condiciona los métodos inmunoquímicos utilizados. Esto deberá tenerse en cuenta, para evitar una sobreestimación o subestimación de la concentración plasmática de Lp(a). En el presente estudio, el método inmunoquímico utilizado es independiente del tamaño de la partícula, ya que el epítipo de reconocimiento se encuentra en un fragmento no repetitivo. Tras la recogida de la primera analítica, para el estudio de expresión, se continuaron recogiendo datos de cada sujeto, para poder llegar a una correcta estimación de la concentración de Lp(a) de cada uno. Estos primeros resultados coinciden con lo ya descrito: existe una gran heterogeneidad en cuanto a los valores de Lp(a) de cada individuo, variando en este caso, en un rango de 0 a 130 mg/dL. Aunque la mayoría de los sujetos presentó unos niveles dentro del rango establecido (0-30 mg/dL), algunos presentaron valores superiores a 100 mg/dL, lo que podría sugerir la conveniencia de incluir la determinación de este analito en las analíticas rutina. A pesar de haberse establecido la Lp(a) como factor de riesgo cardiovascular, su

determinación no es habitual entre la población y la interpretación de los valores analíticos no es del todo evidente. Las causas que explican este hecho son múltiples: por un lado, aunque clínicamente se ha establecido un valor límite de referencia, este varía entre las distintas poblaciones; además, se plantea la duda sobre cuáles son las unidades adecuadas para presentar los datos: mg/dL o molaridad. Marcovina afirma que lo correcto sería utilizar unidades molares, pero debido a la presencia de las distintas isoformas, no podría utilizarse un único factor de conversión¹⁵. Debido a estas y otras complicaciones el Panel de Expertos Americano, ATPIII⁴⁴, sugiere determinar el valor de Lp(a) sólo en aquellos sujetos que presenten previamente un primer factor de riesgo cardiovascular. Este es el caso de pacientes con historial familiar de enfermedad vascular, o bien sujetos con hipercolesterolemia de causas genéticas.

Por otro lado, se ha descrito una correlación positiva entre Lp(a) y albúmina³³, por lo que se utilizó este valor para obtener un ratio; de esta forma, se normalizó el valor de la concentración plasmática de Lp(a), para poder realizar una comparación más ajustada entre los sujetos.

Como ya se ha mencionado, otro de los aspectos que hacen compleja la caracterización de la lipoproteína (a), es la falta de modelos y material de estudio adecuados, ya que el gen LPA sólo está presente en algunos primates y en el erizo. Actualmente son muchos los grupos de investigación que trabajan con ratones transgénicos para apo(a), pero éstos no reflejan adecuadamente las condiciones fisiológicas de la especie humana. Otra alternativa son los cultivos celulares de hepatocitos humanos: por un lado, se han realizado numerosos estudios utilizando la línea HepG2; sin embargo, estas células no expresan apo(a), siendo necesaria la transfección. En cuanto a los cultivos primarios de hepatocitos, son muy pocos los trabajos publicados hasta el momento, ya que requieren un complejo proceso de aislamiento y su periodo de supervivencia es muy corto. A esto hay que añadir la dificultad de obtener tejido hepático humano sano. En este sentido, este es uno de los aspectos principalmente novedosos de nuestro estudio, ya que el trabajo realizado con tejido hepático humano permite confirmar en la especie humana, algunas de las conclusiones obtenidas en otros modelos animales.

El objetivo principal de este trabajo fue analizar si la tasa de transcripción del gen LPA está asociado a la concentración plasmática de Lp(a). Como era de esperar, se obtuvo una correlación positiva ($R = 0,444$, $P = 0,004$) para ambas variables; esto, junto con el análisis de regresión lineal, nos permitió concluir que la concentración plasmática de Lp(a) depende, entre otros factores, de la tasa de transcripción. Estos datos contradicen el único trabajo realizado sobre expresión de LPA en tejido hepático humano ³⁴, en el que se concluye que no existe una relación significativa entre la concentración de RNAm de LPA y los niveles plasmáticos de la lipoproteína. Sin embargo, el tamaño muestral en ese estudio fue de 25 sujetos y las técnicas utilizadas eran de menor sensibilidad que las actuales. Por otro lado, el trabajo de Azrolan y colaboradores en un modelo de primate contrapone sus resultados al trabajo anterior ³⁵, siendo coherente con nuestros resultados.

En esta misma línea de la etapa transcripcional, estudios más recientes se han centrado en el análisis del promotor y en la región de regulación génica como posibles dianas terapéuticas ³⁶: Huby y colaboradores definieron en un modelo de ratón transgénico para apo(a), que la región reguladora ACR es dependiente de estrógeno, siendo éste un inhibidor de la transcripción ³⁷; también se ha descrito que la aspirina reduce la expresión génica en cultivos primarios de hepatocitos humanos ³⁸.

