



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

FACULTAT DE CIENCIES BIOLÒGIQUES
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

Programa doctorado 030 Bioquímica Clínico-Médica i
Inmunología

POLIMORFISMOS IMPLICADOS EN LA
HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

Antonio López Ruiz

DIRIGIDA POR:

Prof. Dr. Antonio Hernández-Mijares

Dra. María Luisa Martínez-Triguero

Dra. Marta Casado Pinna

D. ANTONIO HERNÁNDEZ MIJARES catedrático del Departamento de Medicina de la Universitat de València, la **Doctora MARÍA LUISA MARTÍNEZ TRIGUERO** Facultativo Especialista del Hospital Universitario de La Fe y la **Doctora MARTA CASADO PINNA** Científica Titular del Instituto de Biomedicina de Valencia, Centro Superior de Investigaciones Científicas

INFORMAN QUE:

D. Antonio López Ruiz licenciado en Biología ha realizado, bajo su dirección y en los laboratorios del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Doctor Peset, el trabajo que lleva por título **“POLIMORFISMOS IMPLICADOS EN LA HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA”** y autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe, en Valencia, Octubre de 2015.

Fdo:

Antonio Hernández Mijares

Fdo:

María Luisa Martínez Triguero

Fdo:

Marta Casado Pinna

TESIS DOCTORAL
POLIMORFISMOS IMPLICADOS EN LA
HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

FACULTAT DE CIENCIES BIOLOGIQUES
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

Programa doctorado 030 Bioquímica Clínico-Médica i
Inmunología

VALENCIA 2015

AUTOR

Antonio López Ruiz

LICENCIADO EN BIOLOGIA

DIRECTORES DE TESIS

Prof. Dr. Antonio Hernández Mijares

Dra. M. Luisa Martínez Triguero

Dra. Marta Casado Pinna

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como es el desarrollo de una tesis doctoral. Es para mí un placer utilizar este espacio, para expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a feliz término.

Debo agradecer de manera especial y sincera a mi director el Profesor Antonio Hernández Mijares por ofrecerme realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, Agradezco su apoyo y confianza en mi trabajo así como su capacidad para conducir este proyecto con sus ideas y sus grandes conocimientos.

Quiero expresar también mi agradecimiento a la Dra. María Luisa Martínez Triguero codirectora y fundamentalmente gran amiga, por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia así como su apoyo en todo momento. Gracias Marisa.

También, a la Dra. Marta Casado Pinna, por sus enseñanzas en genética molecular y cuya participación ha enriquecido sin duda este trabajo, pasando de ser codirectora a amiga.

Agradecer a Celia, su inestimable ayuda en el tratamiento de las muestras y a Irene por su ayuda en lo referente a genética.

A mis compañeros, que a lo largo de estos años me han apoyado y aguantado con los que hemos pasado buenos y malos momentos. En esta recta final un recuerdo especial a María Díaz por su ayuda.

A la familia Pérez Díaz, que se convirtió en mi familia y que sin ellos y su apoyo no habría conseguido llegar aquí. Especialmente a ti Marcos, amigo que siempre has sabido darme ánimos y estar a mi lado en todo momento.

A María José, Miguel, Yolanda y Cristina que son una parte importante de mi vida y que siempre han confiado en mí.

A mi amigo, desde hace ya muchos años, Alfonso, con quien he vivido multitud de cosas, buenas y malas, que han forjado nuestra amistad.

A mi familia, mis hermanos, cuñadas y sobrinos, y muy especialmente a mis padres José y Adriana que siempre lucharon y se sacrificaron por nosotros, seguro que mi padre que ya no está con nosotros estaría contento de ver finalizado este proyecto. Y a mi madre que sabe entenderme como nadie y decir siempre las palabras justas y por su apoyo incondicional.

INDICE	1
ABREVIATURAS	4
1 INTRODUCCIÓN	6
1. A Metabolismo lipídico	7
1. B Enfermedad cardiovascular. Arteriosclerosis	14
1. C Hiperlipemias	18
1. C. 1 Dislipemias	18
1. C. 2 Clasificación de hiperlipemias	19
1. C. 2. 1 Primarias	22
1. C. 2. 2 Secundarias	24
1. D Hiperlipemia-familiar-combinada	30
1. D. 1 Introducción	30
1. D. 2 Fisiopatología	31
1. D. 3 Diagnóstico	37
1. D. 4 Genética	40
1. D. 4. 1 LPL	45
1. D. 4. 2 LH	49
1. D. 4. 3 Apo E	50

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	54
2. A Hipótesis	55
2. B Objetivos	56
3 PACIENTES Y MÉTODOS	57
3. A Pacientes	58
3. B Diseño del estudio	60
3. C Métodos	60
3. C. 1 Medidas antropométricas	60
3. C. 2 Estudio bioquímico	60
3. C. 3 Determinación patrón B de las LD	66
3. C. 4 Determinación subfracciones cHDL	67
3. C. 5 Obtención de ADN genómico	68
3. C. 6 Amplificación ADN	71
3. C. 7 Análisis polimorfismos LPL y LH	71
3. C. 8 Determinación Genotipo Apo E	76
3. C. 9 Análisis Estadístico	77
4 RESULTADOS	80
4. A Parámetros generales	81
4. B Parámetros lipídicos	82
4. C Fenotipos lipídicos HFC	85
4. D Análisis de los polimorfismos	86

4. D. 1 Polimorfismos	86
4. D. 2 Equilibrio Hardy-Weinberg	94
4. E Genotipo Apo E	98
4. F Relación de los parámetros lipídicos y el análisis genético	100
5 DISCUSIÓN	103
6 CONCLUSIONES	116
7 BIBLIOGRAFÍA	118
8 ANEXO	143

ABREVIATURAS

AD	Autosómica dominante
AGL	Ácidos grasos libres
APO	Apolipoproteínas
Arg	Arginina
Asn	Asparragina
ASP	Proteína estimulante de acilación
Asp	Aspártico
AR	Autosómica recesiva
CE	Colesterol esterificado
CT	Colesterol total
Cys	Cisteína
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
ECV	Enfermedad Cardiovascular
EDTA	Etilendiaminotetraacético
FABP	Proteína de unión ácidos grasos
Glu	Glutámico
Gly	Glicina
HLP	Hiperlipemia
HT	Mutados
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HW	Hardy-Weinberg
IAP	Índice Aterogénico del Plasma
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia

IMC	Indice de masa corporal
IR	Insulin Resistencia
LCAT	Lecitin colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LH	Lipasa hepática
LHS	Lipasa hormona sensible
LPL	Lipoproteinlipasa
LRP	Receptor de los remanentes
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PPA	Gel de poliacrilamida
PPAR	Receptor de actividad proliferación de peroxisomas
PM	Peso molecular
QM	Quilomicrones
RFLP	Polimorfismo de restricción
SDS	Dodecil sulfato sódico
Ser	Serina
TG	Triglicéridos
USF-1	Factor de transcripción
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
WT	Silvestre

INTRODUCCION

1 INTRODUCCION

1. A Metabolismo lipídico

Las partículas de lipoproteína son complejos macromoleculares heterogéneos de moléculas solubles en solventes orgánicos no polares, e insolubles en solventes polares como el agua. Los lípidos más importantes son: el colesterol, triglicéridos, ácidos grasos y fosfolípidos. Entre sus funciones principales destacan el almacenamiento de energía (triglicéridos y ácidos grasos), constitución de membranas celulares (colesterol y fosfolípidos), participación en la digestión (constitución de sales biliares), y en el metabolismo formando parte de hormonas, vitaminas y cofactores (colesterol). El esteroide principal tanto en seres humanos como en animales es el colesterol. Tanto el CT como los TG son lípidos con muy baja solubilidad por lo que para circular por el plasma lo tienen que hacer unidos a apoproteínas, dando lugar a lo que denominamos lipoproteínas.

Las lipoproteínas presentan una forma esférica que tiene un centro no polar compuesto por triglicéridos y CE y que está rodeada por una capa superficial única de moléculas de fosfolípido y colesterol no esterificado. Las apolipoproteínas pueden hallarse en la superficie de la partícula o tener una parte en la superficie y otra parte sumergida dentro de la partícula. Las proteínas que se hallan exclusivamente en la superficie pueden transferirse entre las lipoproteínas durante el metabolismo de estas partículas¹ (Figura 1).

Se han identificado cuatro grupos principales de lipoproteínas basados en su densidad: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad, lipoproteína de baja densidad y lipoproteínas de alta densidad.

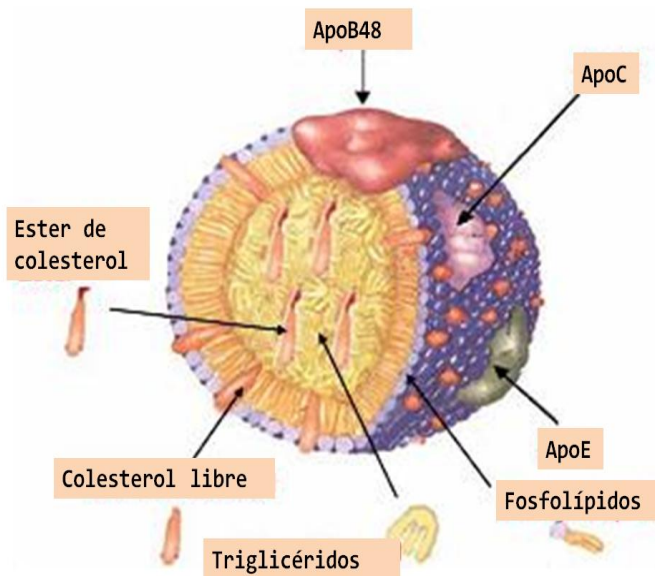


Figura 1. Estructura de las lipoproteínas.

El metabolismo lipídico se compone de una vía exógena, por la cual se absorben, metabolizan y almacenan las grasas ingeridas a través de la dieta, cuya principal lipoproteína son los quilomicrones (QM), y una vía endógena por la cual se sintetizan y metabolizan lipoproteínas, sobre todo de origen hepático o derivadas de otras lipoproteínas. El hígado sintetiza lipoproteínas

de muy baja densidad (VLDL), que luego se transformarán en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), y éstas a su vez en lipoproteínas de baja densidad (LDL). Mediante el transporte reverso del colesterol, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son capaces de captar el colesterol de los tejidos periféricos y devolverlo al hígado, proceso crucial para evitar la arteriosclerosis.

- **Vía exógena**, por la cual se absorben, metabolizan y almacenan las grasas ingeridas a través de la dieta, cuya principal lipoproteína son los quilomicrones. Estos QM son las lipoproteínas encargadas del transporte de los lípidos que provienen de la dieta (Figura 2). Se sintetizan en el intestino como QM nacientes, y pasan al sistema circulatorio donde van incorporando Apoproteínas (Apo E y C) y perdiendo otras (Apo A-I y Apo A-IV) que van intercambiando con las lipoproteínas de alta densidad, convirtiéndose en QM maduro. Además, la lipoproteinlipasa (LPL) va extrayendo sus triglicéridos y Apos C y A y los transforma en QM residual o remanentes, lipoproteína con pocos triglicéridos y cargada de colesterol esterificado y Apo E para unirse a su receptor específico y así ser degradado. Los QM no deben encontrarse en el suero de sujetos sanos, sólo deben aparecer en situación postprandial.

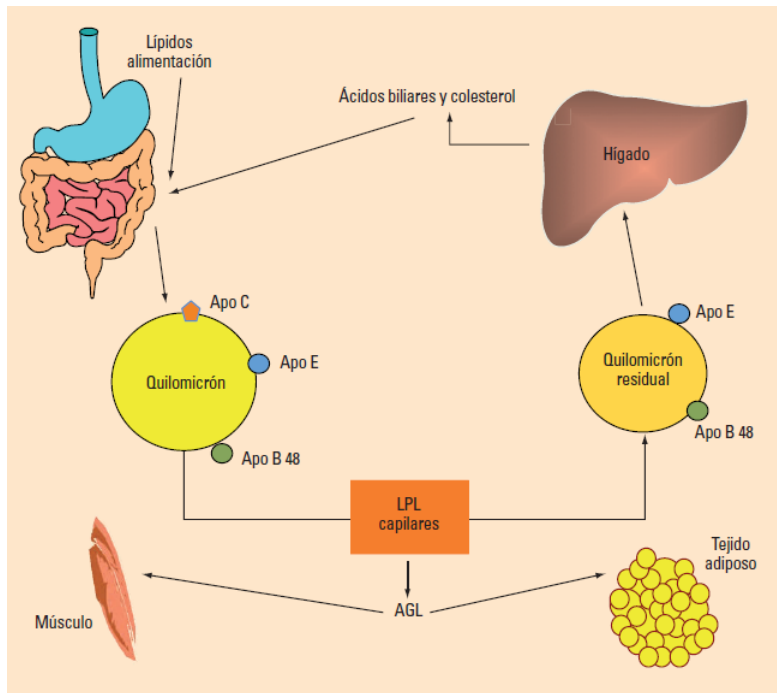


Figura 2. Vía exógena del metabolismo lipídico. Modificado de: ML Martínez-Triguero et al. Alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas. Medicine 2012; 11(19):1125-9.

- **Vía endógena**, donde las VLDL son las encargadas de iniciar el metabolismo de los lípidos endógenos. Son sintetizadas en el hígado, donde el colesterol y los triglicéridos de origen hepático son empaquetados junto a fosfolípidos y apoproteínas B-100, C y E, formando las VLDL nacientes. Las VLDL circulantes sufren un proceso catabólico que da como resultado VLDL residuales o

lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Estas pueden ser captadas por los receptores hepáticos de las LDL y eliminadas de la circulación; el resto son hidrolizados por la lipasa hepática (LH). Así surgen las LDL por transformación de las VLDL.

Las LDL constituyen los principales transportadores del colesterol plasmático hacia los tejidos. Sin embargo el 75% de la captación de las LDL ocurre en el hígado, el resto en las glándulas suprarrenales y tejido adiposo. Para que este proceso se realice se necesita de Apo B100 y receptores para su reconocimiento. Una vez en el interior de la célula la partícula es degradada en sus componentes proteicos y lipídicos. El colesterol libre en exceso es reesterificado por la Acil coA colesterol acil transferasa (ACAT) para el almacenamiento intracelular² (Figura 3).

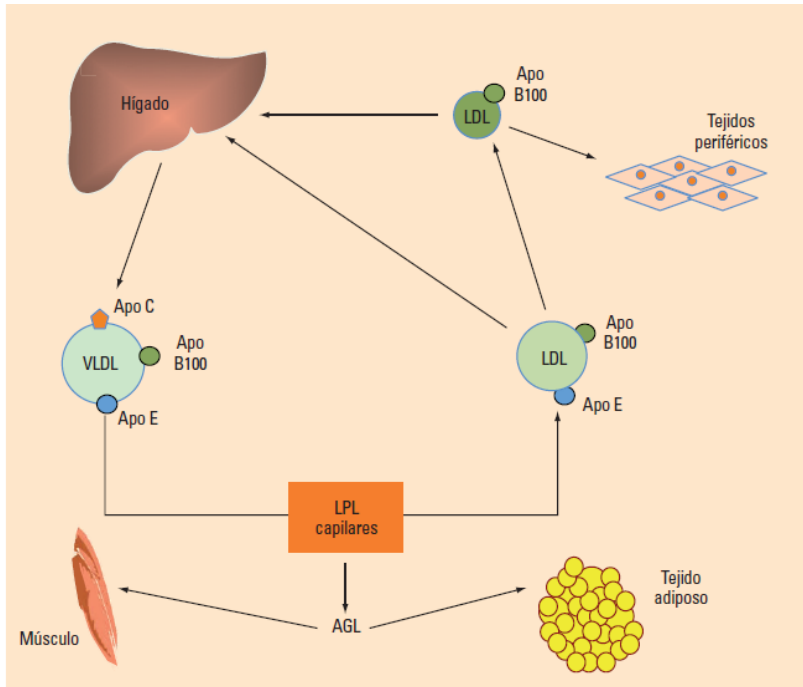


Figura 3. Vía endógena del metabolismo lipídico. Modificado de: ML Martínez-Triguero et al. Alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas. Medicine. 2012; 11(19):1125-9

- **Transporte reverso del colesterol.** Vía para el transporte de colesterol desde la periferia al hígado que se inicia cuando las HDL nacientes, procedentes del hígado o intestino delgado incorporan colesterol desde las membranas celulares. En este proceso la lecitin-colesterol-acil-transferasa (LCAT) esterifica el colesterol con ácidos grasos. Al incorporar colesterol la partícula HDL se transforma en HDL2 y luego en HDL3 y vuelve nuevamente al hígado, donde es incorporada mediante

receptores específicos para Apo A-I. La presencia de Apo E en las HDL facilita posteriormente la captación por los receptores hepáticos y su catabolismo.

