

# LIPOPROTEINA (a)

## Sua importância como marcador adicional de aterosclerose

ELISA CAMPOS

Departamento de Bioquímica. Faculdade de Ciências Médicas. Lisboa

### RESUMO

A Lipoproteína (a) representa um dos melhores exemplos de heterogeneidade físico-química das lipoproteínas. A sua mobilidade electroforética pré- $\beta$  em gel de agarose é próxima da das VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade); flutua à densidade característica das HDL (lipoproteínas de elevada densidade) e apresenta uma composição lipídica e proteica semelhante à das LDL (lipoproteínas de baixa densidade). A Lipoproteína (a) diferencia-se no entanto pela presença de uma glicoproteína particular, a apo(a), responsável pela antigenicidade específica da lipoproteína. A recente descoberta da estrutura da apo(a), apresentando grande homologia com o plasminogénio, permitiu estabelecer uma ligação entre os fenómenos de aterosclerose e trombose e relançou o interesse dos investigadores sobre esta lipoproteína. Um melhor conhecimento das interacções da Lp(a) com o sistema fibrinolítico deverá facilitar a nossa compreensão sobre a sua função fisiológica. Estudos metabólicos demonstraram claramente que esta lipoproteína não era o produto de outras lipoproteínas com apoB mas, sim, que ela é segregada no fígado na sua forma madura. Quanto às numerosas técnicas imunológicas hoje existentes para dosar a Lp(a), apresentam ainda alguns problemas sendo por isso requerida prudência na interpretação dos resultados.

### SUMMARY

#### Lipoprotein(a). Its importance as an additional marker for atherosclerosis

Lipoprotein(a) is one of the best examples of heterogeneity of lipoproteins. It presents pre- $\beta$  electrophoretic mobility in agarose gel, similar to Very Low Density Lipoproteins, it is found in High Density Lipoproteins due to its hydrated density greater than 1,063 and resembles Low Density Lipoproteins in its size and lipid composition. However, Lp(a) is unique in that it contains an additional distinct antigen, the apo(a), attached to apoB100 by one disulphide bridge. The apo(a)-glycoprotein has recently been shown to have a striking aminoacid sequence homology with plasminogen; Lp(a) seems to be a potential bridge between atherosclerosis and thrombosis fields and interest in Lp(a) has greatly increased since then. The new knowledge on the structure of Lp(a) being more and more rapidly acquired should facilitate our understanding of the mechanisms of its atherogenicity and its physiopathological role. Metabolic studies have made it clear that Lp(a) is not a product derived from other apoB-containing lipoproteins, but is secreted by the liver as a distinct mature lipoprotein. Concerning the immunological techniques available to assay Lp(a) they need to be standardized and it is still necessary to define what is meant by the pathological threshold for Lp(a), which will certainly depend on the choice of the standard antiserum and immunological method used.

### INTRODUÇÃO

A lipoproteína (a), Lp(a), descoberta em 1963 por Berg<sup>1</sup>, é uma lipoproteína plasmática que apresenta certas propriedades físico-químicas e químicas comuns às das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Assim, tem dimensões, densidade e composição química semelhan-

tes às das LDL, o que lhe confere uma identidade antigénica parcial com estas lipoproteínas. Apresenta, contudo, um arco de precipitação característico com um antisoro específico anti-lp(a). Ao contrário das outras lipoproteínas, cuja nomenclatura se baseia na densidade de flutuação, a Lp(a) foi assim designada por Berg para assinalar a presença de um antigénio num número limitado de

indivíduos. Sabe-se hoje que o maior componente proteico destas duas lipoproteínas é a apoB-100 e que a Lp(a) se distingue das LDL pela presença de uma glicoproteína específica, a apo(a), ligada à apoB por uma ponte de enxofre. A partir de 1974 surgem métodos imunológicos de doseamento, imunodifusão radial, electroimunoensaio e radioimunoensaio<sup>2-4</sup>. Estes métodos permitiram demonstrar a existência de Lp(a) em todos os soros humanos (mas em concentrações extremamente variáveis) enquanto Berg apenas a detectava em alguns soros. Definia-se assim a Lp(a) como um marcador quantitativo e não qualitativo. Mais tarde desenvolveram-se técnicas de electroforese em gel de gradiente de poliacrilamida e gel de agarose com catiões, que permitiam a detecção da Lp(a) sem recorrer à utilização de antisoro<sup>5-8</sup>.

Embora numerosos estudos evidenciem a existência de uma relação positiva entre concentrações plasmáticas de Lp(a) e doenças cardiovasculares e cerebrovasculares e estando estabelecido, em definitivo, que uma concentração plasmática elevada de Lp(a) constitui um factor de risco de aterosclerose, é mal conhecida a função desta lipoproteína e ainda não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais ela será aterogénica. A recente descoberta da estrutura da apo(a), apresentando grande homologia com o plasminogénio estabeleceu uma ligação entre os fenómenos de aterosclerose e trombose<sup>9,10</sup>. Um melhor conhecimento das interacções da Lp(a) com o sistema fibrinolítico deverá facilitar a nossa compreensão sobre a sua função fisiológica.

Estudos metabólicos demonstraram claramente que esta lipoproteína não era o produto de outras lipoproteínas com apoB mas, sim, que ela é segregada no fígado na sua forma madura.

Quanto às numerosas técnicas imunológicas hoje existentes para dosear a Lp(a), apresentam ainda alguns problemas sendo por isso requerida prudência na interpretação dos resultados.

### ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA LIPOPROTEÍNA(a)

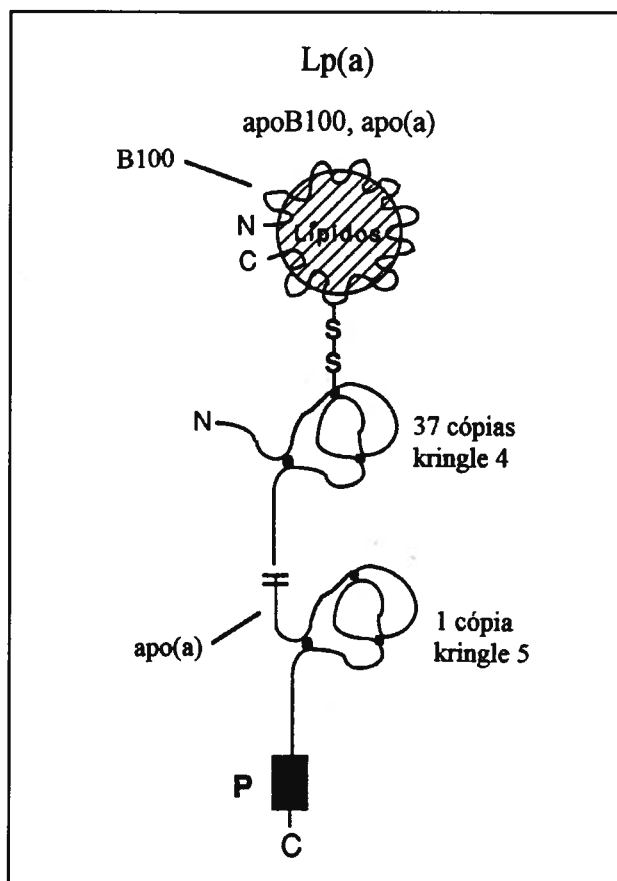
A Lp(a) representa um dos melhores exemplos de heterogeneidade físico-química das lipoproteínas. A sua mobilidade electroforética pré- $\beta$  em gel de agarose é próxima da das VLDL. Flutua à densidade característica das HDL<sub>2</sub> embora apresente uma composição lipídica e proteica semelhante à das LDL (*Quadro I*). A Lp(a) diferencia-se no entanto pela presença de uma glicoproteína particular, a apo(a), responsável pela antigenicidade específica da lipoproteína. Comparativamente às LDL, a Lp(a) é ainda muito mais rica em hexoses e ácidos siálicos.

As técnicas de biologia molecular permitiram muito recentemente definir com precisão a estrutura da apo(a) como uma estrutura em anéis designados por *kringles* (K) e com um grau importante de homologia com o plasminogénio<sup>9,10</sup>. Por comparação com este último, a apo(a) não possui K1, K2 e K3, mas contém 12 a 40 cópias da K4 ligadas entre si por curtas sequências muito ricas em glúcidos e uma cópia K5 seguida de um sítio activo pro-

*Quadro I* – Comparação das características físico-químicas e das composições da Lp(a) e da LDL

	Lp(a)	LDL
Mobilidade electroforética	pré- $\beta$	$\beta$
Densidade	1,05-1,12	1,02-1,063
Massa Molar(x106)	3,08	2,93
Composição em apolipoproteínas	B100, (a)	B100
Composição proteica (%)	27-30,9	22,4
Composição lipídica (%)		
Colesterol	7,9	8,5
Colesterol esterificado	37,1	40,7
Triglicéridos	19	21,3
Fosfolípidos	5	7,1

teásico (*Fig. 1*). Cada um destes domínios apresenta respectivamente 84 e 94% de identidade com as mesmas subunidades constituintes do plasminogénio. As *kringles* mantêm a sua estrutura pela conservação de seis resíduos cisteína criando três pontes de enxofre intramoleculares. Estes anéis estão igualmente presentes noutras proteínas da hemostase como o Activador Tecidual do Plasminogénio (t-PA), Uroquinase, Factor XII e Pró-trombina. A Lp(a) apresenta um importante polimorfismo de dimensão directamente relacionado com a heterogeneidade da apo(a), de origem genética. O seu peso molecular pode



*Fig. 1* – Representação esquemática da Lp(a).

variar entre 300 e 800 KD, correspondendo a um total de cerca de 30 formas isomórficas. Já foram identificadas 34 formas isomórficas<sup>11</sup>.

A apo(a) está ligada à apoB-100 por uma ponte enxofre pondo em jogo um resíduo cisteína existente na cópia 36 da K4 da apo(a), K4<sub>36</sub>, e um outro resíduo localizado na parte C-terminal da apoB no domínio que contém o local de fixação ao receptor B,E. Esta localização pode estar na origem da fraca afinidade da Lp(a) para o receptor B,E. O domínio proteásico da apo(a) contém a tríade catalítica His-Asp-Ser idêntica à do plasminogénio. No entanto a substituição no sítio activo do resíduo Arg-pelo Ser- torna a Lp(a) resistente aos activadores do plasminogénio, t-PA e uroquinase. A Fig.2 compara as estruturas do plasminogénio e da apo(a).

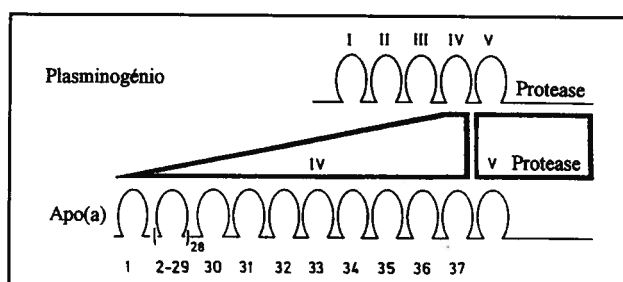


Fig. 2 - Comparação das estruturas do Plasminogénio e da Apo(a).