Por otro lado, el análisis de nuestros resultados indica que la tasa de transcripción no explica de modo absoluto la variación de la concentración plasmática. El modelo de regresión planteado nos permite afirmar que la expresión del gen LPA determina en un 12,8% la concentración plasmática de Lp(a) (R^2 corregida = 0,128), lo que demuestra que deben existir otros mecanismos postranscripcionales que regulen los niveles de Lp(a) plasmática. A este respecto, White y colaboradores analizaron diversos mecanismos celulares que afectan diferencialmente a las distintas isoformas de apo(a) sintetizadas. Por un lado concluyeron que, aunque la mayoría de las moléculas, tras su síntesis y maduración son secretadas, una fracción de éstas sigue una vía alternativa y es degradada por el proteosoma ²⁶. La fracción de apo(a) secretada frente a la degradada es dependiente del tamaño de apo(a). El ejemplo más patente de este proceso son las proteínas del alelo nulo, que, aunque se transcriben y traducen son incapaces de madurar y ser secretadas. Estos resultados son consistentes

con los obtenidos en nuestro estudio, ya que algunos sujetos presentaron una concentración plasmática de Lp(a) de 0, mientras que la expresión génica de LPA presentó valores por encima de 1. Otro de los mecanismos descrito por este grupo es el tiempo de retención diferencial en el RE en función del tamaño de apo(a) y, también en este caso, observaron diferencias entre las distintas isoformas ²⁴.

El mecanismo y localización del ensamblaje es uno de los aspectos más controvertidos en la síntesis de Lp(a) y otro posible modulador de la concentración plasmática de la lipoproteína. Becker y colaboradores describieron el ensamblaje como un proceso de dos etapas ³⁹: las interacciones no covalentes entre apo(a) y apo B-100 de las LDL y posteriormente, la formación del puente disulfuro, que estaría facilitado por una actividad Lp(a) oxidasa secretada por el hepatocito ⁹. Este proceso podría estar localizado bien en el espacio extracelular, o asociado a la membrana celular ⁴⁰.

Aunque cada vez se conoce más sobre el metabolismo y la patogenia de la lipoproteína(a), el esfuerzo por encontrar dianas terapéuticas adecuadas se hace imprescindible, ya que actualmente, la única terapia viable para disminuir la concentración de Lp(a) en sujetos con alto riesgo cardiovascular es la aféresis. En relación con el presente estudio, algunos de los trabajos más recientes, dirigidos a la búsqueda de fármacos para descender los niveles de Lp(a) en los pacientes con riesgo cardiovascular, han centrado su objetivo en determinados aspectos de la maduración postranscripcional de la lipoproteína. Es el caso de Merki y colaboradores, que tras sintetizar un oligonucleótido antisentido dirigido contra el RNAm de apo B-100 (Mipomersen), lo inyectaron en ratones transgénicos; de este modo, lograron que la concentración de Lp(a) disminuyera hasta un 75% ⁴¹. Por tanto, el bloqueo del ensamblaje entre las dos subunidades de la lipoproteína, podría ser un tratamiento efectivo para la reducción de la concentración de Lp(a). No obstante, también se han descrito algunos efectos adversos asociados a este tratamiento ⁴², lo que exige una adecuada evaluación del mismo.

Podría concluirse que la tasa de síntesis de apo(a) es dependiente de tamaño y está regulada, según los resultados obtenidos en este estudio, tanto a nivel transcripcional, como a través de los procesos postranscripcionales, siendo, también estos procesos, dependientes de la isoforma. De esta manera, los alelos con menor