El colesterol esterificado de las HDL a su vez puede ser transferido a las LDL y VLDL mediante la acción de la enzima asociada, denominada proteína de transferencia para ésteres de colesterol (CETP)³. La ventaja de este paso es permitir mediante un doble mecanismo de receptores para LDL y HDL devolver colesterol al hígado (Figura 4)⁴.

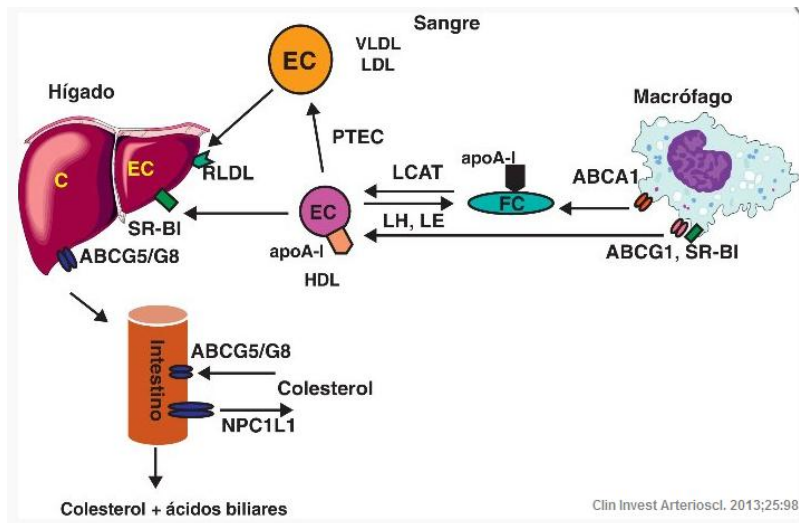


Figura 4. Transporte reverso de colesterol. Modificado de T L Errico et al: Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas. Clin Invest Arterioscl 2013; 25:98-103.

1. B Enfermedad cardiovascular. Arteriosclerosis

Las anormalidades en el metabolismo de las lipoproteínas tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad coronaria y la arteriosclerosis. La arteriosclerosis es la mayor causa de morbilidad y mortalidad en países desarrollados. Actualmente los datos epidemiológicos indican que las enfermedades cardiovasculares son las responsables de una de cada tres muertes en dichos países. La enfermedad cardiovascular constituye la primera causa de muerte en el conjunto de la población española, lo que supone un 33% de todas las defunciones^{5,6}. Este elevado porcentaje viene acompañado por cambios en el estilo de vida, mayor consumo de alimentos ricos en calorías y una vida sedentaria.

La enfermedad arteriosclerótica se trata de un proceso inflamatorio crónico de la pared arterial y de evolución lenta que comienza en las primeras décadas de la vida y evoluciona de manera subclínica durante décadas. Es un proceso que comienza con una lesión en la capa media o íntima de las arterias y está caracterizado por una acumulación de colesterol en los macrófagos que provoca la proliferación en el interior de la pared vascular de cierto tipo de células afectando a la luz del vaso y dificultando el flujo sanguíneo.

En el desarrollo de la arteriosclerosis se observa la presencia de monocitos y macrófagos en el espacio subendotelial⁷, disfunción del endotelio vascular⁸, con un aumento de la permeabilidad,

acumulación de lipoproteínas plasmáticas, acumulación de células musculares lisas en la íntima, vasoconstricción, adhesión celular y agregación (Figura 5).

Las lesiones arterioscleróticas son estrechamientos de la íntima de la pared de las arterias y presentan un crecimiento focal y asimétrico. Están presentes en número variable en todo el árbol arterial. Las zonas donde aparecen suelen coincidir con aquellas hemodinámicamente más comprometidas, tras bifurcaciones donde hay turbulencias y enlentecimiento de la circulación, y una menor fuerza de cizalladura, características que provocan daño endotelial⁹.

El concepto de riesgo cardiovascular se utiliza para definir un conjunto de características, genéticas o adquiridas, asociadas a padecer enfermedades cardiovasculares de origen ateroscleroso¹⁰. Así podemos distinguir:

- Factores no modificables: no se puede actuar sobre ellos desde un punto de vista terapéutico. Dentro de estos encontramos: antecedentes familiares de arteriosclerosis precoz, edad, sexo, raza.
- Factores modificables: son factores sobre los que se puede actuar. Entre ellos destacamos: hipertensión arterial, diabetes, dislipemia y tabaquismos.
- Factores coadyuvantes: Estos modifican de forma negativa los factores anteriores. En este grupo incluimos:

sedentarismo, dieta rica en grasas saturadas, alcohol, ácido úrico, etc. Cuando las personas tienen uno solo de estos factores de riesgo, muestran un incremento en la incidencia de cardiopatía isquémica de cuatro veces, la combinación de dos de estos factores de riesgo aumenta la incidencia en nueve veces, y si se conjugan tres factores el incremento imputable llega a ser de dieciséis veces.

- Factores de riesgo emergentes: Son nuevos factores de riesgo que aumentan el poder predictivo en los pacientes y se pueden dividir en tres categorías
 - Factores de riesgo lipídicos: triglicéridos, remanentes de lipoproteínas, Lp(a), LDL, pequeñas y densas, Apo B, subespecies de la HDL
 - Factores no lipídicos: Homocisteína, factores trombogénicos, marcadores inflamatorios, intolerancia a la glucosa en ayunas.
 - Enfermedad arteriosclerótica subclínica: índice tobillo-brazo, pruebas diagnóstico de isquemia miocárdica^{11,12}.

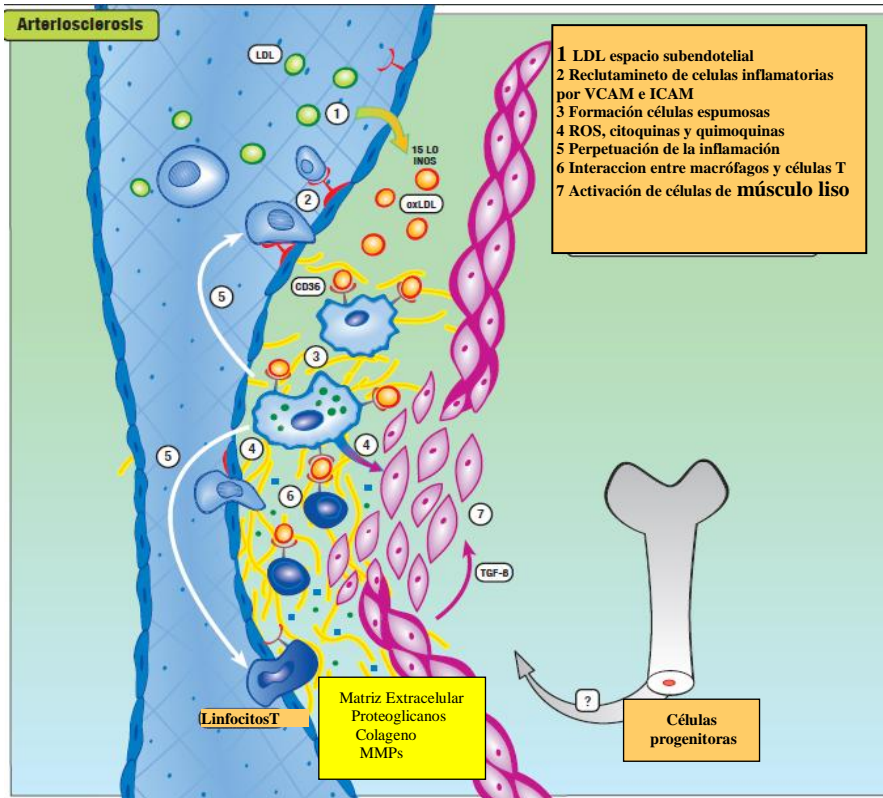


Figura 5. Modelo del desarrollo de la arteriosclerosis. (1) Lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial que se oxidan. (2) Células inflamatorias reclutadas en la pared del vaso vía moléculas de adhesión (VCAM, ICAM) y (3) LDL oxidadas que pasan a células espumosas. (4) La activación de macrófagos conduce a la liberación de citoquinas, quimioquinas, moléculas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno que conducen (5) a la perpetuación de la inflamación y daño del tejido. (6) Los antígenos presentados por los macrófagos y células dendríticas provocan la activación de células citotóxicas, que producen Th-1 citoquinas y proteínas de choque térmico así como TGF-β, que activa células de músculo liso. Modificado de: P Fickert et al. Primary sclerosing cholangitis – The arteriosclerosis of the bile duct?. *Lipids in Health and Disease* 2007; **6**:3. Doi:10.1186/1476-511X-6-3.

1. C Hiperlipemia

El término Hiperlipemia (HLP) lo podemos definir como un aumento de la concentración plasmática de lipoproteínas circulantes con elevación de los niveles de colesterol, de triglicéridos o de ambos.

La HLP es un importante factor de riesgo cardiovascular junto con la hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2 y el estilo de vida cuya prevalencia depende de la población estudiada, siendo mayor en pacientes con enfermedad cardiovascular (ECV).

Las hiperlipidemias engloban un amplio espectro de anomalías lipídicas que pueden ser el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales o estar relacionadas con otras enfermedades¹³.

1. C. 1 Dislipemia

Se entiende por dislipemia las alteraciones de los lípidos plasmáticos que incluyen la elevación del colesterol total y del transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), con aumento de triglicéridos y descenso del colesterol transportado en las lipoproteínas de alta densidad, según la Sociedad Española de Arteriosclerosis.

Las lipoproteínas plasmáticas son complejos macromoleculares de lípidos y proteínas con una enorme diversidad estructural en

función del contenido en lípidos y proteínas, que tienen como función el transporte y la redistribución de los lípidos en el organismo. Las lipoproteínas se diferencian según su densidad, tamaño, carga eléctrica o movilidad electroforética. Los componentes proteicos se denominan Apolipoproteínas y se clasifican en Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo B100, Apo B48, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo D, y Apo E (Tabla1).

Tabla1. Características de lipoproteínas humanas.

	Concentración mg/dL	QM %	VLDL %	IDL %	LDL %	HDL %	Tejido	Peso Molecular (Daltons)
Apo A-I	130					100	Hígado Intestino	24500
Apo A-II	43					100	Hígado Intestino	17414
Apo A-IV	5	50	5			45	Hígado Intestino	44465
Apo B48	5	5					Intestino	241000
Apo B100	80		2	8	90		Hígado	513000
Apo C-I	6		2	1	97		Hígado	6630
Apo C-II	3		30	10		60	Hígado	8900
Apo C-III	12		20	10	10	60	Hígado	8800
Apo E	5		20	20	10	50	Varios	34145

1. C. 2 Clasificación de las Hiperlipemias

El primer intento de clasificación de las hiperlipemias (HLP) fue iniciado en 1963 por Fredrickson utilizando electroforesis en papel con tampón de veronal sódico y albúmina para separar lipoproteínas.

A finales de los años 60 la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo algunas modificaciones y se establecieron seis tipos de HPL, basados también en la electroforesis de las lipoproteínas¹⁴.

- HIPERLIPEMIA TIPO I: Hay un aumento en la concentración de TG y QM, y los niveles de lipoproteínas HDL y de LDL están disminuidos. Se debe fundamentalmente a un defecto de la lipoproteinlipasa, bien porque su síntesis esté disminuida o bien por la ausencia de su activador Apo CII. Son enfermedades poco comunes.

- HIPERLIPOPROTEINEMIA IIa: Se observa una elevación del colesterol, con niveles normales de TG. El aumento de colesterol se debe a un aumento de las LDL, con VLDL y HDL normales o ligeramente reducidas. Se debe a la combinación de factores genéticos y ambientales que impiden el transporte correcto de las LDL, bien por fallos en su receptor o en su ligando Apo B.

- HIPERLIPOPROTEINEMIA IIb: Hay una elevación importante de LDL y moderada de VLDL. Es muy parecida a la anterior aunque presenta una ligera hipertrigliceridemia.

- HIPERLIPOPROTEINEMIA III: Hay un aumento de TG y colesterol y las VLDL tienen una composición alterada. Los individuos con este fenotipo son homocigotos para la isoforma de Apo E (Apo E2), pero para manifestarse la enfermedad como tal es necesaria la presencia de otra alteración del metabolismo proteico.
- HIPERLIPOPROTEINEMIA IV: Hay un aumento de VLDL y de TG totales, permaneciendo normales los niveles de QM y de LDL.
- HIPERLIPOPROTEINEMIA V: Hay un aumento de TG, VLDL y de QM.

Tabla 2: Clasificación fenotípica de la HLP

FENOTIPO	FRACCION LIPIDICA ALTERADA	LIPOPROTEINA ALTERADA
I	TG	QM
IIa	CT	LDL
IIb	CT y TG	LDL y VLDL
III	CT y TG	LDL y VLDL
IV	TG	VLDL
V	CT y TG	VLDL y TG

A tenor de los conocimientos actuales las HLP se pueden clasificar en dos grandes grupos según su etiopatogenia:

1. C. 2. 1 PRIMARIAS

Las hiperlipidemias primarias se asocian con el aumento de la producción de las lipoproteínas y/o con la disminución de su eliminación del organismo.

Son de origen genético y pueden deberse a la interacción de múltiples genes junto con factores ambientales (dieta, alcohol, etc) y hormonales lo que implica una HLP multifactorial. Generalmente aparecen con desviaciones en la concentración de lípidos y con pocos o nulos de signos tales como xantomas o arco corneal¹⁵. En formas más graves se observan importantes elevaciones de los lípidos. Se dividen en tres grupos según la European Arterioclerosclerosis Society¹⁶ (EAS):

- Hipercolesterolemia aislada (fenotipo IIa):
Hipercolesterolemia familiar, déficit familiar de Apo B 100, hipercolesterolemia autosómica dominante y autosómica recesiva, Sistoleremia

- Hipertrigliceridemia aislada (fenotipos I, IV y V):
 - a) Hiperquilomicronemia familiar, enfermedad poco frecuente de caracter autosómico recesivo

donde hay una elevación de los triglicéridos y aumento de los quilomicrones¹⁷.

b) Hipertrigliceridemia familiar. Se considera la hipertigliceridemia primaria más frecuente con herencia autosómica dominante cuya penetrancia depende de la edad. Cursa con aumento de las VLDL causado por un aumento de la síntesis hepática y del descenso del catabolismo, expresando de este modo un fenotipo IV.

c) Déficit de Apo A-V. Es un trastorno genético de herencia autosómica dominante y parece intervenir en la asociación de las VLDL y los quilomicrones con la LPL¹⁸.

d) Déficit de GPIHBP1. Esta proteína se encuentra localizada en la superficie del endotélio de los capilares y se une a la LPL tras su síntesis¹⁹.

- Hiperlipemias mixtas o **combinadas** (fenotipos IIb y III): Hiperlipemia familiar combinada o disbetalipoproteinemia familiar se caracteriza por la presencia de IDL (fenotipo III); es una enfermedad autosómica recesiva provocada por un déficit de lipasa hepática.

1. C. 2. 2 SECUNDARIAS

Alteración de los lípidos y lipoproteínas plasmáticas producidas por enfermedades, situaciones fisiológicas o factores externos que no afectan de forma primaria al metabolismo lipoprotéico. Las causas de las hiperlipemias secundarias son variadas y en muchos casos no se conoce el mecanismo fisiopatológico que subyace a ellas. La importancia de su identificación es fundamental ya que el cuadro desaparece tras corregir la causa²⁰.

Como ocurre en las hiperlipidemias primarias, en las hiperlipidemias secundarias la cantidad de lípidos que entra en el plasma es superior a la que sale del mismo, pudiendo estar aumentada su síntesis o bien disminuida su degradación o aclaramiento. El diagnóstico se basa en la presencia de una hiperlipidemia que coexiste con una enfermedad que potencialmente puede alterar el metabolismo lipídico. Sin embargo, en ocasiones pueden coexistir en un mismo paciente una hiperlipidemia primaria y una enfermedad potencialmente causante de hiperlipidemia que agrava la misma. En estos casos, la falta de normalización de los valores lipídicos tras corregir o tratar la causa potencial sugiere la presencia de una hiperlipidemia primaria agravada por la causa secundaria.

Las hiperlipidemias secundarias son un factor de riesgo cardiovascular, al igual que las primarias. Por otra parte, pueden causar cuadros clínicos agudos similares a los de las hiperlipidemias primarias (pancreatitis aguda, xantomas, etc.).

También pueden ser la pista para diagnosticar la patología de base, como por ejemplo orientar a la presencia de un hipotiroidismo primario ante un paciente con una hipercolesterolemia. Las más frecuentes las podemos ver en la Tabla 3.