## METABOLISMO DA LIPOPROTEÍNA (a)

Ainda que haja diversas semelhanças entre LDL e Lp(a), esta não é o produto do catabolismo de outras lipoproteínas com apoB, como quilomírica, VLDL ou LDL, e circula no plasma como uma partícula intacta, sem se transformar noutra lipoproteína nem trocar apolipoproteínas<sup>12,13</sup>. É sintetizada independentemente das outras lipoproteínas no fígado (Fig.3). A ligação apo(a)-apoB100, assim como a associação dos lípidos, seriam intracelulares. Contudo, Bersot et al em 1984 demonstraram a existência de apo(a) em quilomírica pós-prandiais<sup>14</sup>. Desde então, vários estudos in vitro e in vivo sugerem uma associação Lp(a)/apo(a) com lipoproteínas ricas em triglicéridos<sup>15-18</sup>. Scanu designa esta associação por TG-Lp(a) e considera que poderá estar sujeita a uma regulação metabólica diferente da Lp(a) com característi-

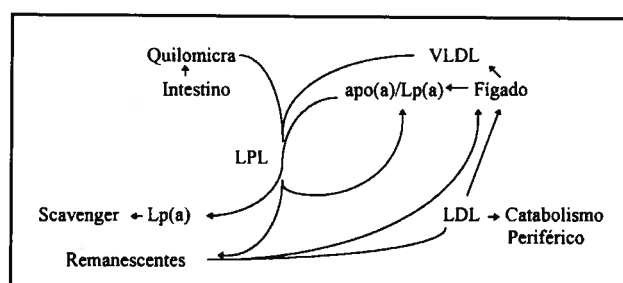


Fig. 3 - Representação esquemática do metabolismo das lipoproteínas com apoB. O metabolismo da Lp(a) é independente.

cas semelhantes às das LDL, as quais designa por CE-Lp(a)<sup>19</sup>.

Bersot et al especularam sobre a origem intestinal da apo(a)<sup>16</sup>. No entanto, Kraft et al demonstraram claramente, através de estudos realizados em doentes receptores dum transplante de fígado, que mais de 95% da apo(a) é sintetizada neste órgão<sup>20</sup>.

Sanholzer et al analisaram a distribuição da apo(a) em duas condições genéticas conhecidas por alterarem o catabolismo intravascular das lipoproteínas ricas em triglicéridos e suas remanescentes: deficiência em Lipoproteína Lipase (LPL) e hiperlipoproteinémia tipo III<sup>21</sup>. Concluíram que a distribuição da apo(a) continua a estar presente maioritariamente na densidade característica da Lp(a) (1,05-1,12) apesar do catabolismo das lipoproteínas com apoB ser grandemente afectado. Não observaram uma acumulação de apo(a) paralela à acumulação de colesterol nas lipoproteínas remanescentes. Estes resultados sugerem, em conformidade com Krempler et al<sup>12,13</sup>, que as etapas metabólicas essenciais na formação das LDL no plasma não operam para a Lp(a). E, em conjunto com os resultados de estudos anteriores realizados in vitro<sup>17,18</sup>, implicam que a presença de apo(a) em lipoproteínas ricas em triglicéridos não é devida a estas últimas lipoproteínas serem suas precursoras.

No entanto, a afinidade da Lp(a) para lipoproteínas ricas em triglicéridos está bem demonstrada e pode ter consequências patogénicas. A Lp(a) nestas lipoproteínas pode mediar a captação dos complexos TG-Lp(a) por vários tecidos e células, incluindo por macrófagos<sup>22</sup>.

O facto de até hoje não encontrarmos explicação para os níveis constantes da Lp(a) no plasma, mesmo depois de diferentes manipulações dietéticas, parece também indicar que o intestino não desempenha uma função na produção de Lp(a). Acrescente-se ainda que a apoB-48 produzida no intestino não é constituinte da Lp(a).

O catabolismo da Lp(a) não está completamente elucidado. Sendo a apoB o maior constituinte proteico da lipoproteína, pensou-se que a ligação aos receptores celulares seria semelhante à das LDL. Embora alguns estudos sejam contraditórios, o facto da concentração da Lp(a) na maior parte dos indivíduos ser muito inferior à das LDL e do catabolismo da Lp(a) estar apenas ligeiramente diminuído na hipercolesterolemia familiar homocigótica sugere que os receptores B/E não desempenham uma função importante no catabolismo da Lp(a)<sup>23</sup>. Um mecanismo possível pode envolver o transporte directo da Lp(a) para o endotélio dos vasos sanguíneos. Aqui, a acção patogénica da Lp(a) decorrerá de alterações estruturais em consequência da complexação da Lp(a) com as glicosaminoglicanas e proteoglicanas, ou de um processo de oxidação: a Lp(a) modificada seria captada e degradada pelos macrófagos da íntima arterial transformando-os em células espumosas precursoras da placa aterosclerótica<sup>19</sup>.

## HETEROGENEIDADE E ISOFORMAS DA APO(a)

A electroforese desnaturante em gradiente de poliacrilamida pôs em evidência 6 isoformas de apo(a), designa-

das segundo a sua mobilidade electroforética e comparada à da apoB<sup>24</sup>. Neste sistema a forma F tem uma mobilidade electroforética mais rápida que a apoB (F=faster) e menor massa molecular; a isoforma B tem mobilidade e massa molecular idênticas às da apoB; as isoformas S1, S2, S3 e S4 têm, por esta ordem, mobilidades electroforéticas cada vez mais lentas (S=slower) e maiores dimensões. Por aplicação da mesma técnica Gaubatz, et al detectaram 11 isoformas<sup>25</sup>. Boerwinckle et al, por electroforese de pulsação seguido de *blotting* genómico diferenciaram 19 isoformas<sup>26</sup>. Teoricamente podemos deduzir a existência de 20 a 30 formas isomórficas a partir das massa moleculares das maior e menor isoformas da apo(a) e ainda da massa molecular da K4. Com efeito já foram descritas 34 formas isomórficas<sup>11</sup>, sendo a nova nomenclatura baseada no número de unidades K4 presentes. Caracterizam-se dois tipos de perfil: um, pela presença de uma banda única; outro, pela presença de duas isoformas. Uma banda única pode resultar de várias situações: 1) um indivíduo pode ser realmente homocigótico, hipótese pouco provável dado o elevado índice de heterozigosidade do gene apo(a); 2) Pode ser heterocigótico para dois alelos codificando isoproteínas das mesmas dimensões; 3) Pode ainda ser heterocigótico com alelos codificando a isoforma detectada e a isoforma *nula*. Os fenótipos nulos resultam duma deficiência dos mecanismos de controlo de transcrição e pós-tradução e têm uma frequência <3%.