número de repeticiones presentarían una mayor tasa de transcripción; además, los procesos de maduración favorecerían la secreción de la mayoría de las partículas sintetizadas dando lugar a una elevada concentración plasmática de Lp(a). Por el contrario, los alelos de mayor tamaño se expresarían menos y darían lugar a proteínas cuyo tamaño dificultaría el proceso de maduración, y por tanto, la liberación a la circulación sanguínea sería menor; de esta forma, estos individuos tendrían niveles de Lp(a) más bajos o incluso, nulos.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- La concentración plasmática de Lp(a) presenta una gran variabilidad entre la población en estudio.
- Existe una gran heterogeneidad interindividual en la expresión del gen LPA en tejido hepático humano.
- La expresión génica de LPA determina en un 12,8% la concentración plasmática de la lipoproteína(a).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. BERG, K. A New Serum Type System in Man--the Lp System. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 59, 369-382 (1963).
2. Danesh, J., Collins, R. & Peto, R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation* 102, 1082-1085 (2000).
3. Morishita, R. *et al.* Conditioned medium from HepG2 cells transfected with human apolipoprotein(a) gene stimulates growth of human vascular smooth muscle cells: effects of overexpression of human apolipoprotein(a) gene. *Hypertension* 32, 215-222 (1998).
4. Allen, S. *et al.* Expression of adhesion molecules by lp(a): a potential novel mechanism for its atherogenicity. *FASEB J.* 12, 1765-1776 (1998).
5. Syrovets, T., Thillet, J., Chapman, M. J. & Simmet, T. Lipoprotein(a) is a potent chemoattractant for human peripheral monocytes. *Blood* 90, 2027-2036 (1997).
6. Jenner, J. L. *et al.* Effects of age, sex, and menopausal status on plasma lipoprotein(a) levels. The Framingham Offspring Study. *Circulation* 87, 1135-1141 (1993).
7. Fieseler, H. G. *et al.* Serum Lp(a) concentrations are unaffected by treatment with the HMG-CoA reductase inhibitor Pravastatin: results of a 2-year investigation. *Clin. Chim. Acta* 204, 291-300 (1991).
8. Slunga, L., Johnson, O. & Dahlen, G. H. Changes in Lp(a) lipoprotein levels during the treatment of hypercholesterolaemia with simvastatin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 43, 369-373 (1992).
9. Becker, L., Nesheim, M. E. & Koschinsky, M. L. Catalysis of covalent Lp(a) assembly: Evidence for an extracellular enzyme activity that enhances disulfide bond formation. *Biochemistry (N. Y.)* 45, 9919-9928 (2006).
10. Utermann, G. The mysteries of lipoprotein(a). *Science* 246, 904-910 (1989).

11. Guevara, J., Jr, Knapp, R. D., Honda, S., Northup, S. R. & Morrisett, J. D. A structural assessment of the apo[a] protein of human lipoprotein[a]. *Proteins* 12, 188-199 (1992).
12. Kraft, H. G., Sandholzer, C., Menzel, H. J. & Utermann, G. Apolipoprotein (a) alleles determine lipoprotein (a) particle density and concentration in plasma. *Arterioscler. Thromb.* 12, 302-306 (1992).
13. Utermann, G., Duba, C. & Menzel, H. J. Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait. II. Inheritance of Lp(a) glycoprotein phenotypes. *Hum. Genet.* 78, 47-50 (1988).
14. Utermann, G., Kraft, H. G., Menzel, H. J., Hopferwieser, T. & Seitz, C. Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait. I. Relation of LP(a) glycoprotein phenotypes to Lp(a) lipoprotein concentrations in plasma. *Hum. Genet.* 78, 41-46 (1988).
15. Brown, W. V., Ballantyne, C. M., Jones, P. H. & Marcovina, S. Management of Lp(a). *J. Clin. Lipidol.* 4, 240-247 (2010).
16. Nordestgaard, B. G. *et al.* Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur. Heart J.* 31, 2844-2853 (2010).
17. Seed, M. *et al.* Relation of serum lipoprotein(a) concentration and apolipoprotein(a) phenotype to coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 322, 1494-1499 (1990).
18. Frank, S. L. *et al.* The apolipoprotein(a) gene resides on human chromosome 6q26-27, in close proximity to the homologous gene for plasminogen. *Hum. Genet.* 79, 352-356 (1988).
19. Wade, D. P., Lindahl, G. E. & Lawn, R. M. Apolipoprotein(a) gene transcription is regulated by liver-enriched trans-acting factor hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *J. Biol. Chem.* 269, 19757-19765 (1994).
20. Boerwinkle, E. *et al.* Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J. Clin. Invest.* 90, 52-60 (1992).
21. Kraft, H. G. *et al.* Frequency distributions of apolipoprotein(a) kringle IV repeat alleles and their effects on lipoprotein(a) levels in Caucasian, Asian, and African

populations: the distribution of null alleles is non-random. *Eur. J. Hum. Genet.* 4, 74-87 (1996).

22. Marcovina, S. M., Zhang, Z. H., Gaur, V. P. & Albers, J. J. Identification of 34 apolipoprotein(a) isoforms: differential expression of apolipoprotein(a) alleles between American blacks and whites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 1192-1196 (1993).

23. Rader, D. J. *et al.* The inverse association of plasma lipoprotein(a) concentrations with apolipoprotein(a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate. *J. Clin. Invest.* 93, 2758-2763 (1994).

24. White, A. L., Guerra, B. & Lanford, R. E. Influence of allelic variation on apolipoprotein(a) folding in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 272, 5048-5055 (1997).