Tabla 3. Hiperlipemias secundarias

Hiperlipemias secundarias más frecuentes	
Hipercolesterolemia	Hipotiroidismo Síndrome nefrótico Colestasis Anorexia nerviosa Porfiria aguda intermitente
Hipertrigliceridemia	Diabetes mellitus Obesidad Alcoholismo Hepatitis aguda Insuficiencia renal crónica Trasplante renal Síndrome de Cushing Estrés Quemaduras Tratamiento antirretroviral (inhibidores de la proteasa)
Hiperlipoproteinemia mixta	Hiperlipoproteinemia mixta Diabetes mellitus mal controlada Alcoholismo Anticonceptivos orales Disgammaglobulinemias Hipotiroidismo Síndrome nefrótico Tratamiento antirretroviral

- **Obesidad.** La obesidad, especialmente la abdominal, se asocia con un aumento de triglicéridos, una disminución del cHDL y un aumento del cVLDL y de las partículas LDL pequeñas y densas²¹. El aumento de la llegada de ácidos grasos libres al hígado a través del sistema porta es responsable de la hiperlipidemia característica de la obesidad, condicionando una disminución de la sensibilidad hepática a la insulina y un descenso en la captación de la misma por el hígado, lo que estimula la síntesis de TG y de Apo B100, y favorece una mayor secreción hepática de VLDL-2. Al desarrollo de la hipertrigliceridemia contribuye además la disminución de la actividad de la LPL, principal enzima que actúa sobre las lipoproteínas ricas en TG, VLDL y quilomicrones, y que requiere de la insulina para ejercer su acción. En condiciones normales, la insulina potencia la acción de la LPL, habiéndose descrito una disminución de su acción en pacientes obesos que contribuye a la lipemia postprandial y al descenso del colesterol HDL. Este conjunto de procesos provoca un enriquecimiento en TG de las fracciones LDL y HDL, constituyendo un buen sustrato para la acción de la lipasa hepática, cuya actividad está por el contrario aumentada en la obesidad, conduciendo a la aparición de partículas LDL pequeñas y densas (LDL con fenotipo B).

- **Diabetes mellitus.** La hiperlipidemia asociada a diabetes mellitus es muy frecuente en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2. De forma característica, pueden presentar hiperlipidemias incluso con buen control metabólico debido a la presencia de resistencia a la insulina, mientras que los pacientes con diabetes tipo 1 sólo la presentan en el contexto de un mal control metabólico. Las alteraciones lipídicas encontradas son proporcionales al grado de resistencia insulínica. Esta se asocia a VLDL más grandes, LDL pequeñas y densas y HDL más pequeñas²². El fenotipo característico es el IV, con hipertrigliceridemia aislada, debida tanto a un aumento en la biodisponibilidad de sustrato para sintetizar TG (aumento plasmático de AGL) como a un descenso en la lipólisis de las partículas VLDL. El resto de las alteraciones lipídicas asociadas a la obesidad (colesterol HDL disminuido, LDL con fenotipo B, aumento de la Apo B100) también suelen estar presentes. En el UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) se demostró que la reducción de las concentraciones de LDL y de la presión arterial se acompañaba de una disminución del riesgo de cardiopatía coronaria en mayor medida que el control de la glucemia. Otros estudios como el HPS (Heart Protection Study) o el CARDS (Collaborative Atorvastatin Diabetes Study) han mostrado que el uso de estatinas para reducir índices de colesterol LDL en pacientes diabéticos con niveles basales de colesterol LDL cercanos a 100 mg/dl previene la aparición de eventos cardiovasculares, lo que refuerza la

importancia de la prevención primaria. Estos estudios resaltan el papel clave que desempeña la reducción de los lípidos en la prevención de la enfermedad cardiovascular en la diabetes tipo 2, y deberá hacer que los lípidos reciban, como mínimo, la misma atención que el control de la glucemia y de la presión arterial en el tratamiento de estos pacientes.

Los objetivos actuales de control lipídico en adultos con diabetes son los siguientes: colesterol LDL menor de 100 mg/dL (prevención primaria) o menor de 70 mg/dL (prevención secundaria); colesterol HDL mayor de 40 mg/dl (hombres) o mayor de 50 mg/dL (mujeres) y TG menor de 150 mg/dL según la ATPIII.

- **Hipotiroidismo.** La incidencia de hiperlipidemia en esta entidad es muy frecuente, observándose hasta en el 80-90% de los individuos afectados. El fenotipo de hiperlipidemia observado en el hipotiroidismo puede ser una hipercolesterolemia pura (fenotipo IIa) o una hiperlipidemia mixta (fenotipo IIb o III), y más raramente una hipertrigliceridemia aislada (fenotipo IV). La hiperlipidemia asociada con mayor frecuencia al hipotiroidismo es la de fenotipo IIa, con elevación del colesterol LDL²³. En un estudio de 268 pacientes con hipotiroidismo, la hipercolesterolemia aislada estuvo presente en el 56% de los mismos, mientras que la hiperlipidemia IIb lo estaba en el 34% y la hipertrigliceridemia aislada en el 1,5%. Tan sólo

el 8,5% de los pacientes presentaban un perfil lipídico normal. Las concentraciones de HDL pueden estar normales, disminuidas o elevadas.

- **Síndrome de Cushing.** El síndrome de Cushing es el cuadro clínico derivado del exceso de glucocorticoides, tanto exógenos (más frecuente) como endógenos. Esta es una causa muy frecuente de hiperlipidemia secundaria, sobre todo en el caso de administración exógena de glucocorticoides en altas dosis. Suele asociarse con mayor frecuencia a una hipetrigliceridemia o a una hiperlipidemia mixta. Por una parte, los glucocorticoides causan resistencia a la insulina, hiperinsulinismo e hiperglucemia, que a su vez conlleva, por los mismos mecanismos que en la diabetes mellitus tipo 2, al aumento en la síntesis y secreción hepática de TG y VLDL. Además los glucocorticoides estimulan la lipasa, movilizándose así los TG del tejido adiposo y elevándose los AGL en plasma, lo que a su vez estimula la síntesis hepática de VLDL. Otro efecto de los corticoides es el estímulo post heparina de la lipasa endotelial, lo que conlleva un aumento del aclaramiento plasmático de las VLDL, aumentando los niveles de LDL^{24,25}.

1. D Hiperlipemia Familiar Combinada

1. D. 1 Introducción

La Hiperlipemia Familiar Combinada (HFC; MIM 144250) es la hiperlipemia genética más frecuente en pacientes supervivientes a infarto agudo de miocardio (IAM) antes de los 60 años. La HFC fue descrita para denominar un nuevo trastorno lipídico por Goldstein y cols. en 1973²⁶ después de revisar más de 50 familias con historia de cardiopatía prematura donde se observó que múltiples miembros de las familias tenían elevaciones moderadas de colesterol y/o triglicéridos, y que el patrón de herencia era compatible con un modelo autosómico dominante. De igual forma en Estados Unidos, Rose y cols y en Finlandia Nikkila y cols²⁷ estudiaron familias con características similares a las observadas por Goldstein.

Esta enfermedad presenta un complejo fenotipo que no está aún totalmente entendido. Los pacientes presentan elevaciones en el colesterol total y/o triglicéridos que pueden variar a lo largo del tiempo, dando fenotipos diferentes según la clasificación de Fredrickson¹⁴ IIa, cuando presentan hipercolesterolemia, IV cuando presentan hipertrigliceridemia o IIb cuando la hiperlipemia es mixta.

Mc Nelly y cols. en un seguimiento durante 20 años en familias con HFC, encontraron que un tercio de las familias cambiaron de fenotipo y que el 17% de los pacientes pasaron a ser

normolipémicos²⁸. También se observaron en estos pacientes una elevación de la Apo B100 y Apo C-III que se asociaron frecuentemente con hiperuricemia, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa y obesidad^{29,30}, aumento de concentración de insulina, ácidos grasos libres, disminución de la concentración de HDL y de la actividad de la LPL^{31,32,33}.

La HFC aparece con una prevalencia de aproximadamente del 1 al 2 % en la población general³⁴. Esto en España supone entre 400.000- 800.000 personas afectadas y en pacientes con cardiopatía isquémica alrededor del 14 % sufren esta enfermedad. Este porcentaje puede aumentar hasta un 40% en pacientes supervivientes a infarto de miocardio³⁵.

1. D. 2 Fisiopatología

La HFC es causada por una sobreproducción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad con un deficiente aclaramiento de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Estas lipoproteínas ricas en triglicéridos de origen exógeno y endógeno son el resultado de una sobreproducción de Apo B100^{36,37} (Figura 5).

El posible mecanismo de este incremento de Apo B podría ser un aumento en la concentración de ácidos grasos libres (AGL) que llegan al hígado como consecuencia de una disminución de la captación del tejido adiposo de los mismos³⁸.

Se han descrito diferentes causas para explicar la captación defectuosa por parte de los adipocitos de los AGL:

- Resistencia a la insulina e hiperinsulinismo^{39,40}. La resistencia a la acción de la insulina está directamente relacionada con alteraciones del metabolismo de lípidos; la insulina es una hormona que controla el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas a través de diferentes reacciones bioquímicas. A nivel de los lípidos la insulina actúa sobre distintas enzimas como son la Acetil CoA carboxilasa para aumentar la síntesis de ácidos grasos; en hígado, aumenta el aporte de dihidroxiacetona fosfato para la reesterificación de los triglicéridos mediante la activación de la glucólisis, y sobre la lipasa hormonosensible inhibiéndola e impidiendo que hidrolice los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos. Por tanto regula el metabolismo de los triglicéridos controlando su reesterificación y lipólisis y sobre la piruvato deshidrogenasa para aumentar la síntesis de AcetilCoA.

Se han descrito múltiples alteraciones asociadas a la IR, entre ellas se encuentra: intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, HDL bajo, LDL pequeñas y densas, hipertrigliceridemia

postprandial, elevación células de adhesión, aumento de PCR, etc.

La acción de la insulina en los diferentes órganos lo podemos observar en la Figura 6.

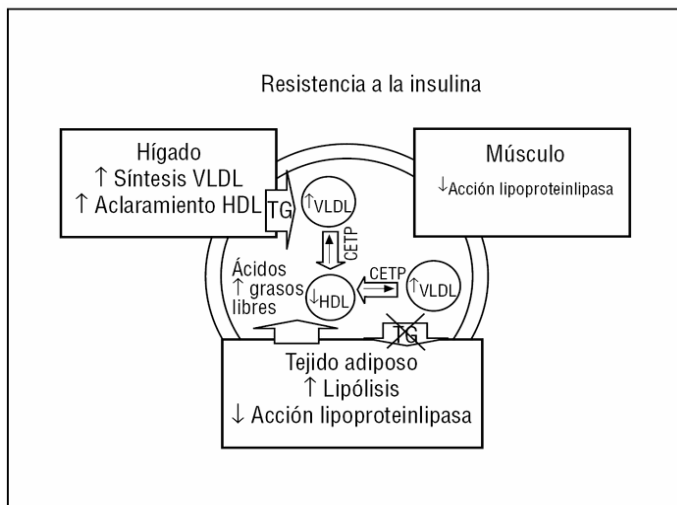


Figura 6. Consecuencia de la IR en el metabolismo lipídico.

- Interacción defectuosa entre la proteína que estimula la acilación (ASP) y su receptor⁴¹.
- Alteración de los mecanismos controladores de la movilización de triglicéridos intracelulares en tejido adiposo (catecolaminas y lipasa hormona sensible

(LHS), observado en población sueca aunque no corroborado para otras poblaciones⁴².

- Aumento del flujo de AGL unido a albumina independiente de los efectos de la insulina⁴³.

El contenido excesivo de ácidos grasos en el hígado determina un aumento de la síntesis de triglicéridos y de VLDL. La elevada secreción de VLDL-2 da lugar a hipertrigliceridemia y elevadas concentraciones de Apo B. Las partículas resultantes, conocidas como VLDL-1, que tienen una vida media mayor, favorecen, por una parte, la conversión en partículas aterogénicas LDL pequeñas y densas⁴⁴ y disminuyen las concentraciones de HDL, y por otra, dificulta la hidrólisis de lipoproteínas postprandiales.

A los cambios en la producción hepática de lipoproteínas se unen defectos en sus vías de eliminación. Se produce una disminución en la actividad de la lipoproteinlipasa, enzima encargada de la lipólisis de las VLDL. La menor actividad de la enzima puede ser debida a la resistencia a la insulina o a las concentraciones anormalmente altas de ácidos grasos que son inhibidores de la actividad de la lipasa. La actividad de la lipasa hepática, la cual está aumentada por la resistencia a la insulina, favorece la aparición de la LDL pequeñas y densas al degradar las partículas de triglicéridos de las LDL e IDL.

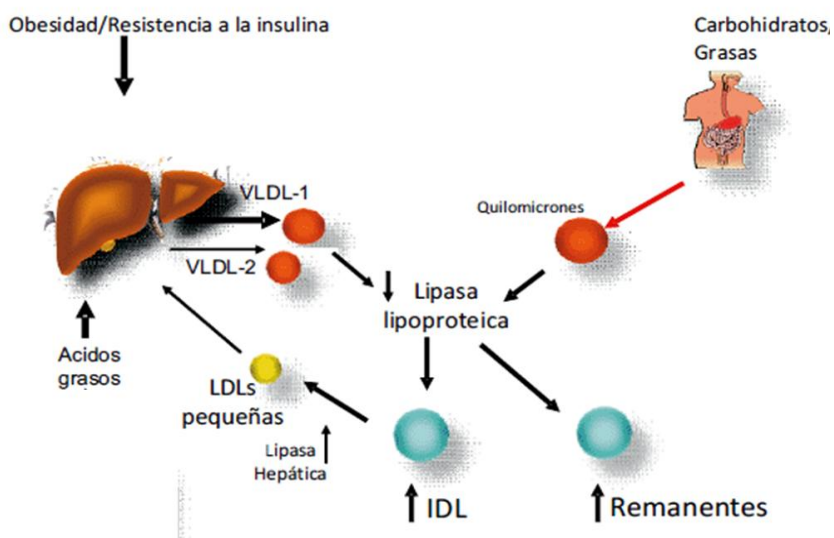


Figura 7. Resumen fisiopatología de la HFC. Modificación de Aguilar-Salinas et al. Investigación Clínica 51(2): 2010.

Las partículas LDL son heterogéneas en cuanto a tamaño, densidad y propiedades físicas. Esto les confiere diferente potencial aterogénico. Así, los individuos con partículas de LDL grandes se les clasifica como patrón A, mientras los que tienen predominio de partículas pequeñas y densas se clasifican como patrón B y tienen mayor riesgo de desarrollar ECV⁴⁵.

El tamaño de las LDL está relacionado con la concentración de partículas VLDL y de triglicéridos totales. La mayor parte de los sujetos con una trigliceridemia superior a 200 mg/dL, tienen un patrón B de LDL, como se puede apreciar en la (Figura 8).

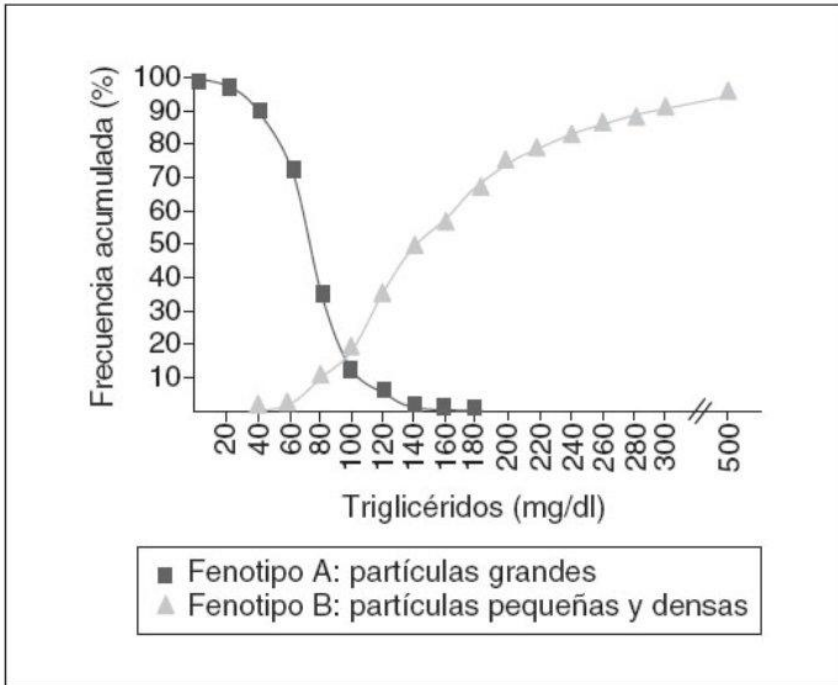


Figura 8. Frecuencia de fenotipos de la partícula LDL en relación a la concentración de triglicéridos (modificada de Austin et al⁴⁶)

Las LDL pequeñas densas son consideradas como un factor de riesgo cardiovascular emergente por el National Cholesterol Education Programm Adult Treatment Panel III⁴⁷. De la misma forma, las partículas HDL son una clase de lipoproteínas heterogéneas debido al diferente contenido en apolipoproteínas, lípidos y enzimas y al tamaño, distinguiendo entre HDL grandes (1-3), intermedias (4-7) y pequeñas (8-10)⁴⁸. También han mostrado una fuerte correlación inversa con el riesgo cardiovascular^{49,50}.