Geralmente a concentração plasmática da Lp(a) encontra-se inversamente relacionada com a massa molecular da apo(a) constituinte<sup>26-29</sup>. Rader et al, para esclarecerem o mecanismo pelo qual as isoformas afectam as concentrações de Lp(a), realizaram uma série de estudos cinéticos in vivo para comparar o metabolismo de lipoproteínas Lp(a) com diferentes isoproteínas apo(a)<sup>30</sup>. Concluíram que esta relação inversa se deve a diferenças no processo de síntese e não no processo de catabolismo, em consonância com os resultados anteriores de Krempler et al<sup>13</sup>. Contudo, há alguma variação dentro desta tendência inversa e estudos em dez famílias indicam que as concentrações de Lp(a) devem ser influenciadas por uma variedade de factores, hereditários e ambientais, independentes da dimensão do gene apo(a)<sup>31</sup>. Este seria responsável apenas por cerca de 60% da variabilidade dos níveis plasmáticos da Lp(a), tendo de ser tomados em conta os mecanismos de pós-tradução e pós-transcrição assim como o efeito de outros genes - caso do gene receptor B,E - e factores ambientais<sup>32</sup>. Entre os africanos aquela relação inversa entre concentração plasmática de Lp(a) e massa molecular da apo(a) constituinte não está bem estabelecida. Esta raça apresenta ainda elevados níveis de Lp(a) sem que estes se encontrem associados com doença coronária<sup>33,34</sup>. Sandholzer et al propuseram que o tipo de isoformas constituintes da Lp(a) seria mais importante do que os níveis de concentração plasmática da Lp(a) na determinação do risco de aterosclerose<sup>35</sup>. Com efeito os estudos recentes de Marcovina et al<sup>11</sup> apontam para a possibilidade de existirem duas subpopulações distintas de alelos apo(a). Estes autores encontraram uma distribuição bimodal das isoformas apo(a) com

uma frequência muito inferior da forma de baixa massa molecular na população de origem africana. A presença destes dois subgrupos pode variar entre grupos étnicos, explicando assim as diferenças observadas de distribuição de concentrações de Lp(a) e de patogenicidade da Lp(a).

## FUNÇÃO FISIOLÓGICA

Pouco se conhece sobre a função da Lp(a) no organismo ou, mais precisamente, sobre o significado de os valores normais de Lp(a) geralmente aceites serem <30g/l. Uma hipótese considera que a Lp(a), inibindo a fixação do plasminogénio à superfície das células endoteliais e dos monocitos, poderia controlar o processo de fibrinólise<sup>36,37</sup>: opôr-se-ia a uma produção excessiva de plasmina a nível do traumatismo do endotélio, diminuindo assim uma hidrólise excessiva do trombo. Uma segunda hipótese sugere que a Lp(a) poderá intervir como reguladora dos processos de inflamação e reparação de tecidos, fornecendo neste caso o colesterol indispensável às membranas das células em proliferação<sup>38</sup>.

## ASPECTOS PATOLÓGICOS E SIGNIFICADO CLÍNICO

### Lp(a) e aterogénese

Dahlen et al<sup>39</sup> foram os primeiros a sugerir que a Lp(a) representa um factor de risco das doenças coronárias. Com efeito, observaram que a existência de uma banda pré- $\beta$  suplementar em electroforese era mais frequente em indivíduos com angina de peito do que nos casos controlo. Numerosos estudos posteriores e recentes confirmaram esta observação demonstrando que a Lp(a) é um factor independente de risco de aterosclerose<sup>2,39-43</sup>. Em cada um destes estudos observou-se uma diferença significativa entre doentes e controlos estando os valores de Lp(a) >30g/l associados a um aumento do risco aterogénico. Os estudos prospectivos são raros<sup>44,45</sup> mas outros estudos correlacionam resultados angiográficos com níveis de Lp(a)<sup>46-48</sup>. Walton et al<sup>3</sup> revelaram, por imunofluorescência, a presença de Lp(a) em placas de ateroma e Cushing et al puderam quantificar esta acumulação<sup>49</sup>. Beisigel et al<sup>50</sup> e Smith e Cochran<sup>51</sup> observaram que os níveis plasmáticos de Lp(a) estavam correlacionados com a gravidade da lesão endotelial. Hoff et al caracterizaram parcialmente a Lp(a) extraída das placas de ateroma e concluíram que a Lp(a) se encontrava presente em diferentes formas: modificada quimicamente como o seria por um processo oxidativo, complexada com outros componentes dos tecidos formando agregados e ainda em partículas mais pequenas que podem representar formas degradadas de Lp(a)<sup>52</sup>. Também foi descrita uma relação entre concentrações de Lp(a) e infarto cerebral<sup>53</sup> e aterosclerose cérvical<sup>54</sup> e, de um modo mais geral, com patologia cerebrovascular<sup>55,56</sup>. Uma vez que os níveis da Lp(a) são independentes da idade, a determinação da Lp(a) em adolescentes e jovens com história familiar de doença cardíaca - ou cerebrovascular será muito útil no alerta e na tomada de medidas preventivas. Quer uma dieta baixa em

gorduras quer os medicamentos capazes de reduzirem os níveis de LDL não têm o mesmo efeito sobre a Lp(a) e não existem directrizes para baixar de modo significativo os níveis da Lp(a). Há no entanto alguns estudos que indicam, embora não de um modo consistente, que uma dieta rica em ácidos gordos  $\omega$ -3, por um lado, e niacina e genfibrozil por outro, podem afectar a produção e secreção de TG-Lp(a) e portanto serão benéficos nos indivíduos que produzem este tipo de partículas.