25. Wang, J., Boedeker, J., Hobbs, H. H. & White, A. L. Determinants of human apolipoprotein [a] secretion from mouse hepatocyte cultures. *J. Lipid Res.* 42, 60-69 (2001).

26. White, A. L., Guerra, B., Wang, J. & Lanford, R. E. Presecretory degradation of apolipoprotein[a] is mediated by the proteasome pathway. *J. Lipid Res.* 40, 275-286 (1999).

27. Snyder, M. L., Hay, R. V., Whittington, P. F., Scanu, A. M. & Fless, G. M. Binding and degradation of lipoprotein(a) and LDL by primary cultures of human hepatocytes. Comparison with cultured human monocyte-macrophages and fibroblasts. *Arterioscler. Thromb.* 14, 770-779 (1994).

28. Oida, K. *et al.* Apolipoprotein(a) is present in urine and its excretion is decreased in patients with renal failure. *Clin. Chem.* 38, 2244-2248 (1992).

29. Nassir, F., Bonen, D. K. & Davidson, N. O. Apolipoprotein(a) synthesis and secretion from hepatoma cells is coupled to triglyceride synthesis and secretion. *J. Biol. Chem.* 273, 17793-17800 (1998).

30. Edelstein, C., Davidson, N. O. & Scanu, A. M. Oleate stimulates the formation of triglyceride-rich particles containing apoB100-apo(a) in long-term primary cultures of human hepatocytes. *Chem. Phys. Lipids* 67-68, 135-143 (1994).
31. Lawn, R. M., Schwartz, K. & Patthy, L. Convergent evolution of apolipoprotein(a) in primates and hedgehog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11992-11997 (1997).
32. Marcovina, S. M. *et al.* Use of a reference material proposed by the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine to evaluate analytical methods for the determination of plasma lipoprotein(a). *Clin. Chem.* 46, 1956-1967 (2000).
33. Motta, M. *et al.* Lipoprotein (a) behaviour in patients with hepatocellular carcinoma. *Minerva Med.* 92, 301-305 (2001).
34. Wade, D. P., Knight, B. L., Harders-Spengel, K. & Soutar, A. K. Detection and quantitation of apolipoprotein(a) mRNA in human liver and its relationship with plasma lipoprotein(a) concentration. *Atherosclerosis* 91, 63-72 (1991).
35. Azrolan, N., Gavish, D. & Breslow, J. L. Plasma lipoprotein(a) concentration is controlled by apolipoprotein(a) (apo(a)) protein size and the abundance of hepatic apo(a) mRNA in a cynomolgus monkey model. *J. Biol. Chem.* 266, 13866-13872 (1991).
36. Wu, J. H. & Lee, I. N. Studies of apolipoprotein (a) promoter from subjects with different plasma lipoprotein (a) concentrations. *Clin. Biochem.* 36, 241-246 (2003).
37. Huby, T. *et al.* Regulation of the expression of the apolipoprotein(a) gene: evidence for a regulatory role of the 5' distal apolipoprotein(a) transcription control region enhancer in yeast artificial chromosome transgenic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1633-1639 (2003).
38. Kagawa, A., Azuma, H., Akaike, M., Kanagawa, Y. & Matsumoto, T. Aspirin reduces apolipoprotein(a) (apo(a)) production in human hepatocytes by suppression of apo(a) gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274, 34111-34115 (1999).
39. Becker, L., Cook, P. M. & Koschinsky, M. L. Identification of sequences in apolipoprotein(a) that maintain its closed conformation: a novel role for apo(a)

isoform size in determining the efficiency of covalent Lp(a) formation. *Biochemistry* 43, 9978-9988 (2004).

40. Lobentanz, E. M. & Dieplinger, H. Biogenesis of lipoprotein(a) in human and animal hepatocytes. *Electrophoresis* 18, 2677-2681 (1997).

41. Merki, E. *et al.* Antisense oligonucleotide directed to human apolipoprotein B-100 reduces lipoprotein(a) levels and oxidized phospholipids on human apolipoprotein B-100 particles in lipoprotein(a) transgenic mice. *Circulation* 118, 743-753 (2008).

42. Gelsinger, C., Steinhagen-Thiessen, E. & Kassner, U. Therapeutic potential of mipomersen in the management of familial hypercholesterolaemia. *Drugs* 72, 1445-1455 (2012).

43. Utermann G. Lipoprotein(a) in "The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease". Volume II, Chapter 116, 2753-2787. Scriver, Beaudet, Valle and Sly, Eds. Mc Graw Hill. Eight Edition (2001).

44. National Cholesterol Education Program. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), II-20-25, (2002).