Aunque un descenso de HDL se correlaciona con un aumento en el riesgo cardiovascular, parece que la calidad de las partículas es más importante que la cantidad total⁵¹, sugiriéndose que las partículas más pequeñas se correlacionan positivamente con el riesgo cardiovascular^{52,53,54}.

1. D. 3 Diagnóstico

Desde el punto de vista clínico la HFC se manifiesta con hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia moderada. El diagnóstico clásico de la HFC se basa en el estudio familiar y la expresión fenotípica variable con elevación de la Apo B plasmática e historia positiva de enfermedad cardiovascular prematura en pacientes y familiares de primer grado. Otras anomalías frecuentemente asociadas son bajos niveles de colesterol HDL, alteraciones en la composición de las lipoproteínas, con presencia de LDL pequeñas y densas, y aumento de los ácidos grasos libres^{55,56}.

La HFC en la actualidad no tiene ninguna prueba o marcador bioquímico definitivo para realizar un diagnóstico inequívoco, lo que dificulta su diagnóstico preciso. Bredie y cols.⁵⁷ han propuesto una serie de criterios de inclusión y exclusión que son los más utilizados.

Criterios mayores de inclusión:

- Presencia de una hiperlipemia múltiple en familiares de primer grado, incluyendo: hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hiperlipemia combinada, definidas por concentraciones plasmáticas en ayunas de colesterol y/o triglicéridos superiores al percentil 90 de acuerdo a edad y sexo.
- Herencia de la hiperlipemia con una transmisión autosómica dominante.
- Presencia de arteriosclerosis prematuras (antes de 60 años) en familiares de primer grado.

Criterios de exclusión:

- Presencia de xantomas en la familia.
- Presencia de causas secundarias de hiperlipemia en familiares afectados.
- Presencia de genotipo Apo E (E2/E2) en sujetos afectados.

Criterios de inclusión adicional o menores:

- Concentración elevada de Apo B en plasma.
- Presencia de un patrón de LDL con predominio de las partículas pequeñas y densas.
- Presencia de hiperlipemia en la adolescencia.

Diagnóstico: Se basa en el cumplimiento de tres criterios mayores de inclusión y exclusión; o que cumplan los criterios mayores de inclusión uno y dos, criterios de exclusión y al menos un criterio de inclusión adicional.

Diversos autores han demostrado que los criterios más consistentes para el diagnóstico, y que mejor diferencian los sujetos afectados de los familiares no afectados, son la presencia de valores plasmáticos elevados de Apo B y de LDL pequeñas y densas ^{58,59}, por lo que se ha propuesto la necesidad de modificar los criterios diagnósticos iniciales introduciendo nuevos parámetros que mejoran el diagnóstico:

CT > percentil 75-90

TG > percentil 90

ApoB > 120mg/dL

Predominio de LDL pequeñas y densas

También se ha observado descenso en los niveles de HDL, resistencia insulínica, hipertensión arterial, obesidad centrípeta así

como valores elevados de ácido úrico, que pueden ayudar en el diagnóstico de la HFC.

1. D. 4 Genética

El ADN que forma un organismo es lo que se conoce como genoma, el cual se encuentra organizado en cromosomas, en los cuales encontramos dos brazos separados por el centrómero, el brazo corto o "p" y el brazo largo o "q". La unidad elemental de los cromosomas que portan la información de los caracteres hereditarios son los genes, En los cuales podemos encontrar cuatro zonas:

- Zona promotora situada en el extremo 5'.
- Zona reguladora situada en el extremo 3'.
- Exones que representan la parte del gen que codifica las proteínas.
- Intrones, fragmentos de ADN que se encuentran entre dos exones.

Cada cromosoma está formado por bandas y las bandas se ubican en regiones a lo largo de los brazos. Las regiones se numeran desde el centrómero hacia el telómero (extremo del cromosoma). Para definir una banda se necesita: número de cromosoma, brazo, región y banda. Así, por ejemplo el gen de la lipoproteinlipasa se encontraría en 8p22, esto es cromosoma 8 brazo corto región 2 banda 2 (Figura 9).

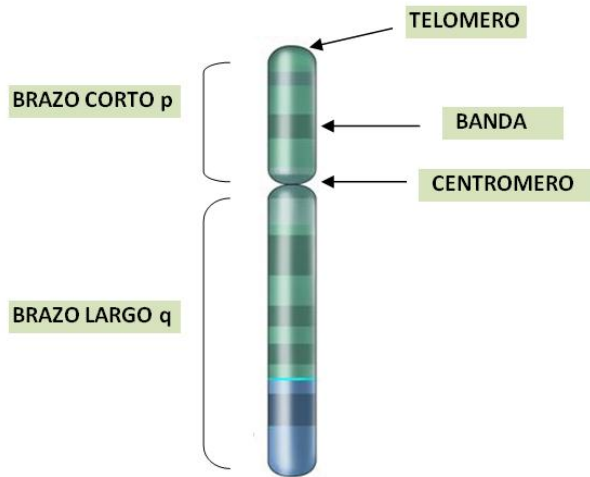


Figura 9: Estructura de un cromosoma

El lugar que ocupa cada gen en un cromosoma es lo que llamamos locus, en plural loci. En cada cromosoma homólogo los genes que portan la información para un mismo carácter ocupan el mismo locus, aunque puede suceder que se trate de alelos distintos. Los alelos se nombran con letras mayúsculas cuando es dominante ej. A, y minúscula si es recesivo ej. a; así tenemos tres posibilidades: homocigoto dominante AA, heterocigoto Aa y homocigoto recesivo aa.

El análisis genético hasta ahora no ha revelado un marcador específico de la HFC. En un primer momento la HFC fue considerada una enfermedad con rasgo autosómico dominante⁶⁰ (variación en genes pertenecientes a cromosomas no sexuales donde se expresa el alelo dominante). Sin embargo análisis posteriores realizados por Godlstein y cols. son compatibles con una herencia multigénica. Se han realizado estudios en múltiples

familias dando como resultado una herencia compleja. Estos estudios sugieren que existen genes que afectan a los niveles de triglicéridos en suero⁶¹, Apo B^{62,63}, subfracción LDL⁶⁴ e insulín resistencia⁶⁵.

En estudios realizados sobre el genoma, se ha observado la existencia de determinadas regiones cromosómicas donde se encuentran genes que contribuyen al perfil lipídico de la HFC. En el primer estudio del genoma realizado sobre familias finlandesas se identificaron 5 loci: 1q21, 2q31, 10q11.2-10qter y 21q21^{66,67}. Fueron identificadas en familias holandesas 4 loci sobre cromosoma 2p, 11p, 16q y 19q⁶⁸; 2 loci 6q y 8p fueron identificados en familias inglesas⁶⁹. El loci 1q21 ha sido también confirmado en familias alemanas, chinas y mejicanas^{70,71}.

El modelo genético sugiere que la HFC puede resultar de la combinación de genes mayores dominantes con genes modificadores en los niveles plasmáticos de lípidos. La identificación de estos genes modificadores puede ayudar a la explicación de la heterogeneidad genética de la HFC.

El estudio de algunos genes candidatos, basándose en su función biológica y contribución sobre el fenotipo lipídico, pueden ayudar a aclarar la base genética de la HFC, aunque estos genes posiblemente no sean la primera causa de la enfermedad (Tabla 4). Entre los genes estudiados e involucrados en el metabolismo lipídico están la lipoproteinlipasa (LPL)⁷², lipasa hepática (LH)⁷³, el cluster Apo AI/CIII/AIV^{74,75}, Apo AV⁷⁶, LCAT⁷⁷, Apo E⁷⁸, genes

relacionados con el metabolismo de tejido adiposo como TNF⁷⁹ y lipasa hormonosensible (LHS)⁸⁰, genes relacionados con la insulinresistencia, también tenemos la proteína de unión ácidos grasos (FABP)⁸¹, y receptores actividad proliferación de peroxisoma PPAR- δ ⁸².

Tabla 4. Genes candidatos asociados a HFC

	REGION
LPL	8p22
LH	15q21
APO E	19q13
APO AI/CIII/AIV/AV	11q13
LCAT	16q22
FABP	4q.28
LHS	19q13.3
TNF	1p36
PPAR- δ	22q
5UFS-1	1q23

Pajukantay cols.⁸³ mostraron que existía una importante asociación con el gen que codifica el factor de transcripción UFS-1. Está localizado en el cromosoma 1q21 y regula la expresión de varios genes implicados en el metabolismo de lípidos y glucosa. Hoffstedt y cols. demostraron la asociación entre USF-1 y el incremento de la lipólisis de adipocitos⁸⁴.

Todo esto indica que la HFC puede desarrollar efectos aditivos de muchos genes y por tanto se puede afirmar que no existe ningún marcador genético específico en estos momentos para esta enfermedad.

De entre los genes candidatos implicados en el metabolismo lipídico, la LPL, LH y Apo E tienen una influencia clara en el mismo. Estos genes codifican para enzimas y apolipoproteínas ampliamente citados en la literatura por su papel en la eliminación, transporte y remodelado de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Por tanto, por el importante papel que juegan en el perfil lipídico de los enfermos de HFC nos centraremos en los genes de la LPL, LH y Apo E (Tabla 5).

Tabla 5. Mutación y patología asociada de genes candidatos

	MUTACION	PATOLOGIA ASOCIADA
EXON 2(LPL)	Asp9Asn	Hipertrigliceridemia y LDL pequeñas y densas
EXON 5(LPL)	Gly188Glu	Hipertensión arterial
EXON 6(LPL)	Asn291Ser	Lipemia postprandial
PROMOTOR (LPL)	T93G	Triglicéridos y cardiopatía isquémica
LH	C514T	Hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia
ApoE		Hiperlipemia y enfermedad cardiovascular

1. D. 4. 1 Lipoproteinlipasa (LPL)

La lipoproteinlipasa (LPL, E.C. 3.1.1.34) es una enzima glucoproteica, dimérica y anclada en el endotelio que juega un papel clave en el catabolismo de las partículas ricas en triglicéridos como son los QM y VLDL⁸⁵, hidrolizando los triglicéridos para liberar ácidos grasos libres y 2-monoacilgliceroles que son captados y metabolizados por los tejidos subyacentes para su almacenaje y oxidación y favoreciendo el intercambio de apolipoproteínas y lípidos con las HDL, y transformando los QM y, sobre todo las VLDL, en partículas cada vez más pequeñas y cargadas de colesterol. La alteración en este catabolismo da lugar a la aparición de partículas VLDL más pequeñas y con concentraciones más elevadas de Apo B, que condicionan también la aparición de un mayor número de partículas LDL pequeñas y densas (fenotipo B de las LDL). Estas partículas se ha comprobado que son más aterogénicas y con menor afinidad por el receptor de las LDL^{86,87} (Figura 10).

La LPL se sintetiza preferentemente en las células del tejido muscular y adiposo. Después de su síntesis el enzima sufre una serie de modificaciones que van a controlar posteriormente su actividad. Así, si no existe una glicosilación, el enzima es inactivo⁸⁸.

La expresión de la LPL requiere la formación de un complejo homodimérico no covalente para ser activa. Tras las modificaciones se transporta a la parte externa de la membrana

de las células endoteliales que rodean la luz de los capilares sanguíneos, donde se encuentran normalmente adheridas a proteoglicanos heparan-sulfato y desde esta posición ejercen su función. También existe LPL libre en el plasma, pero ésta es inactiva.

Los principales sustratos de la LPL son los QM y VLDL que además proveen a la LPL de un cofactor importante para su acción enzimática, la Apo C-II^{89,90}.

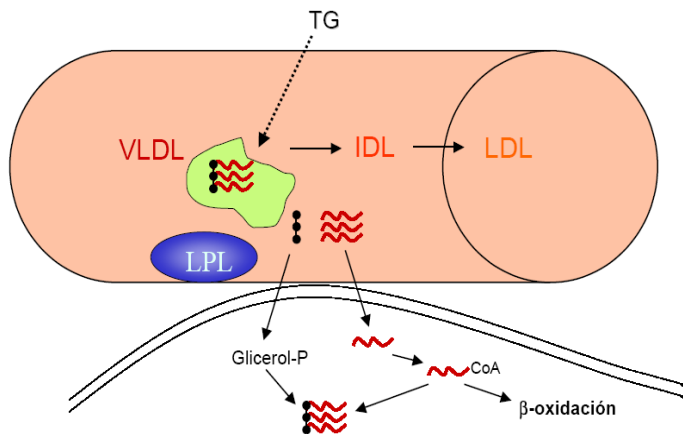


Figura 10. Función de la lipoprotein lipasa (LPL)

Está regulada la LPL por numerosos factores, entre ellos encontramos citoquinas proinflamatorias, hormonas, etc. La insulina incrementa su actividad, lo que podría explicar porqué en situaciones de resistencia periférica a la hormona como la

diabetes tipo 2, aumenta la concentración y vida media tanto de los quilomicrones como de las VLDL, con negativas repercusiones sobre el riesgo cardiovascular⁹¹.

El gen de la LPL se localiza en el brazo corto del cromosoma 8 (8p22) y está formado por 10 exones y 9 intrones con un tamaño 30 Kilobases (Kb).



Figura 11. Posición del gen de la LPL en el cromosoma 8

A partir de la secuenciación de cDNA se codifica una proteína madura de 448 aminoácidos con un peso molecular (PM) de 50.394 daltons que tras glicosilarse llega a 55.000 daltons en caso de la formación monomérica madura de la proteína⁹². Su centro catalítico lo forman tres aminoácidos: Ser132, Asp156 y His241⁹³.

Se han descrito unas 80 mutaciones del gen de la LPL en humanos la mayoría sin efecto sobre el metabolismo; las más frecuentes se encuentran en los exones 5 y 6⁹⁴. Muchas de estas mutaciones son poco frecuentes, aunque algunas están asociadas a la HFC y enfermedades cardiovasculares prematuras.

La mutación **Asn291Ser (N291S)** situada en el exón 6 es una de las más frecuentes y ha aparecido asociada a aterosclerosis

coronaria prematura y HFC. Algunos datos sugieren que esta mutación afectaría especialmente a la lipemia postprandial empeorando el fenotipo de la HFC. La frecuencia de esta mutación en la población caucásica oscila entre 2-5%⁹⁵.

Un meta-análisis ha puesto de manifiesto que esta variante Asn291Ser es un factor de riesgo para dislipemia, caracterizado por hipertrigliceridemia y descenso de los niveles HDL, así como para la diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad coronaria^{96,97}.

Otra mutación encontrada con relativa frecuencia en el gen de la LPL es la **Asp9Asn (D9N)**, situada en el exón 2, y parece estar relacionada con un aumento del riesgo de aterosclerosis coronaria, hipertrigliceridemia y aumento de las LDL pequeñas y densas. Su frecuencia se ha estimado entre 4-5%⁹⁸.

Una tercera mutación encontrada ha sido **Gly188Glu**, situada en el exón 5 y que se ha observado que está relacionada con la hipertensión arterial⁹⁹.

Una cuarta mutación ha sido la variante **-T93G**, variante del promotor, normalmente en desequilibrio de ligamiento con la mutación Asp9Asn, estando esta doble heterocigosidad asociada a elevados niveles plasmáticos de triglicéridos e incremento de cardiopatía isquémica¹⁰⁰.

1. D. 4. 2 Lipasa hepática (LH)

La lipasa hepática (LH) (EC 3.1.1.3), es una enzima glicoproteica que se sintetiza en el retículo endoplásmico de los hepatocitos y reside en la superficie de éstos donde realiza su acción. La LH sufre una glicosilación para su actividad y secreción¹⁰¹.

Tiene dos actividades: fosfolipasa y triglicérido lipasa; además interviene en el modelado de partículas IDL para su transformación en LDL eliminando fosfolípidos y triglicéridos en los pasos finales¹⁰². También elimina fosfolípidos y triglicéridos de las HDL, provocando un aclaramiento de HDL del plasma, así como la conversión de HDL2 a HDL3, y su deficiencia da lugar a un patrón lipídico en el que aumentan el colesterol y los triglicéridos, siendo el aumento de colesterol debido fundamentalmente a la elevación de HDL. Variaciones en la actividad de la LH pueden predisponer a enfermedad arterial coronaria por su efecto sobre el tamaño y densidad de las partículas LDL y variaciones en la concentración HDL¹⁰³.

La deficiencia de LH se transmite de forma recesiva de forma muy poco frecuente y se caracteriza por la aparición de arteriosclerosis de forma prematura y da lugar a una circulación anormal de las lipoproteínas¹⁰⁴.

El gen de la LH se localiza en el brazo largo del cromosoma 15q21¹⁰⁵ y está constituido por 9 exones y 8 intrones con un

tamaño de 30 kb. Este gen sintetiza una proteína madura de 477 aminoácidos con un PM de 53.431 daltons¹⁰⁶ (Figura12).



Figura 12: Posición del gen de la LH en cromosoma 15

Se han descrito algunas mutaciones en casos raros de déficit familiar de LH que se asocian con pérdida de actividad del enzima o con una alteración en su procesamiento celular.