Um melhor conhecimento sobre a fisiopatologia da Lp(a) contribuirá para o aparecimento de novos medicamentos e medidas terapêuticas. Resultados recentes tendem a precisar os mecanismos pelos quais a Lp(a) se torna aterogénica.

### Interação com glicoaminoglicanas e proteoglicanas

A Lp(a) interage com as glicoaminoglicanas (GAGs) num grau mais elevado do que as LDL, e também com as proteoglicanas (PGs)<sup>57</sup>. Estão implicadas ligações por pontes de hidrogénio e electrostáticas. Estas interações constituem uma etapa importante na evolução do processo de formação da placa de ateroma (Fig. 4).

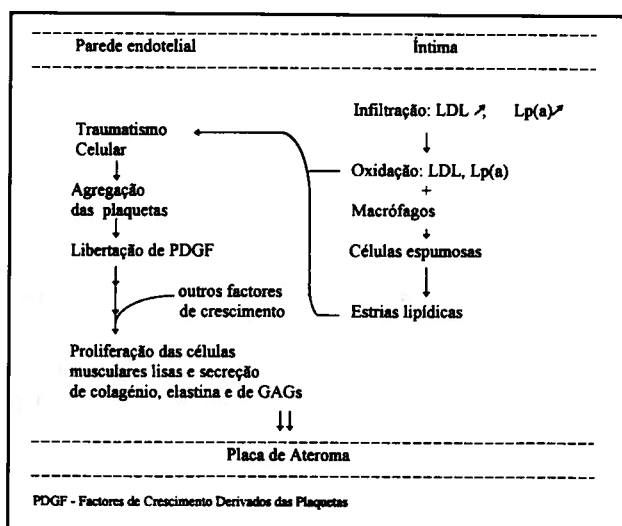


Fig. 4 – Esquema simplificado do modelo de evolução do processo de aterosclerose segundo Steinberg (58).

### Interação com os receptores dos macrófagos

Demonstrou-se que os macrófagos desempenham uma função importante na génese da placa de ateroma por acumulação de colesterol proveniente das LDL modificadas<sup>59</sup>. Possuem, com efeito, receptores para as  $\beta$ -VLDL e LDL acetiladas. Krempler et al mostraram que a modificação da Lp(a) implicava também uma acumulação de ésteres de colesterol<sup>60</sup>. Esta modificação da Lp(a) pode ser devida a uma menor afinidade da Lp(a) para o receptor B/E, o que origina uma permanência mais longa daquela lipoproteína no plasma; uma infiltração na íntima aumentaria o risco de oxidação e de interacção com as GAGs e PGs das paredes arteriais com consequente captação pelas células musculares lisas e macrófagos. Estes, in vivo, por acumulação de colesterol, transformam-se-iam em células espumosas. Este

processo poderá ser o mecanismo principal pelo qual a Lp(a) exerce a sua aterogenicidade, acelerando a formação da placa de ateroma nos indivíduos com uma concentração plasmática elevada de Lp(a).

### Interação com o local de fixação do plasminogénio

Como os monocitos/macrófagos, as células endoteliais desempenham uma função importante quando das primeiras etapas do processo de aterogénese. Estas células possuem à superfície locais de fixação específica do plasminogénio e segregam igualmente t-PA que se fixa à superfície membranar. Estes ligandos permitem a iniciação da trombólise acelerando a activação do plasminogénio e protegendo a plasmina do seu inibidor. Como já referimos, segundo os trabalhos realizados nos laboratórios de Scanu<sup>36</sup> e Breslow<sup>37</sup> a Lp(a) poderia igualmente vir fixar-se ao local de fixação do plasminogénio. De facto, in vivo Lp(a) e plasminogénio interagem com uma afinidade comparável aos sítios de fixação do plasminogénio. Uma concentração plasmática de Lp(a) entre 0,25-0,40 g/l (limite inferior de risco de aterosclerose) implicaria a ocupação de 16 a 24% dos sítios do plasminogénio pela Lp(a) diminuindo assim a fixação do plasminogénio. Uma concentração fisiológica elevada em Lp(a) poderia opôr-se ao mecanismo de controlo da fibrinólise, conduzindo provavelmente a uma tendência protrombótica local. A presença de Lp(a) nas placas de ateroma dá suporte a este conjunto de hipóteses. A Lp(a) será assim o primeiro elo de ligação entre lipoproteínas e factores de coagulação.

Neste estudo não abordaremos outras patologias em que têm sido descritas variações de Lp(a), como por ex. a diabetes, insuficiência renal, certos estados inflamatórios e patologia hepática.

## DETECÇÃO E DOSEAMENTO DA LIPOPROTEÍNA(a)

### Detecção da Lp(a)

A Lp(a) pode ser detectada por diferentes métodos:

- Electroforese em gel de poliacrilamida em gradiente descontínuo de pH e concentração, que permite uma boa individualização da lipoproteína a partir de uma concentração de 25mg/dl.

- Imunodifusão de Ouchterlony e contra-immunoelectroforese<sup>61</sup>.

- Electroforese em gel de agarose, que individualiza bem a banda correspondente à Lp(a) desde que se lhe adicionem catiões, que retardam a migração das outras bandas<sup>8</sup>, ou adicionando 3% de sacarose<sup>7</sup>.

Convém referir a electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, SDS – PAGE, seguida de *immunoblotting* com métodos muito sensíveis de revelação, utilizada para a análise dos fenótipos de apo(a); este método ainda não é acessível a laboratórios de rotina.