En la región del promotor encontramos cuatro polimorfismos, que se encuentran en completo desequilibrio de ligamiento, G250A, C514T, T710C y A763G^{107,108}. El más estudiado de todos ellos en relación con la HFC es el NIaIII (C514T)¹⁰⁹ que parece explicar un 38% de la variabilidad en la actividad de la LH¹¹⁰. Los heterocigotos para esta mutación se relacionan con un aumento moderado de los niveles de HDL en hombres pero no en mujeres. Los homocigotos se asocian con un marcado incremento de la concentración de HDL y Apo A-I.

1. D. 4. 3 Apolipoproteína E (Apo E)

La apolipoproteína E (Apo E) es una glicoproteína sintetizada fundamentalmente en el hígado, pero también en otros órganos como bazo, riñón, glándulas adrenales y cerebro. En el plasma, la Apo E se encuentra en los QM, VLDL y HDL. Participa en el transporte y el metabolismo de lípidos plasmáticos al actuar como

ligando de las LDL y de los receptores de Apo E¹¹¹. El gen a partir del cual se va a sintetizar la Apo E en el humano se encuentra situado en el cromosoma 19. Es una proteína compuesta por 299 aminoácidos y codificada por un gen situado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13) con una longitud de 3.7 Kb y 4 exones¹¹² (Figura 13).

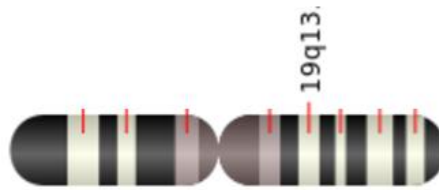


Figura 13. Posición gen Apo E en cromosoma 19

La naturaleza polimórfica del gen de la Apo E se describió tras los estudios de Uterman por isoelectroenfoque¹¹³. Es un gen con tres alelos codominantes (E2, E3 y E4) que dan lugar a 6 posibles genotipos: E2/E2, E3/E3, E4/E4, E2/E3, E2/E4 y E3/E4. La frecuencia de los alelos E4, E3 y E2 en la población caucásica obtenidos por electroforesis de acrilamida son 14 %, 80 % y 6 % respectivamente¹¹⁴. Estas isoformas se diferencian en la sustitución de uno de los aminoácidos en la posición 112-158¹¹⁵. La E2 tiene cisteína en ambos, la E4 arginina en ambos y la E3 cisteína en el 158 y arginina en el 112¹¹⁶ (Figura 14) lo que va a modificar el reconocimiento de sus receptores específicos, especialmente en el caso de la Apo E2.

El papel principal de la Apo E en el metabolismo lipoproteico es el aclaramiento por parte del hígado de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL y QM) y de sus remanentes ya que actúan

como ligando para el receptor hepático de las LDL y para el receptor de los remanentes (LRP)¹¹⁷. Pero además, también regula la producción hepática de las partículas VLDL y la lipólisis de las mismas por parte de la LPL.

Los sujetos portadores de la isoforma E2 tienen menos colesterol intracelular debido a la escasa afinidad que tiene por el receptor de las LDL lo que disminuye la captación hepática de QM y VLDL¹¹⁸. Esto provoca un aumento en el número de receptores de LDL en el hepatocito. Además parece ser que la apoE2 disminuye la conversión de VLDL en LDL. Por su parte, la isoforma E4 tiene una mayor afinidad por las VLDL y los QM, lo que implica un aumento de colesterol intracelular que da lugar a una disminución de la expresión de los receptores de la LDL¹¹⁹. En el estudio Framingham¹²⁰ se ha encontrado que en varones no sólo el alelo E4 se asocia con mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, sino que también los portadores del alelo E2 tenían un significativo mayor riesgo.

El impacto de las diferentes isoformas de la Apo E especialmente E2 y E4 intervienen en el metabolismo lipídico y parecen intervenir en la expresión fenotípica de la HFC.

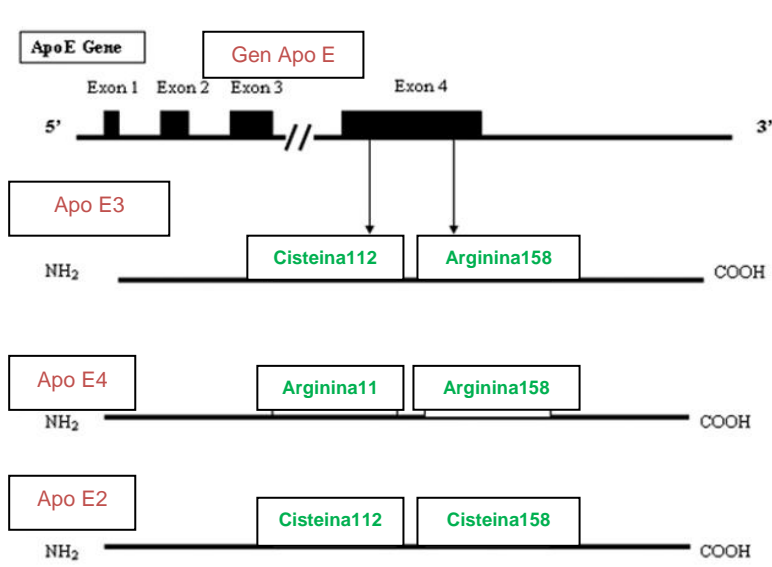


Figura 14. Gen Apo E y sus proteínas correspondientes. La figura muestra el gen con sus cuatro exones. Dentro del cuarto exón, están los codones correspondientes a los sitios de mutación 112 y 158 en la proteína Apo E, lo cual resulta en las tres proteínas correspondientes, Apo E3, Apo E4 y Apo E2.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2. A Hipótesis

La hiperlipemia familiar combinada es la forma de dislipemia genética más frecuente entre las familias de pacientes que han sufrido un infarto de miocardio prematuro, constituyendo un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedad cardiovascular prematura y se caracteriza por la existencia de múltiples fenotipos lipoproteicos con elevación de los niveles de colesterol total y/o triglicéridos, así como aumento de la concentración de Apo B, aumento de las LDL pequeñas y densas y disminución de HDL.

La enfermedad está causada por una sobreproducción de lipoproteínas ricas en triglicéridos junto con un deficiente aclaramiento de los mismos. La hiperlipemia familiar combinada es una enfermedad heterogénea y poligénica con un patrón autosómico dominante donde su manifestación se puede llevar a cabo por la interacción de múltiples factores genéticos y también ambientales. Los polimorfismos que se han observado en diferentes enzimas involucradas en su metabolismo lipídico, podrían repercutir en la enfermedad, así como la presencia mayoritaria de las partículas LDL pequeñas y densas (patrón B de las LDL) y la variación de las diferentes subfracciones del HDL.

La hipótesis de trabajo es que en la HFC aunque las alteraciones genéticas no sean la primera causa de la enfermedad, la

presencia de diferentes polimorfismos en enzimas implicadas en el metabolismo lipídico podría relacionarse con los distintos fenotipos lipoproteínicos, así como en el predominio de LDL pequeñas y variación de las subfracciones de HDL.

2. B Objetivos

- Análisis del perfil lipídico de pacientes con HFC junto con el estudio de variaciones en las subfracciones de LDL y HDL.
- Estudio de diferentes polimorfismos de las enzimas lipoproteinlipasa, lipasa hepática y apolipoproteína E en pacientes con Hiperlipemia Familiar Combinada.
- Analizar el grado de relación del perfil lipídico aterogénico con los diferentes polimorfismos estudiados en pacientes con Hiperlipemia Familiar Combinada de la Comunidad Valenciana.
- Analizar la relación de los polimorfismos de la LPL, LH y Apo E con las partículas LDL pequeñas y densas.

PACIENTES Y METODOS

3 PACIENTES Y METODOS

3. A Pacientes

Hemos estudiado 33 familias reclutadas durante tres años con Hiperlipemia Familiar Combinada procedentes de la Unidad de Lípidos del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia; todas ellas pertenecientes a la Comunidad Valenciana. Fueron diagnosticados de HFC un total de 93 individuos según los criterios de inclusión y exclusión de Bredie SJ y cols³⁰. De los sujetos diagnosticados 43 son hombres y 50 son mujeres con un rango de edad entre 18 a 75 años.

Los pacientes se seleccionaron siguiendo los siguientes criterios:

- Edad: 18-75 años.
- IMC inferior a 35.
- Historia familiar de dislipemia con fenotipo múltiple.
- Colesterol total superior a 200mg/dL y/o Triglicéridos por encima de 150mg/dL (valores superiores al percentil 90).
- Apo B por encima de 120mg/dL

Fueron excluidos los pacientes con los siguientes criterios:

- Obesidad: IMC superior o igual a 30 kg/m². Según la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad.
- Diabetes mellitus: Glucemia basal mayor o igual a 126mg/dl al menos en dos ocasiones o mayor o igual a 200mg/dl tras sobrecarga oral de glucosa a los 120 minutos y HBA1c superior o igual a 6.5 %.
- Enfermedad hepática: Valores de transaminasas superiores a 2 desviaciones estándar.
- Enfermedad renal avanzada: Filtración glomerular inferior a 60 ml/min/1.73 m².
- Enfermedad tiroidea.
- Alcoholismo.
- Pacientes en tratamiento hipolipemiante.
- Enfermedad neoplásica.
- Presencia de xantomas.

El grupo control está constituido por 100 individuos genéticamente independientes, sin riesgo cardiovascular y sin antecedentes de ningún tipo, con valores de Apo B por debajo de 120mg/dL, CT inferior a 200mg/dL y niveles de TG por debajo de 150 mg/dL. El grupo control, seleccionado de la población general de la Comunidad Valenciana, estaba integrado por 53 hombres y 47 mujeres de edades comprendidas entre 18-75 años.

3. B Diseño del estudio

El estudio está basado en un diseño de casos-contrroles. Mediante este diseño se hace la comparación de dos grupos de personas: uno de ellos afectado por HFC (casos) y otro formado por personas que fueron reclutadas para estudio y no padecían la enfermedad (contrroles).

Todos los casos han sido diagnosticados antes del inicio del estudio.

3. C Métodos

3. C. 1 Medidas antropométricas

Los parámetros antropométricos medidos fueron los siguientes:

- Peso: en kilogramos (kg) en bascula romana.
- Talla: en metros (m).
- Índice de masa corporal (IMC): kg/m^2 .
- Circunferencia cintura y cadera (cm).

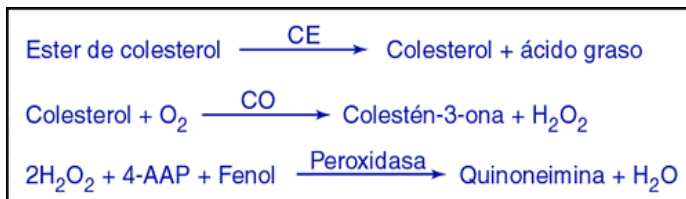
3. C. 2 Estudio bioquímico

El estudio bioquímico del metabolismo lipídico se realizó con sangre venosa. La extracción de sangre se realizó en ayunas de 12 horas; las muestras se centrifugaron inmediatamente a 3000 r.p.m. en centrífuga refrigerada a 4° C durante 10 minutos. Las

determinaciones que no se realizaron en el mismo día se guardaron congeladas a -80°C hasta su determinación.

Los parámetros se determinaron en el laboratorio de bioquímica del Hospital Dr. Peset siguiendo las siguientes metodologías:

- Colesterol Total (CT): Determinado por método enzimático colorimétrico por la enzima colesterol oxidasa a punto final en analizador Synchron LX20 Pro de Beckman Coulter¹²¹. El coeficiente de variación fue inferior a 3.5%. El analizador utiliza el método de medida a tiempo final. La reacción usa la hidrólisis de ésteres de colesterol por la colesteroleserasa para obtener colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre es oxidado por la colesterol oxidasa a colesteroleserasa y peróxido de hidrógeno. A continuación la peroxidasa cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con 4-aminoantipirina (4AAP) y fenol obteniendo un producto coloreado, la quinoniemia. El cambio de absorbancia a 520nm en un intervalo de tiempo fijo nos proporciona la concentración de colesterol.



S015196L.EPS

- La sensibilidad en la determinación fue de 5mg/dL y el coeficiente de variación intraensayo fue inferior al 3.5%.
- Triglicéridos (TG): Determinado por método enzimático colorimétrico a punto final a tiempo fijo en analizador Beckman LX20¹²².

Los triglicéridos en la muestra son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres por la acción de la lipasa. Una secuencia de tres pasos enzimáticos acoplados usando glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO), y peroxidasa de rábano picante (HPO) causa el acoplamiento oxidante del ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfónico (DHBS) con 4-aminoantipirina y forma un colorante rojo de quinoneimina.

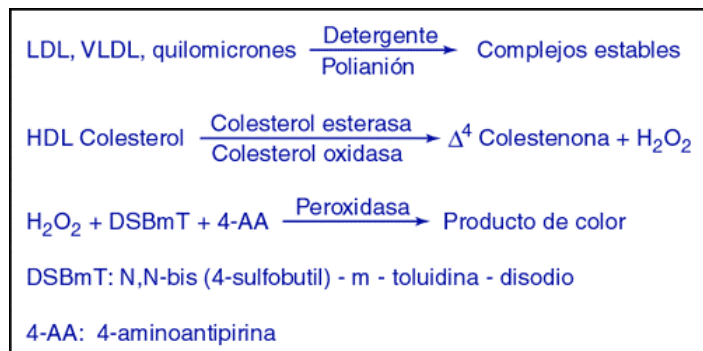
El sistema controla el cambio de absorbancia a 520 nm. El cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra.

La sensibilidad en la determinación de triglicéridos fue de 10mg/dL con un coeficiente de variación intraensayo de 6.3%.

- Colesterol HDL (cHDL): Determinación directa por método enzimático colorimétrico por enzimas

colesteroesterasa y colesterol oxidasa modificadas por polietilenglicol (PEG) y sulfato de α -ciclodextrina en analizador Beckman LX20¹²³. Es un método a punto final y tiempo fijo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 560nm. El cambio es directamente proporcional a la concentración de HDL de la muestra.

La sensibilidad del método fue de 5mg/dL con un coeficiente de variación intraensayo inferior al 3.2



S015231L.EPS

- Colesterol VLDL: Valor calculado a partir de la fórmula:

$$VLVL = TG/5$$

- Colesterol LDL (LDL): Valor calculado a partir de la fórmula de Friedewald's para valores inferiores a 300mg/dL de TG:

$$CLDL = CT - (HDL + VLDL)^{124}$$

- Colesterol no-HDL calculado:

$$c \text{ no-HDL} = CT - HDL$$

- Índice aterogénico del plasma (IAP): Valor calculado aplicando la fórmula siguiente:

$$IAP = \lg TG / cHDL$$

- Apolipoproteína A (Apo A-I): Determinado por inmunonefelometría en analizador Dade Behring BNII. El coeficiente de variación fue inferior al 5.5%. Constituye un método inmunoquímico en el cual se forma un inmunocomplejo entre la Apo A-I y un anticuerpo específico. El inmunocomplejo dispersa el haz de luz cuya intensidad es proporcional a la concentración de Apo A-I en la muestra. Se establece una curva de calibración con cinco puntos obtenidos de diluciones seriadas a partir de un suero patrón, que será utilizada por el sistema para proporcionar el valor de Apo A-I de la muestra. La sensibilidad de la muestra viene determinada

por el límite inferior de la curva de calibración. El coeficiente de variación intraensayo fue inferior al 6%.

- Apolipoproteína B (Apo B): Determinado por inmunonefelometría en analizador Dade Behring BNII. Es un método inmunoquímico en el que se va a formar un inmunocomplejo entre la Apo B100 y un anticuerpo específico. El inmunocomplejo dispersa el haz de luz cuya intensidad será proporcional a la concentración de Apo B100. Al igual que con la Apo A se establece una curva de calibración de cinco puntos que será utilizada por el sistema para proporcionar el valor de Apo B de la muestra.

La sensibilidad de la muestra viene determinada por el límite inferior de la curva de calibración. El coeficiente de variación intraensayo fue inferior al 6%.

- Lipoproteína a (Lp(a)): La determinación se realizó mediante enzimoanálisis en analizador Biochem Personal Lab Junior. Es un ELISA de captura de un paso. Los pocillos de ELISA están recubiertos con anticuerpos anti-apo(a) específicos. En un primer paso se incuban junto a un conjugado anti-apo(a). Durante el tiempo de incubación, las partículas Lp(a) son marcadas por el conjugado.

Los componentes de suero no específico y el conjugado no unido se eliminan mediante el lavado. En un segundo paso de incubación se produce la reacción enzimática dando un producto coloreado. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de Lp(a) en la muestra. La densidad óptica se midió a 450nm.

3. C. 3 Determinación patrón B de las LDL

El fenotipo B de las partículas LDL fue medido por electroforesis, utilizando gel en gradiente de poliacrilamida del 2 al 16% según método descrito por Nichols y cols.^{125,126}.

La asignación del fenotipo de la subclase de LDL está basada en la medida del diámetro de la partícula; así, obtenemos dos patrones diferentes: Patrón A, cuando el diámetro es mayor de 25.5nm, y Patrón B, con predominio de partículas pequeñas y densas con un diámetro menor o igual a 25.5nm¹²⁷.

Las muestras fueron marcadas con una solución de etilenglicol y Negro Sudán al 0.1%. Buffer: Tris (0.09M), ácido bórico (0.08M), EDTANa₂ (0.003M) y pH 8.3. La electroforesis se llevó a cabo refrigerada (4-8°C) con una preelectroforesis de 1 hora a 120 V, seguida de electroforesis 30 minutos a 20 V, 30 minutos a 70 V y 12.5 horas a 90-100 V.

Se utilizaron como estándares sueros con fracciones de diámetros de LDL conocidos de 28.67nm, 26.98nm 26.35nm y 24.19nm para establecer una recta de calibración. Se escanearon los geles y se midieron las distancias recorridas por las diferentes bandas (Rf o índice de migración), desde el punto de salida hasta la banda más prominente. Con las muestras control se calculó la recta de regresión y en ella se extrapolaron las muestras. El coeficiente de variación intraensayo fue inferior al 1%.

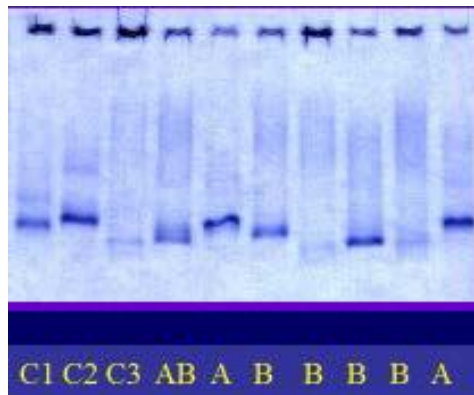


Figura 15. Ejemplo de gel en gradiente de poliacrilamida 2-16%. Patrón A: predominio de lipoproteínas de baja densidad, LDL grandes ($>25,5\text{nm}$). Patrón B: predominio de LDL pequeñas y densas ($\leq 25,5\text{nm}$). C: Controles con bandas de tamaño conocido.

3. C. 4 Determinación subfracciones de HDL

Las subfracciones de HDL fueron separadas utilizando el sistema Lipoprint Quantimetrix®¹²⁸. Este método consiste en una electroforesis en gel de poliacrilamida de alta resolución (específico para HDL) con un gradiente fijo al 3% dispuesto en un

tubo de cristal. Brevemente, se mezclaron 25 µl de suero en la parte superior del tubo de gel junto a 200µl o 300 µl de un gel de carga, que contiene negro Sudán B para marcar las lipoproteínas. Una vez polimerizada la mezcla durante 30 minutos mediante una lámpara fluorescente, los tubos se colocan en una cámara electroforética que se sometió a una corriente eléctrica -3mA por el tubo de gel durante 55-60 minutos. El tampón usado es trisaminometano y ácido bórico, con pH de 8.2-8.6. Una vez realizada la electroforesis y separadas las bandas se lleva a cabo una densitometría a 610nm, y los datos son exportados y analizados por un programa informático desarrollado para el sistema Lipoprint Quantimetrix y el programa de imagen NIH versión 1,62. Como control de calidad se utilizó el Liposure® (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, EE.UU).

El informe generado presenta el perfil de distribución de las lipoproteínas junto a los porcentajes de áreas y colesterol que contiene cada fracción. Este sistema permite cuantificar hasta 10 subfracciones distintas de HDL: grandes HDL1-3, intermedias HDL 4-7 y pequeñas HDL 8-10

3. C. 5 Obtención de ADN genómico

Se necesitan al menos 15 ml de sangre total (tubo con EDTA-tripotásico) la cual puede permanecer almacenada como máximo 24 horas a temperatura ambiente.

Para obtener los leucocitos se realizó la lisis de los eritrocitos mediante un choque osmótico, para ello se centrifugó a 465g (2000 rpm) durante 20 minutos y con fuerza de desaceleración mínima. El sobrenadante obtenido, correspondiente al suero, se eliminó y la interfase que contenía las células blancas se colocó en un tubo de 50mL en el cual se continuó la purificación. Los glóbulos rojos fueron lisados añadiendo 15mL de Tampón de lisis 1 compuesto por 0,9% NaCl y 0,1% nonidet P-40 agitando fuertemente durante 2 minutos hasta disgregar la masa celular. Tras esta agitación inicial se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se agitó nuevamente durante 1 minuto. Las muestras se centrifugaron durante 40 minutos a 1500g a temperatura ambiente con fuerza de desaceleración intermedia. El sobrenadante se eliminó por decantación y el precipitado se lavó en 30mL de tampón de lisis mediante una agitación enérgica durante 2 minutos tras lo cual se centrifugó nuevamente. Después se realizó otro lavado en idénticas condiciones, tras este paso los leucocitos aislados se guardaron a -20 °C si su procesamiento iba a ser inmediato o bien a -80°C para procesamiento posterior.

Una vez obtenidos los leucocitos, estos deben ser lisados para obtener su ADN.

El precipitado de células blancas obtenido se lisó vorteadando fuertemente durante 1min. Tras la lisis se añadió 0,8mg de proteinasa K en 3,5mL de solución NLB (400mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8,2 y 0,2%SDS) y se incubó 12 horas a 37°C. Posteriormente, se añadió 0,4mg de proteinasa K y se incubó a

50°C durante 1 hora 30 minutos. A continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 1270µl de acetato amónico 7,5M a 4°C para precipitar las proteínas. Tras una incubación de 10 minutos a 4°C se centrifugó 60 minutos a 4000 rpm a 4°C con baja fuerza de desaceleración. El sobrenadante se decantó en un tubo de 50mL limpio donde se precipitó el ADN añadiendo 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C (generalmente 12,5mL de etanol a 5mL de sobrenadante). El ADN precipitado se recuperó mediante una pipeta de vidrio con la punta doblada a la llama, se lavó con etanol al 70% y se dejó secar al aire. Una vez seco, el ADN se resuspende en 500µl de agua libre de DNAasas calidad superior.

Cuantificación y determinación de la calidad de ADN

Se basa en la medición espectrofotométrica de la cantidad de radiación UV absorbida por las bases nucleotídicas. Se tomaron lecturas a 260nm y 280nm en un Biofotómetro (Eppendorff). A 260nm se calculó la concentración de ácidos nucleicos y a 280nm la de proteínas. La pureza se determinó por la razón entre las lecturas a 260nm y 280nm (DO_{260}/DO_{280}).

Se obtuvo la concentración de ADN mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] = (\text{Fd cubeta}) \times (50\text{ng}/\mu\text{l}) / \text{DO}_{260\text{nm}}$$

Fd= Factor de dilución= Volumen de la cubeta / Cantidad de ADN cuantificar.

El ADN se conserva a -20°C.

La verificación del grado de fragmentación del ADN se determinó por electroforesis en agarosa al 0.6% a 120V durante 2 horas. Una banda nítida en el gel indica pureza e integridad adecuada para la amplificación por PCR. La presencia de un barrido sugiere una contaminación por sales y la aparición de múltiples bandas es señal de degradación del ADN. No se consideró ningún ADN que tuviera estas características.

3. C. 6 Amplificación del ADN

El ADN se amplificó por PCR de forma que se amplificaran específicamente los fragmentos correspondientes a los polimorfismos: Asn291Ser Asp9Asn Gly5188Glu y T93G del promotor, de la LPL, promotor C514T de LH y genotipo Apo E. Los oligonucleótidos se diseñaron mediante el programa Primer 3 ([http:// bioinfo.ut.ee/primer3](http://bioinfo.ut.ee/primer3)). El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción: Rsal, Taql, Avall, Apal, NlaIII y HhaI respectivamente. La visualización de los fragmentos de ADN digeridos se realizó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida y la visualización de las diferentes bandas se llevo a cabo mediante revelado por tinción de plata.

3. C. 7 Análisis de polimorfismos LPL y LH

El análisis de los polimorfismos T93G , Asp9Asn, Gly5188Glu, Asn291Ser de la LPL y C514T de la LH se llevo a cabo mediante

amplificación por PCR, seguido de digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de poliacrilamida que permite visualizar los fragmentos y saber así, si una muestra presenta o no un determinado polimorfismo

Se identifican 4 RFLPs, uno en el promotor y 3 en diferentes exones en el gen de la LPL:

- **Asn291Ser** (N291S) situado en el exón 6. La identificación se realiza por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento constituido por 238 pares de bases (pb) usando oligonucleótidos (primer) suministrados por Sigma Genomys: A (5' GCCGAGATACAATCTTGGTG 3') y oligonucleótido B (5' CTGCTTC TTTTGGCTCTGACTGT 3'). El polimorfismo tiene un sitio de restricción y el enzima utilizado para la digestión es la RSA I de MBI Fermentas.

La PCR se lleva a cabo con un volumen final de 25µl conteniendo 0.3mM de cada primer, 0.2mM por cada desoxinucleotido trifosfato (dNTPs), 1x Taq buffer, 2mM MgCl₂, 100ng de ADN genómico y 2.5U de Taq polimerasa de Netzyme en un termociclador Master-Cycler de Eppendorff. La PCR se realiza siguiendo un protocolo¹²⁹ bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización inicial durante 10 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 45 segundos a 72°C. Esto fue seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C menos

0.5°C en cada ciclo y 45 segundos a 72°C, y luego 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 45 segundos a 72°C. La extensión final consistió en 10 minutos a 72°C. El producto de amplificación fue digerido con el enzima de restricción RSAI según el programa siguiente: volumen final de 20µl conteniendo 10µl de ADN amplificado, 2µl buffer, 0.5µl de enzima RSAI y 7.5µl de agua, en termociclador durante 4 horas a 37°C. El producto de la digestión se analizó en poliacrilamida al 8% a 120V durante 2 horas. El Tampón de carga que se uso fue: 25mg de bromophenol blue, 25mg de xileno, 3ml de glicerol y agua destilada hasta 10ml. Se cargo 6µl de producto de digestión y 2µl de tampón de carga. Como marcador de peso molecular se utilizó X174 DNA/BsuRI (HaeIII) (Fermentas).

Tras la electroforesis las distintas bandas se visualizaron mediante revelado por tinción de plata que se realizó siguiendo los siguientes pasos: (1) Se fijó el gel 10 minutos en etanol al 10% y se lavó con agua destilada (2) Se incubó durante 3min en ácido nítrico al 65% para realizar la oxidación y se lavó con agua destilada (3) Posteriormente se incubó con 12mM (2,02g/L) de nitrato de plata durante 20min (4) Tras este paso se eliminó la plata y se lavó con agua destilada dos veces. (5) Posteriormente se añadió el revelador [29,6g/L Na₂CO₃ y 540µl/L formaldehído] agitando rápidamente y eliminando el revelador (6) Una vez eliminado el revelador oscurecido se añadió revelador

nuevo agitando suavemente hasta la visualización de las bandas (7) Como último paso, la reacción se detuvo incubando con ácido acético no glacial al 10% durante 5 minutos.

- **Asp9Asn** (DN9), situado en el exón 2. Se amplifica mediante la reacción (PCR) un fragmento constituido por 237 pb usando oligonucleótido A (5'CTCCAGTTAACCTCATATCC 3') y oligonucleótido B (5'CACCACCCCAATCCACTA 3') de Sigma Genomys. El programa de PCR es el mismo que para el polimorfismo N291S. El producto de amplificación es digerido con la enzima de restricción TaqI según el programa siguiente: volumen final de 15µl conteniendo 5µl de ADN amplificado, 1.5µl buffer, 0.1µl de enzima TaqI y 7.5µl de agua, en termociclador durante 4 horas a 65°C. El producto de la digestión fue analizado en poliacrilamida al 10% a 100V durante 90 minutos. La visualización de las bandas se realiza mediante revelado con tinción de plata siguiendo el protocolo anterior.

- **Gly188Glu**, situada en el exón 5. Se amplificó mediante PCR un fragmento constituido por 284 pb que incluye parte de los intrones; los primer utilizados fueron A (5'TGTTCCCTGCTTTTTTCCCTT'3) y B (5'TAATTCGCTTCTAAATAATA 3') de Sigma Genomys. Se empleó el programa descrito anteriormente. El producto de amplificación fue digerido con el enzima de restricción

Avall (MBI Fermentas) siguiendo el mismo protocolo que para Asn291Ser. El producto de la digestión se analizó en poliacrilamida al 10% a 90V durante 90 minutos. La visualización de las bandas se realiza mediante revelado con tinción de plata.

- **T93G**, variante situada en el promotor. Se amplificó mediante PCR de un fragmento constituido por 624pb. Los oligonucleótidos utilizados fueron A(5'GCTGATCCATCTTGCCAATGTTTA3') y B(5'CCGCGGTTTGGCGC TGAGCAAG3') de Sigma Genomys y usamos el mismo programa de PCR que para los polimorfismos anteriores. Al producto amplificado se le realiza la digestión con el enzima de restricción Apal (MBI Fermentas) utilizando el programa descrito anteriormente. El producto de la digestión se analiza en gel de poliacrilamida al 10% a 100V durante 2 horas. La visualización de las bandas se realiza mediante revelado con tinción de plata.

Se identificó un polimorfismo en el gen de la **LH**:

- Variante situada en el promotor **C514T**. Se amplificó mediante PCR de un fragmento constituido por 300pb. Los oligonucleótidos que se usaron para ello fueron A(5'AAGAAGTGTGTTTACTCTAGGATCA3') y B(5'GGTGGCTTCCACGT GGCTGCCTAAG3') de Sigma Genomys, el programa de PCR usado es el mismo que

para los polimorfismos de la LPL. Al amplificado se le realiza la digestión con el enzima NlaIII según el programa siguiente: volumen final de 20µl conteniendo 10µl de ADN amplificado, 2µl buffer, 0.2µl de enzima NlaIII y 7.8µl de agua, en termociclador a 37°C durante toda la noche. El producto de la digestión se analizó en gel de poliacrilamida al 10% a 120V durante 2 horas. Para la visualización de las bandas se llevó a cabo mediante tinción de plata

3. C. 8 Determinación del genotipo Apo E

Es un gen polimórfico con tres alelos codominantes E2, E3 y E4 situados en el exón 4. Para realizar la determinación del genotipo de la Apo E se llevó a cabo una amplificación mediante PCR de un fragmento de 244 pb del ADN. Los oligonucleótidos fueron suministrados por Sigma Genomys A(5´ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC3´) y B(5´TAAGCTTGGCACGGCT GTCCAAGGA3´). El enzima de restricción que se utilizó para realizar la digestión fue HhaI de MBI Fermentas.

La PCR se lleva a cabo con un volumen final de 25µl conteniendo 0.3mM de cada primer, 0.3mM de cada desoxinucleotido trifosfato (dNTPs), 1x Taq buffer, 2mM MgCl₂, 100ng de ADN genómico y 2.5U de Taq polimerasa de Netzyme en un termociclador Master-Cycler de Eppendorf Scientific. La PCR se realizó siguiendo un protocolo bajo las siguientes condiciones¹³⁰: un paso de desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95°C, seguido de 40

ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 64°C y 35 segundos a 72° para elongación y la extensión final que consiste en 5 minutos a 72°C. Al producto de la amplificación se le realizó una digestión con el enzima HhaI según el programa siguiente: volumen final de 20µl conteniendo 10µl de ADN amplificado, 2µl buffer, 0.5µl de enzima de restricción HhaI y 7.5µl de agua, en termociclador durante 16 horas a 37°C. El producto de la digestión se analizó en poliacrilamida al 10% 120V 2 horas. La visualización de las bandas se llevó a cabo mediante tinción de plata.

3. C. 9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó sobre 93 pacientes afectados de HFC pertenecientes a 33 familias y 100 controles sanos que procedían de la Comunidad Valenciana.

Las variables cuantitativas han sido expresadas en media y desviación estándar y las cualitativas en porcentajes. Se ha aplicado el test de Kolmogorov-Smirnov a los datos para determinar si la distribución de las variables era normal. Con ello se vio que todas las variables seguían una distribución normal excepto los triglicéridos.

La comparación de las variables cuantitativas entre grupos fue realizada usando un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de una prueba t paramétrica (t-Student). Debido a la distribución sesgada de los triglicéridos, estos fueron analizados sobre valores logarítmicos previamente transformados con U-Mann-Whitney. La

prueba no paramétrica U-Mann-Whitney también se ha usado para comparar concentraciones de lípidos en pacientes con HFC frente a patrón A y patrón B de las LDL. Para determinar las correlaciones entre las variables utilizamos el coeficiente de correlación de Pearson y el de Spearman. Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el Paquete de Análisis de Datos de Microsoft Excel (Microsoft, S.A.). Consideramos un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

HWE program X^2 fue realizada para verificar el equilibrio Hardy-Weinberg. También se utilizó la X^2 para comparar los patrones diferentes de las LDL.