### Doseamento da Lp(a)

Numerosos métodos imunológicos, com limites de detecção relativamente baixos, foram descritos e aplicados para o doseamento da Lp(a). A Lp(a) pode assim ser

quantificada por imunodifusão radial<sup>2</sup>, electroimmunodifusão<sup>3</sup>, imunoneofelectrofução de zona<sup>62</sup>, imunoneofelectrometria<sup>63</sup>, radioimunologia<sup>4</sup> e imunodoseamento latex<sup>64</sup>. A electroimmunodifusão é uma técnica sensível, precisa e específica. A imunoneofelectrometria apresenta boas correlações com os outros métodos; a utilização de polietilenglicol favorece a formação do complexo antígeno-anticorpo mas tem como principal inconveniente a impossibilidade de aplicação a amostras turvas. O radioimunoensaio é uma técnica muito sensível mas que requer radioisótopos, o que a leva a ser utilizada sobretudo em laboratórios de investigação. Mais recentemente foram descritos métodos imunoenzimáticos (ELISA) utilizando anticorpos policlonais ou monoclonais. VuDac et al propuseram uma metodologia que doseia as partículas Lp(a):B por um sistema de dois anticorpos: anti-apo(a) para a imobilização e anti-apoB conjugado com peroxidase para a revelação<sup>65</sup>. Como para todo o doseamento imunológico as origens de variabilidade entre as diferentes técnicas são numerosas. Intervêm o sistema de calibração, os imunoreagentes, o protocolo operativo e a natureza das amostras a analisar. De salientar que os anticorpos anti-Lp(a) devem reconhecer igualmente as diferentes isoformas de apo(a) e que o comportamento imunológico do padrão deve ser idêntico ao das amostras.

De referir que num estudo preliminar comparativo entre populações de 5 países europeus, Portugal apresenta a maior percentagem de casos com valores acima de 30mg/dl<sup>6</sup>. Os resultados deste trabalho revelam o interesse do estudo da população portuguesa, sugerindo a possibilidade de também a nível europeu haver uma diferença dos níveis plasmáticos de Lp(a).

## CONCLUSÃO

Durante os últimos 10 anos foram realizados importantes progressos no estudo da lipoproteína(a), culminando na elucidação da sua estrutura. Está hoje bem estabelecido por numerosos estudos clínicos que uma concentração plasmática elevada de Lp(a) constitui um factor de risco suplementar para a evolução do processo de aterosclerose implicando riscos de acidentes cardio- e cerebrovasculares. A Lp(a) poderá exercer a sua aterogenicidade a diferentes níveis do processo, como se concluiu dos estudos conduzidos *in vitro*. A fraca capacidade de degradação, pela via dos receptores B/E, pode constituir uma primeira possibilidade, porque uma permanência prolongada na circulação aumenta o risco de oxidação da apoB da Lp(a), e portanto a sua captura pelos receptores das LDL modificadas presentes na superfície dos macrófagos, formando assim células espumosas. Uma segunda possibilidade está ligada à interacção elevada da Lp(a) com as glicosaminoglicanas e as proteoglicanas. Com efeito, uma complexação com as GAGs e PGs das paredes arteriais permite a sua acumulação e o aumento da sua captação pelos macrófagos. Uma última possibilidade é a consequência directa da homologia estrutural da apo(a) com o plasminogénio: por um mimetismo molecular a Lp(a) é capaz de se ligar aos locais de fixação do plasminogénio que estão presentes na superfície das células endoteliais e de mono-

citos/macrófagos, com uma afinidade idêntica; em concentrações elevadas pode impedir a fibrinólise do trombus formado e estaria assim implicada no processo de aterogénese. A presença de Lp(a) nas placas de ateroma apoia o conjunto destas hipóteses. Um meio promissor para esclarecer a função da apo(a) no processo de aterogénese é através do estudo de animais transgénicos<sup>67</sup>.

## BIBLIOGRAFIA

1. BERG K: A new serum type system in man: the Lp system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1963; 59: 369-382
2. ALBERS J J: Immunochemical quantification of human plasma Lp(a) lipoprotein. *Lipids* 1974; 9:15-26
3. WALTON K W, HITHENS J, MAGNANI H N, KHAN M: A study of methods of identification and estimation of Lp(a) lipoprotein and its significance in health, hyperlipidaemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1974; 20: 323-346
4. ALBERS J J, ADOLPHSON J L, HAZZARD W R: Radioimmunoassay of human Lp(a) lipoprotein. *J Lip Res* 1977; 18: 331-338
5. SEZILLE G, FRUCHART J C, JAILLARD J, DEWAILLY P, DESREUMEAUX C: Improved serum lipoprotein electrophoresis procedure in polyacrylamide gradient gel. *Biochimie* 1975; 23: 315-317
6. Mc NAMARA J R, CAMPOS H, ADOLPHSON J L et al: Screening for lipoprotein elevations in plasma and assessment of size heterogeneity using gradient gel electrophoresis. *J Lip Res* 1980; 30: 747-755
7. KAWAKAMI K, TSUKADA A, OKUBO M et al: A rapid electrophoretic method for the detection of serum Lp(a) lipoprotein. *Clin Chim Acta* 1989; 185: 147-155
8. CAMPOS E, FIÉVET P, CACÈS E, FRUCHART J C, FIÉVET C: A screening method for abnormally high lipoprotein(a) concentrations by agarose lipoprotein electrophoresis. *Clin Chim Acta* 1994; 230: 43-50
9. EATON DL, FLESS GM, KOHR WJ et al: Partial amino acid sequence of apo (a) shows that it is homologous to plasminogen. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1987; 84: 3224-3228
10. Mc LEAN J W, TOMLINSON J E, KUANG W J et al: cDNA sequence of human apo (a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987; 330: 132-137
11. MARCOVINA S M, ZHANG Z H, GAUAR V P, ALBERS JJ: Identification of 34 apo(a) isoforms: differential expression of apo(a) alleles between American blacks and whites. *Biochim Biophys Res Commun* 1993; 191:1192-1196
12. KREMPLER F, KOSTNER G M, BOLZANO K, SANDHOFER F: Lipoprotein(a) is not a metabolic product of other lipoproteins containing apoB. *Biochim. Biophys. Acta* 1979; 575: 63-70.
13. KREMPLER F, KOSTNER GM, BOLZANO K, SANDHOFER F: Turnover of lipoprotein(a) in man. *J Clin Invest* 1980; 65:1483-1490
14. BERSOT T P, INNERARITY T L, MAHLEY R W: Apo Lp(a) enriched chylomicrons induced by fat feeding bind to the macrophage  $\beta$ -VLDL receptor. *Circulation* 1984; 68: II-41 (Abstr.)
15. Mc CONATHY W J, KLOER H U, WANG C S, CAMPOS E: Incidence of Lp(a+) in hypertriglyceridemic subjects. *Clin Res* 1985; 33: 210A (Abst.)
16. BERSOT T P, INNERARITY R W, PITAS R E, RALL S C, WEISGRABER LJ, MAHLEY R W: Fat feeding in humans induces lipoproteins of density less than 1,006 that are enriched in apo(a) and that cause lipid accumulation in macrophages. *J Clin Invest* 1986; 77: 622-630
17. TRIEU V N, Mc CONATHY W J: Lipoprotein(a) binding to other apoB-containing lipoproteins. *Biochemistry*, 1990, 29: 5919-5924
18. TRIEU V N, ZIONCHECK T F, LAWN R M, Mc CONATHY WJ: Interaction of apo(a) with apoB-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 1991; 266: 5480-5485
19. SCANU A M LP(a): A link between thrombosis and atherosclerosis. *Eur J Epidemiol suppl* 1, 1992; 8: 76-78
20. KRAFT H G, MENZEL H J, HOPPEL F, VOGEL W, UTERMANN G: Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apoprotein synthesis. *J Clin Invest*, 1989; 83: 137-142
21. SANDHOLZER C, FEUSSNER G, BRUNZELL J, UTERMANN G: Distribution of apo(a) in the plasma from patients with lipoprotein lipase deficiency and with type III hyperlipoproteinemia. No evidence for a TG-rich precursor of Lp(a). *J Clin Invest*, 1992; 90: 1958-1985
22. ZIONCHECK T F, POWELL L M, RICE GC, EATON D LLAWN R M: Interaction of recombinant apo(a) and lipoprotein(a) with macrophages. *J Clin Invest* 1991; 87: 767-771