Calculo de tamaño muestral:

Para el cálculo del tamaño muestral se realizó un estudio de varios de nuestros parámetros lipídicos (triglicéridos, colesterol, Apo B y diámetro de las LDL pequeñas y densas) y los que necesitaron de una mayor "n" fueron el diámetro de las LDL pequeñas y densas y de la Apo B.

Así pudimos ver que la desviación estándar del diámetro de las LDL pequeñas y densas entre los grupos control y la de pacientes analizados fue de 0,7nm, y para encontrar diferencias significativas entre el grupo control y el de enfermos la diferencia entre los valores medios de ambas variables debía ser de 0,9 nm. Aceptando un riesgo de 0,05 y si se desea obtener una potencia

estadística del 100 % para detectar diferencias, el tamaño muestral debería ser de 75 pacientes para encontrar diferencias.

A su vez para la Apo B la desviación estándar entre los grupos control y la de pacientes analizados es de 24 mg/dl, y para encontrar diferencias significativas entre el grupo control y el de enfermos la diferencia entre los valores medios de ambas variables debe ser de 46 mg/dl. Aceptando un riesgo de 0,05 y si se desea una potencia estadística del 100% para detectar diferencias, el tamaño muestral debería ser también de 75 pacientes para encontrar diferencias.

Análisis estadístico fue realizado usando el programa SSPS-15.0 para Ventanas (SPSS la S.A, Chicago, IL).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4. A Parámetros generales

Comparamos 93 pacientes pertenecientes a 33 familias, diagnosticados de HFC frente a 100 controles. Los pacientes de HFC están constituidos por 43 hombres y 50 mujeres con una media de edad de 37 años, mientras que los controles lo formaban 53 hombres y 47 mujeres con una media de edad de 41 años (Tabla 6).

No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a edad e IMC y tampoco existieron diferencias estadísticamente significativa entre grupos de hombres y mujeres.

Tabla 6. Sujetos de 33 familias afectados de HFC y controles

	PACIENTES HFC	CONTROLES	P
HOMBRES	43 (46,3%)	53(53%)	NS
MUJERES	50 (53,7%)	47(47%)	NS
EDAD	37.46 ± 16.85	41.67 ± 13.43	NS
IMC	27.35 ± 3,87	26.66 ± 3.67	NS

Valores expresados como media ± desviación estándar

4. B Parámetros lipídicos

Se llevó a cabo el estudio del perfil lipídico de 93 pacientes de HFC y 100 controles. Los resultados del metabolismo lipídico mostraron diferencias significativas entre los pacientes de HFC y los controles en todos los parámetros estudiados (Tabla 7). Así, los pacientes de HFC presentaron niveles elevados de colesterol total, triglicéridos, cLDL, colesterol no-HDL y Apo B100, así como niveles disminuidos de cHDL, de Apo A y un diámetro menor de las partículas LDL comparados con los controles (Figura 16-17).

Tabla 7: Concentración de lípidos entre pacientes con HFC y controles

	PACIENTES HFC	CONTROLES	p*
N	93	100	
CT (mg/dL)	238.67 ± 50.10	185.13 ± 28.30	<0.001
TG (mg/dL)	204,71 ± 192,16	88.27 ± 42.45	<0.001
cLDL (mg/dL)	156,85 ± 39.97	113.50 ± 25.20	<0.001
cHDL (mg/dL)	47.77 ± 17.18	53.93 ± 14.48	<0.001
cVLDL (mg/dL)	40.28 ± 36.52	17.65 ± 8.49	<0,001
c no-HDL (mg/dL)	192.94 ± 53.12	131.50 ± 29.09	<0.001
Índice Aterogénico del Plasma	0,05 ± 0,50	0,03 ± 0,36	<0.001
APO A (mg/dL)	133.55 ± 35.52	152.79 ± 29.03	<0.001
APO B (mg/dL)	125.80 ± 28.41	95.25 ± 21.15	<0.001
Diámetro-LDL (nm)	25.45 ± 0.78	26.14 ± 0.74	<0.001

* ANOVA Test

Los valores se expresan en media ± desviación estándar

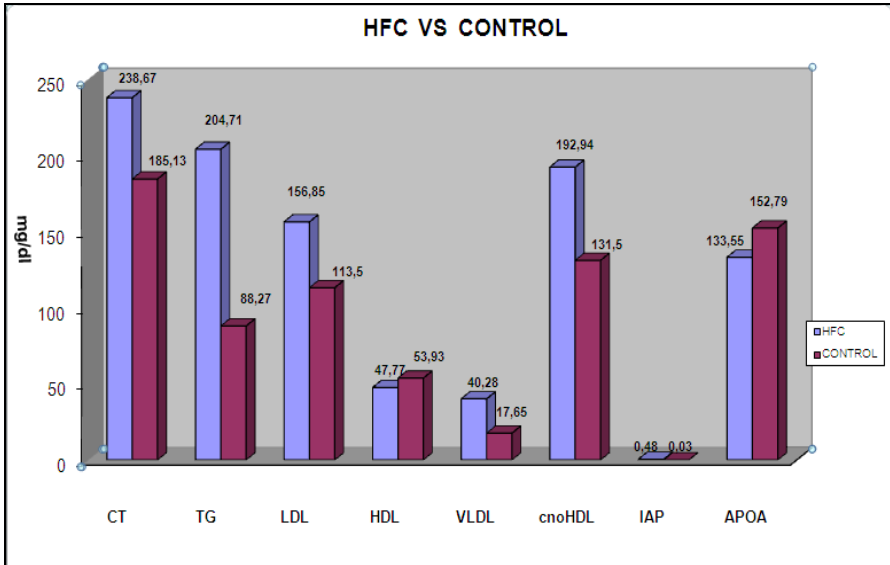


Figura 16. Relación de los valores lipídicos de pacientes con HFC frente a controles. Todas significativas con $p < 0.05$

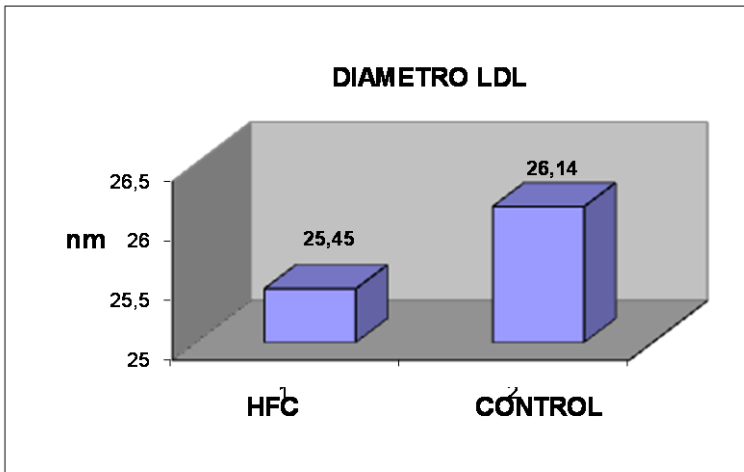


Figura 17. Relación del diámetro de las LDL entre pacientes HFC y controles. $P < 0.05$

Subfracciones de HDL en pacientes con HFC

Al observar la relevancia que están tomando y el valor que parecen tener como factor de riesgo cardiovascular, se estudió un subgrupo de pacientes de HFC para determinar si podía existir relación entre el tamaño de de las HDL y la HFC. Se seleccionaron 35 pacientes de HFC de los cuales 16 son hombres y 19 mujeres y lo comparamos con 60 controles, 28 hombres y 32 mujeres para determinar las subfracciones de HDL y ver como se distribuyen en los pacientes de HFC y controles. La diez subfracciones de las HDL se clasificaron en tres grupos: las HDL grandes que están formadas por HDL-1, HDL-2 y HDL- 3, las HDL intermedias que las forman las HDL-4, HDL-5 HDL-6 y HDL-7 y por último las HDL pequeñas constituidas por HDL-8, HDL-9 y HDL-10 Tabla 8.

Se observó que las partículas HDL pequeñas constituían un 24.04% del total de las HDL en los pacientes de HFC, mientras que en los controles el porcentaje era significativamente menor, un 16.52%. Con las HDL grandes ocurría todo lo contrario estaban en un porcentaje mayor, 35.35%, en los controles frente al 28,9% que se encontró en los pacientes HFC, diferencia esta estadísticamente significativa (Tabla 8).

Tabla 8. Subfracciones HDL en controles y pacientes HFC p<0.05

	CONTROL%	HFC%	P
HDL grandes	35.33 ± 8.38	28.9 ± 9,87	0.024
HDL Intermedias	48.14 ± 8,46	46.97 ± 4,03	0.27
HDL pequeñas	16.52 ± 7,37	24.04 ± 6,64	7.40E-06

4. C Fenotipos lipídicos

Se analizaron los diferentes fenotipos lipídicos para determinar si podía haber diferencias entre ellos y si estas son significativas como pueden afectar a los pacientes de HFC. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura 18. Se observó un predominio del fenotipo IIa en un 45.6% de los pacientes el cual se caracteriza por tener CT mayor de 200mg/dL y LDL elevadas. Un 35,9% de los pacientes presentaron un fenotipo IIb caracterizado por tener CT mayor de 200mg/dL y TG mayor de 150mg/dL en estos pacientes existe un aumento de las LDL mientras el 18,5% restante presentaba el fenotipo IV caracterizado por CT menor de 200mg/dL y TG mayor de 150mg/dL en los que se da un aumento de las VLDL (Figura 18).

FENOTIPO HFC

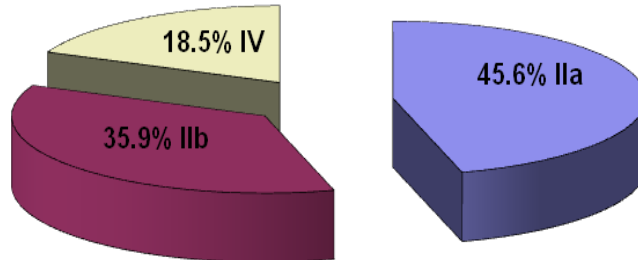


Figura 18. Porcentaje de los diferentes fenotipos de HFC

4. D Análisis de los polimorfismos

4. D. 1 Polimorfismos

Se determinaron en gel de poliacrilamida los diferentes polimorfismos situados en el promotor, exón 2, 5 y 6 del gen de la LPL, polimorfismo situado en el promotor de la LH, así como las diferentes isoformas de Apo E. Se utilizaron las enzimas de restricción Apal, Avall, RSal, NlaIII y HhaI que generan nuevos puntos de restricción, y la TaqI para el polimorfismo del exón 2 que lo destruye. Se analizaron estos polimorfismos en los pacientes de HFC y controles.

Polimorfismos LPL

En el producto de la digestión analizado para el polimorfismo del promotor de la LPL T(-93)G, se observaron tres fragmentos para el alelo mutado ya que esta mutación genera un nuevo punto de restricción. Los fragmentos son de aproximadamente 286, 195 y 143 pb, y dos fragmentos de 286 y 338 pb para el alelo normal.

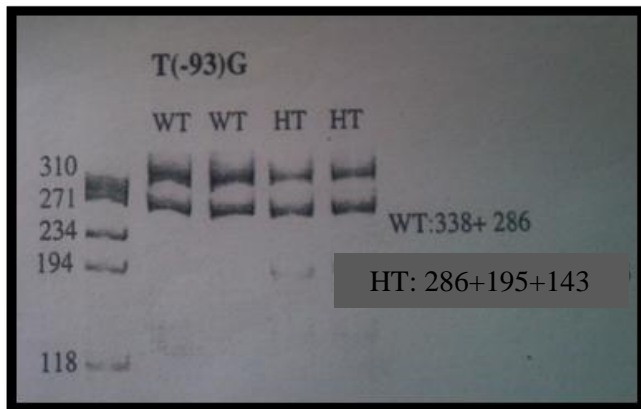


Figura 19: Análisis del polimorfismo T(-93)G del promotor de LPL, mediante amplificación por PCR, digestión con enzima de restricción Apal, electroforesis en poliacrilamida al 6% y visualización por nitrato de plata. HT: Mutado, WT: Silvestre

En el producto de la digestión analizado para el polimorfismo Asp9Asn se produce la supresión de un sitio de restricción dando como resultado un fragmento variante de 58pb para el mutado mayor que el fragmento de 52 pb del silvestre debido a que se destruye un punto de restricción.

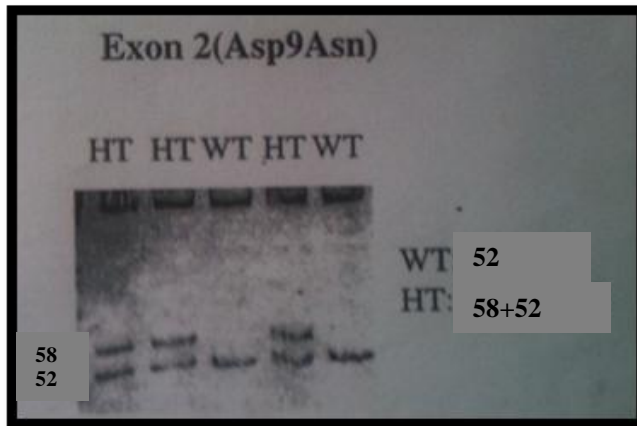


Figura 20. Análisis del polimorfismo Asp9Asn del gen LPL, mediante amplificación por PCR.
HT: Mutado, WT: Silvestre

En el producto de la digestión para el polimorfismo del exón 5, Gly188Glu, analizado, se observaron tres fragmentos para el alelo mutado de aproximadamente 156, 88 y 40 pb, por generarse un nuevo punto de restricción y dos fragmentos de 244 y 40 pb para el alelo normal. De esta mutación no se encontró ninguna en nuestro estudio.

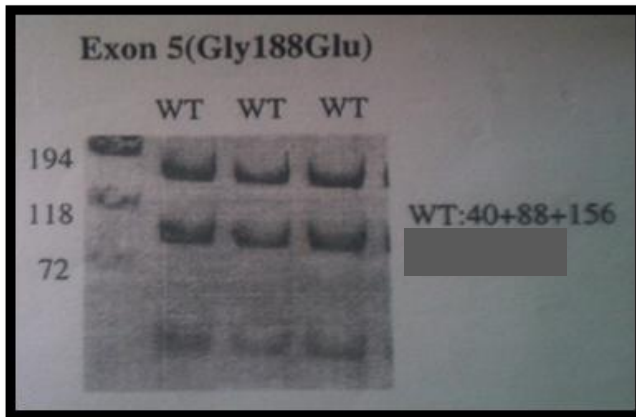


Figura 21. Análisis del polimorfismo Gly188Glu del gen LPL, mediante amplificación por PCR.

HT: Mutado, WT: Silvestre

En el producto de la digestión para Asn291Ser del exón 6 de la LPL analizado, se observaron dos fragmentos al generarse un nuevo punto de restricción para el alelo mutado de aproximadamente 215 y 23 pb, y un fragmento de 238pb para el alelo normal

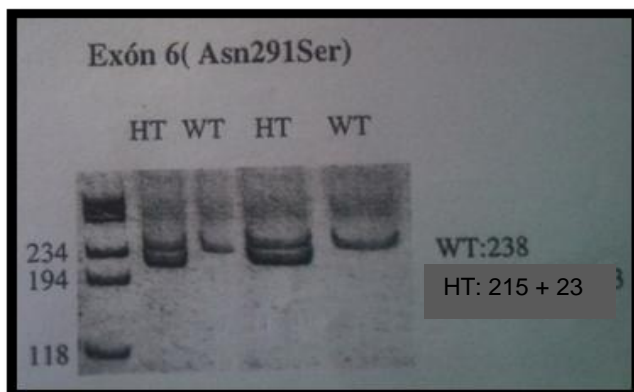


Figura 22. Análisis del polimorfismo Asn291Ser del gen LPL, mediante amplificación por PCR.

HT: Mutado, WT: Silvestre

Polimorfismo LH

En el producto de la digestión analizado en el promotor de la LH, se observaron dos fragmentos para el alelo mutado, de aproximadamente 215 y 85 pb, ya que se generó un nuevo punto de restricción y un solo fragmento de 300 pb aproximadamente para el alelo normal.

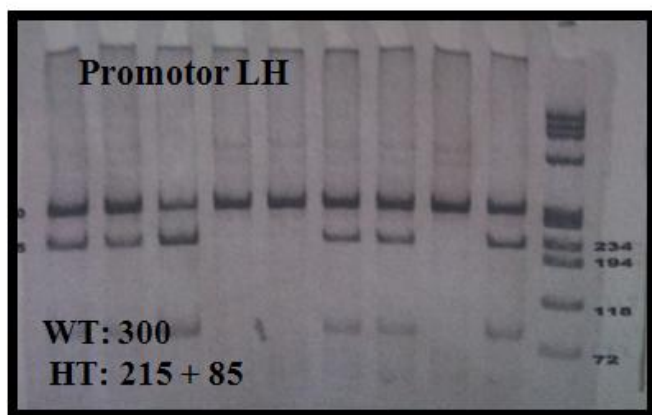


Figura 23. Análisis del polimorfismo C514T del promotor de LH, mediante amplificación por PCR, digestión con enzima de restricción NlaIII, electroforesis en poliacrilamida al 6% y visualización por nitrato de plata.