23. KREMPLER F, KOSTNER G M, ROSCHER A, HASLAUER F, BOLZANO K, SANDHOFER F: Studies on the role of specific cell surface receptors in the removal of lipoprotein(a) in man. *J Clin Invest*, 1983; 71: 1431-1441
24. UTERMANN G, MENZEL H J, KRAFT H G, DUBA H C, KEMMLER H G, SEITZ C: Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest*, 1987; 80: 458-465
25. GAUBATZ J W, GHANEM K I, GUEVARA J, NAVA M L, PATSCH W, MORRISSETT J D: Polymorphic forms of human apo(a): inheritance and relationship of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein(a). *J Lip Res*, 1990; 31: 603-613
26. BOERWINKLE E, LEFFERT C C, LIN J, LACKNER C, CHIESA G, HOBBS H H: Apo(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J. Clin. Invest.*, 1992, 90: 52-60
27. UTERMANN G, KRAFT H G, MENZEL H J, HOPPERWEISER 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* 1988; 78: 41-46
28. GAVISH D, ARZOLAN N, BRESLOW J L: Plasma Lp(a) concentration is inversely correlated with the ratio of kringle 4/5 encoding domains in the apo(a) gene. *J Clin Invest* 1989; 84: 2021-2027
29. KRAFT H G, SANHOLZER C, MENZEL H J, UTERMANN G: Apo(a) alleles determine lipoprotein(a) particle density and concentration in plasma. *Arteriocler. Thrombosis* 1992; 12: 302-306
30. RADER D.J., CAIN W., IKEWAKI K et al. The inverse association of plasma Lp(a) concentrations with apo(a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate. *J Clin Invest* 1994; 93: 2758-2763
31. PEROMBELON Y N, SOUTAR A K, KNIGHT B R: Variation in Lipoprotein(a) concentration associated with different apo(a) alleles. *J. Clin Invest*, 1994; 93: 1481-1492
32. UTERMANN G, HPPICHLER F, DIEPLINGER H, SEED M, THOMPSON G, BOERWINKLE E: Defects in the LDL receptor gene affect Lp(a) lipoprotein levels: multiplicative interaction of two gene loci associated with premature atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 4171-4174
33. GUYTON JR, DAHLEN G H, PATSCH W, KAUTZ J, GOTTO A M: Relationship of plasma Lp(a) levels to race and apoB. *Atherosclerosis* 1985; 167: 265-272
34. PARRA H J, LUYÉYÉ I, BOURAMOUCÉ C, DEMARQUILLY C, FRUCHART J C: Black-white differences in serum Lp(a) lipoprotein levels. *Clin Chim Acta*, 1987; 167: 27-31.
35. SANDHOLZER C, BOERWINKLE E, SAHA N, TONG M C, UTERMANN G: Apo(a) phenotypes, Lp(a) concentration and plasma lipid levels in relation to coronary heart disease in a Chinese population: Evidence for the role of the apo(a) gene in coronary heart disease. *J. Clin Invest* 1992; 89: 1040-1046
36. MILES L A, FLESS G, LEVIN EG, SCANU A M, PLOW E F: A potential basis for the thrombotic risks associated with Lp(a). *Nature*, 1989, 339: 301-303
37. HAJJAR K A, GAVISH D, BRESLOW J, NACHMAN R. Lp(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature* 1989, 339:303-305
38. BROWN M S, GOLDSTEIN J.L. Teaching old dogmas new tricks. *Nature*, 1987, 330: 113-114.
39. DAHLÉN G, ERICSSON C, FURBERG C, LUNKVIST L, SVARSUDD K: Studies on an extra pre-beta lipoprotein fraction. *Acta Med Scand*, 1972; suppl 531:1-28
40. BERG K, DAHLÉN G, FRICK M H. Lp(a) lipoprotein and pre-β lipoproteins in patients with coronary heart disease. *Clin Genet*, 1974, 6: 230-235
41. KOSTNER G M. Lp(a) and the risk for myocardial infarction *Atherosclerosis*, 1981, 38:51-61
42. RHOADS G G, DAHLÉN G, BERG K, MORTON N, DANNENBERG A L. Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *JAMA* 1986, 256: 2540-2544
43. MOLITERNO D J, LANGE R A, MEIDELL R S et al. Relation of plasma Lp(a) to infarct artery patency in survivors of myocardial infarction. *Circulation*, 1993, 88:935-940
44. SCHRIEVER H, ASSMANN G, SANDKAMP M. The relationship of Lp(a) to risk factors of coronary heart disease: initial results of the prospective epidemiological study on company employees in west-falia. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1984, 22: 591-596
45. ROSENGREN A, WILHELMSSEN E, ERKSSON E, RISBERG B, WEDEL H. Lp(a) and coronary heart disease: a prospective case-control study in a general population sample of middle age men. *Br Med. J.*, 1990, 301: 1248-1251
46. ARMSTRONG V W, CREMER P, EBERLE E et al. The association between serum Lp(a) concentrations and angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1986, 62: 249-257.
47. DAHLÉN G, GUYTON J R, ATTAR M, FARMER J A, KAUTZ J.A, GOTTO Jr A M. Association of levels of Lp(a) and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation*, 1986, 74: 758-765
48. HEARN J A, DeMAIO Jr S J, ROUBIN G S, HAMMARSTROM M, SGOUTAS D. Predictive value of Lp(a) and other serum lipoproteins in the angiographic diagnosis of coronary artery disease. *Am. J. Cardiol*, 1990, 15: 1176-1180.
49. CUSHING G.L, GAUBATZ J.W, NAVA M.L. et al. Quantification and localization of apo(a) and apoB in coronary artery bypass vein grafts resected at reoperation. *Arteriosclerosis*, 1989, 9: 593-603.
50. BEISIGEL U, NIENDORF A, WOLF K, REBLIN T, RATH M. Lipoprotein(a) in the arterial wall. *Eur. Heart J*, 1990, 11( suppl E): 174-183.
51. SMITH E.B, COCHRAN S. Factors influencing the accumulation in fibrous plaques of lipid derived from LDL. II: preferential immobilization of Lp(a). *Atherosclerosis*, 1990, 84: 173-181.
52. HOFF H.F, O'NEIL J, YASHIRO A. Partial characterization of lipoproteins containing apo(a) in human atherosclerotic lesions. *J. Lip. Res*, 1993, 34:789-798.
53. MURAI A, MIYAHARA T, FUJIMOTO N, MATSUDA M, KAMIYAMA M. Lp(a) lipoprotein as a risk factor for coronary disease and cerebral infarction. *Atherosclerosis*, 1986, 59: 199-204.
54. KÖLTRINGER P, JÜRGENS G. A dominate role of Lp(a) in the investigation and evolution of parameters indicating the development of cervical atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1985, 58: 187-198.
55. ZENKER G, KOLTRINGER P, BONÉ G, NIEDERKORN K, PFEIFFER K, JURGENS G. Lp(a) as a strong indicator for cerebrovascular disease. *Stroke*, 1986, 17: 942-945.
56. SHINTAI S, KIKUCHI S, HAMAGUCHI H, SHIIGAI T. High serum Lp(a) levels are an independent risk factor for cerebral infarction. *Stroke*, 1993, 24: 965-969.
57. BILLARI-VARGA M, GRUBER E, ROTHENEDER M, ZECHNER R, KOSTNER G.M. Interaction of Lp(a) and LDL with glycaminglycans from human aorta. *Arteriosclerosis*, 1988, 8: 851-857.
58. STEINBERG D, Metabolism of lipoproteins and their role in the pathogenesis of atherosclerosis. In: Stokes J, Mancini M, *Atherosclerosis reviews* (Raven Press) 1988.
59. GOLDSTEIN J L, HO Y K, BASU S K, BROWN M S: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated LDL production massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76: 333-337
60. KREMPLER F, KOSTNER G, ROSCHER A, BOLZANO K, SANDHOFER F. The interaction of human apoB containing lipoproteins with mouse peritoneal macrophages: a comparison of Lp(a) with LDL. *J. Lip. Res.*, 1984, 25: 283-287.
61. MOLINARI E, PICHLER P, KREMPLER F, KOSTNER G. A rapid screening method for pathological Lp(a) concentrations by counterimmunoelectrophoresis. *Clin. Chim Acta*, 1983, 128: 373-378.
62. MARZ W, GROSS W. Quantification of human serum Lp(a): zone immunoelectrophoresis assay, a new sensitive method as compared to electroimmunoassay. *Clin. Chim. Acta*, 1983, 134: 265-279.
63. CAZZOLATO G, PRKASH G, GREEN S, KOSTNER G.M. The Determination of lipoprotein Lp(a) by rate endpoint nephelometry. *Clin. Chim. Acta*, 1983, 135: 203-208.
64. VU DAC N, CHEKKOR A, PARRA H, DUTHILLEUL P, FRUCHART J.C. Latex immunoassay of human serum Lp(a+) lipoprotein. *J. Lip. Res*, 1985, 26: 267-269.
65. VU DAC N, A selective bi-site immunoenzymatic procedure for human Lp(a) quantification using monoclonal antibodies against apo(a) and apoB. *J. Lip. Res*, 1989, 30:1437-1443.
66. CIGOLINI M, SEIDEL J.C, ZENTI M.G. et al. Serum Lp(a) levels in randomized health men from different european countries. *Eur.J. Epidemiol*, 1993, 9:3, 497-503.
67. LINTON M.F, FARESE Jr.R.V, CHIESA G. et al. Transgenic mice expressing high plasma concentrations of human apoB100 and Lp(a). *J. Clin. Invest*, 1993, 92: 3029-3037.