HT: Mutado, WT: Silvestre

Tras el análisis de los diferentes polimorfismos estudiados en los pacientes de HFC de la Comunidad Valenciana se realizó la comparación de estos con los datos publicados en otras comunidades principalmente del norte de Europa (Tabla 9).

El polimorfismo N291S del exón 6 de la LPL en los pacientes con HFC de la Comunidad Valenciana se presentó en un mayor porcentaje que los estudiados en grupos de otras poblaciones. En el polimorfismo del exón 2 no se vieron diferencias, del resto no se encontraron referencias.

Tabla 9. Polimorfismos en pacientes HFC:

	WT	HT	% HT	% HT EN HFC PUBLICADO
EXON 2 (D9N) LPL	85	5	5.5	4-5%
EXON 5 (Gly188Glu) LPL	93	0	0	
EXON 6 (N291S) LPL	82	9	9.7	2-5%
PROMOTOR (-T93G) LPL	84	8	8.7	
PROMOTOR (C514T) LH	62	31	33.3	

WT= silvestre o no mutados

HT: Heterocigotos mutados

Tras llevar a cabo el análisis de la distribución de los distintos polimorfismos estudiados en los pacientes con HFC, se realizó el mismo análisis con población general de la Comunidad Valenciana. Se observó que en el polimorfismo del exón 6 no apareció ninguna mutación frente al 9,7% que se observó en los pacientes de HFC (Tabla10).

Tabla10. Polimorfismos en población general

	WT	HT	% HT
EXON 2 (D9N) LPL	95	5	5
EXON 5 (Gly188Glu) LPL	60	0	0
EXON 6 (N291S) LPL	100	0	0
PROMOTO (-T93G) LPL	83	2	2.4
PROMOTOR (C514T) LH	78	22	22

Tras llevar a cabo el análisis de la distribución de los distintos polimorfismos estudiados en los pacientes con HFC, se realizó lo comparación entre los pacientes de HFC que tenían alguna mutación y los mutados que aparecían en la población general para determinar si existen diferencias significativas entre ambas y que pudieran afectar a los diferentes fenotipos que pueden presentar los pacientes con HFC (Tabla 11).

Tabla11. HT pacientes HFC y población general

	HT% HFC	HT% POBLACION GENERAL	P
EXON 2 (D9N) LPL	5.5	5	NS
EXON 5 (Gly188Glu) LPL	0	0	NS
EXON 6 (N291S) LPL	9.7	0	<0.05
PROMOTOR (-T93G) LPL	8.7	2.4	<0.05
PROMOTOR (C514T) LH	33.3	22	NS

χ^2 p<0.05

Se observaron diferencias significativas en el exón 6 para la mutación Asn291Ser y el promotor -T93 de la LPL con respecto a la población general, lo que se relaciona con el aumento en los TG que se ha encontrado en estos pacientes y que están de acuerdo con la mayoría de los estudios publicados. En el resto no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

4. D. 2 Equilibrio Hardy-Weinberg

En genética de poblaciones, el principio de Hardy-Weinberg (también equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) o ley de Hardy-Weinberg, que recibe su nombre de G. H. Hardy y Wilhelm Weinberg, establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación. Es un modelo teórico para genética de poblaciones que se basa en las siguientes hipótesis:

1. La población es panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar, (panmixia).
2. La población es suficientemente grande (para minimizar las diferencias existentes entre los individuos).
3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos).
4. Las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.¹³¹

Utilizamos el programa "HWE program". Este es un programa interactivo para pruebas de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en sistemas codominantes. Pide el número de

alelos y genotipos observados. Los genotipos deben ser nombrados en el orden, 1/1 1/2, 2/2, 1/3, 2/3, 3/3, 1/4 y así sucesivamente. El programa compara números observados de genotipos con el número de genotipos esperados bajo HWE, donde estos últimos se calculan en base a frecuencias alélicas de las frecuencias genotípicas (hipótesis nula H0). Para los números observados, las frecuencias de celda relativa son las estimaciones de las probabilidades de genotipo (hipótesis alternativa, H1). Para la comparación entre números observadas y esperadas de genotipos, se realiza por Chi cuadrado de ratio de verosimilitud. Si n es el número de alelos, el número de parámetros estimados bajo H0 y H1 es $n - 1$ y $n(n - 1)/2 - 1$, respectivamente. Así, el número de df para la prueba de Chi-cuadrado es $n(n - 1)/2$ ¹³².

Realizamos una χ^2 para comprobar que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg usando el programa Eq-H-W. Así tenemos que al cabo de una generación las frecuencias alélicas y genotípicas no varían.

En las tablas siguientes vemos los resultados obtenidos para determinar si las poblaciones se encuentran en equilibrio. La realizamos de los pacientes y la población general para los exones 2, 5 y 6 y del promotor de la LPL y promotor de la LH.

Tabla 12: Equilibrio H-W para LPL

	GENOTIPO	LPL							
		EXON2		EXON5		EXON6		PROMOTOR	
		N	%	n	%	N	%	N	%
PACIENTE	WT	78	95	82	100	74	90	75	91
	HETEROC	4	5	0	0	8	10	7	9
	HOMOCI	0	0	0	0	0	0	0	0
	ALELO MUTADO	4	5	0	0	8	10	7	9
POBL.GENER.	WT	95	95			100	100	83	98
	HETER.	5	5			0	0	2	2
	HOMOC.	0	0			0	0	0	0
	ALELO MUTADO	5	5			0	0	2	2
χ^2 (df=1)PACIENTE		$\chi^2=0,051$ 2p=0,8268		$\chi^2=0$ 2p=1		$\chi^2=0,216$ 2p=0,6423		$\chi^2=0,163$ 2p=0,6864	
χ^2 (df=1) P.GENERAL		$\chi^2=0,066$ 2P=0,797				$\chi^2=0$ 2p= 1		$\chi^2=0,012$ 2p=0,9125	

$p > 0.05$ no existen diferencias

$p < 0.05$ existen diferencias

Tabla 13: Equilibrio H-W para LH

		LH	
		PROMOTOR	
	GENOTIPO	n	%
PACIENTE	WT	51	62
	HETEROC	31	38
	HOMOCI	0	0
	ALELO MUTADO	31	38
POBL.GENER.	WT	39	65
	HETER.	21	35
	HOMOC.	0	0
	ALELO MUTADO	21	35
χ^2 (df=1)PACIENTE		$\chi^2=4,45$ 2p=0,034	
χ^2 (df=1) P.GENERAL		$\chi^2=2,70$ 2p=0,100	

p>0.05 no existen diferencias

p<0.05 existen diferencias

La composición genética de poblaciones tanto pacientes de HFC como población general se encuentran en equilibrio HW.

4. E Genotipo Apo E

El gen polimórfico de la Apo E consta de tres alelos codominantes E2, E3 y E4 da lugar a seis posibles genotipos E2/E2, E3/E3, E4/E4, E2/E3, E2/E4 y E3/E4 con un patrón determinado tras la digestión que quedan reflejados en la Figura 24.

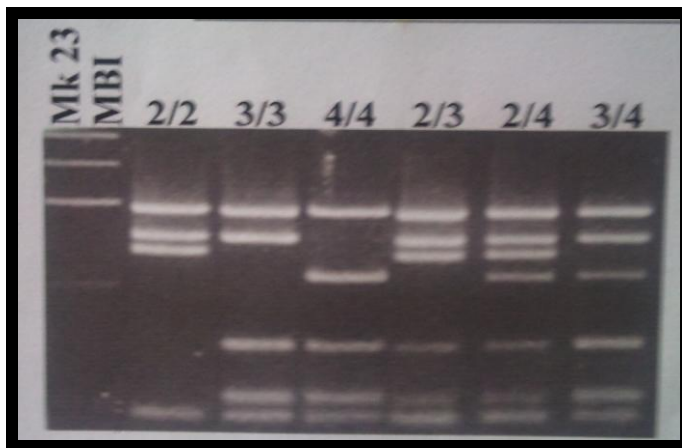


Figura 24. Determinación de los diferentes genotipos mediante separación por electroforesis de los fragmentos obtenidos tras digestión con enzima de restricción HhaI.

Se determinó el genotipo de la Apo E en un subgrupo constituido por 38 pacientes de HFC, 18 hombres y 20 mujeres y 30 controles 15 hombres y 15 mujeres, para determinar la posible relación entre los diferentes genotipos y la enfermedad (Tabla 14).

Tabla14. Genotipo Apo E de pacientes HFC y controles

	HFC (38)	%	CONTROLE S (30)	%	P
E2/E2	0		0		
E3/E3	22	57.9	23	75.8	NS
E3/E4	14	36.8	5	17.2	<0,01
E2/E3	2	5.3	2	7	NS

χ^2 para comparar los diferentes genotipos. NS= no significativo.

P<0.01

Se observó que el porcentaje de los alelos E2, E3 y E4 en los controles fue semejante a los de la población general caucásica mientras que los observados en los enfermos de HFC fueron diferentes, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en la isoforma E3/E4 que se asocia con niveles más elevados de LDL y con un mayor riesgo cardiovascular en los pacientes de HFC frente a los controles; en el resto de los genotipos no observamos diferencias.

No se observó ningún individuo con el alelo E2, con el posible factor protector que representa al estar relacionado con niveles menores de colesterol.

4. F Relación de los parámetros lipídicos y el análisis genético.

En los pacientes de HFC el polimorfismo que aparecía con mayor frecuencia era el presente en el exón 6 correspondiente a N291S. Se realizó la comparación del perfil lipídico entre no mutados o silvestres (WT) y pacientes mutados (HT) para determinar si existían diferencias entre ellos (Tabla 15).

Tabla 15. Comparación entre WT y HT para exón 6 (N291S)

	WT (n=84)	HT (n=9)	p value
CT (mg/dl)	192.0 ± 42.0	224.1 ± 53.4	NS
TG (mg/dl)	122.0 ± 49.9	195.0 ± 140.3	NS*
cHDL (mg/dl)	47.5 ± 15.2	39.3 ± 11.5	NS
c no-HDL cholesterol (mg/dl)	152.9 ± 41.6	184.8 ± 56.8	< 0.05
cLDL (mg/dl) (1)	123.8 ± 34.5	152.4 ± 57.8	NS
cVLDL (mg/dl)	24.0 ± 29.8	39.0 ± 28.1	NS*
Apo A-I (mg/dl)	121.5 ± 21.1	112 ± 024.0	NS
Apo B (mg/dl)	107.9 ± 28.3	122.0 ± 44.1	NS
Lp(a) (mg/dl)	16.9 ± 12.2	2.1 ± 1.7	< 0.05
LDL diameter (nm)	25.65 ± 0.71	24.89 ± 0.75	< 0.05

Valores expresados en media ± desviación estándar. (1) 10 WT y 1 HT fueron omitidos por tener TG > 300 mg/dL.

* Estos parámetros fueron comparados con test U Mann-Whitney y el resto con test t-Student. NS: no significativo

Se observaron diferencias significativas en el colesterol no-HDL, con valores más elevados entre los pacientes mutados, así como en la LDL, donde el tamaño de las LDL pequeñas y densas es menor en lo pacientes mutados lo que implica un mayor riesgo cardiovascular.

Como se observaron diferencias significativas en el tamaño de las LDL se decidió determinar que patrón predominaba en los pacientes mutados y los no mutados. El número de individuos es pequeño debido a la baja prevalencia de las mutaciones.

Se observó que las partículas LDL en los pacientes mutados presentaban en un menor diámetro en un 87.5% de los casos, fenotipo B, lo que representa un mayor riesgo cardiovascular en estos pacientes (Tabla 16).

Tabla 16. Comparación por χ^2 de fenotipo de las LDL pequeñas y densas entre pacientes no mutados (WT) y mutados (HT)

	FENOTIPO A	FENOTIPO B
WT (%)	62.7* (n=53)	37.3** (31)
HT (%)	12.5* (1)	87.5** (8)

Número de individuos se expresa entre paréntesis. Las diferencias entre WT y HT: * $p < 0.001$, ** $p = 0.04$.

DISCUSSION

5 DISCUSION

La hiperlipemia familiar combinada, que fue descrita por Goldstein en 1973 como “síndrome dislipémico identificado al estudiar las familias de jóvenes supervivientes a infarto agudo de miocardio”, se caracteriza por la existencia de diferentes fenotipos (IIa, IIb, y IV) en los miembros de una misma familia, con la particularidad que el fenotipo de un mismo individuo puede variar a lo largo del tiempo. La importancia de esta hiperlipemia es que es la causa metabólica hereditaria más frecuente de arteriosclerosis coronaria prematura.

Para el diagnóstico de la HFC se utilizan los criterios de Bredie y Col³⁰ que atienden a variables lipídicas (hipertrigliceridemia, hiperapobetalipoproteinemia, hipercolesterolemia y presencia de LDL pequeñas y densas) y factores familiares (herencia autosómica dominante, presencia de arteriosclerosis prematura).

Aunque el carácter hereditario es incuestionable, no se sabe cuál es el defecto genético responsable; los estudios en familias afectas parecen poner de manifiesto una herencia autosómica con alta penetrancia. La genética de la HFC es compleja y heterogénea. El complejo fenotipo de la HFC puede deberse a defectos en multitud de genes y/o mutaciones en uno o varios genes principales e interacciones genes ambiente. En diferentes estudios se han identificado una serie de genes, que si bien no son la causa primaria de de la HFC, si parecen tener efecto en su

fenotipo. Entre estos genes se encuentran los que hemos elegido para nuestro estudio: gen de la LPL, LH y Apo E.

Así pues, en nuestro trabajo hemos estudiado las diferentes fracciones lipídicas de LDL pequeñas y densas, las subfracciones de HDL y diferentes polimorfismos asociados al gen de la LPL, LH y el genotipo de la Apo E en los pacientes de HFC en la Comunidad Valenciana, ya que la presencia de estos puede contribuir a la expresión de diferentes formas de hiperlipemia. Además hemos comparado los parámetros citados con una población control.

Parámetros lipídicos

En el grupo de HFC hemos encontrado aumentados el colesterol total, triglicéridos, cLDL, c no-HDL, cVLDL y Apo B, así como disminuidos el c-HDL, Ip (a) y la Apo A. Todos ellos estadísticamente significativos cuando los comparamos con el grupo control. Este perfil lipídico es el característico de esta enfermedad y concordante con lo publicado en la literatura^{133,134}.

El metabolismo lipídico de los pacientes de HFC lleva estudiándose décadas, Tanto el colesterol total, triglicéridos, colesterol-HDL, colesterol-LDL, colesterol-VLDL y Apoproteína A, presentan una gran variabilidad en su concentración en estos pacientes. Los parámetros que menos variabilidad presentan son la Apo B y las LDL pequeñas y densas. McNeeley presentó un seguimiento de 20 años de familias con HFC y mostró que un

tercio de los familiares cambiaron de fenotipo y un 17% de los pacientes eran normolipémicos tras el seguimiento¹³⁵. Al estudiar 5 años a 32 familias de HFC se vio que la Apo B y las LDL pequeñas y densas diferenciaban los pacientes normolipémicos de los familiares no afectados. Ha sido el estudio de Delawi¹³⁶ que demostró que el colesterol y triglicéridos de la fracción VLDL es la que confiere la variabilidad en el mismo paciente en el tiempo.

Según los criterios de la "European Society for Clinical Investigation" para el diagnóstico de la HFC es característica la presencia de hipertrigliceridemia ($TG > 150 \text{ mg/dL}$) e hiperapobetalipoproteinemia ($Apo B > 120 \text{ mg/dL}$). La mayoría de sociedades científicas aceptan la hipertrigliceridemia como factor independiente y significativo de riesgo cardiovascular¹³⁷, comenzando a considerar como riesgo los valores superiores a 150mg/dL . En el Registro Español de Hipertrigliceridemias de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA) el grupo mayoritario dentro de las hipertrigliceridemias graves corresponde a pacientes con HFC¹³⁸. La hipercolesterolemia, aunque puede estar presente, no se considera una condición imprescindible para el diagnóstico.

En la HFC coexiste una alteración de las distintas enzimas que intervienen en el metabolismo de los triglicéridos. La disminución de la actividad de la LPL contribuye también a la liberación de AGL a la circulación. Todo ello condiciona que haya un aumento en la concentración de AGL en plasma con un mayor aporte al hígado, que junto con el aumento en la síntesis de Apo B aumenta la síntesis hepática de VLDL. Estas VLDL son más pequeñas y

más cargadas de colesterol. Al alterarse también su catabolismo, se da lugar a la aparición de un mayor número de partículas LDL pequeñas y densas (fenotipo B de las LDL), partículas más aterogénicas relacionadas con la enfermedad cardiovascular.

En el estudio nuestros pacientes presentan un menor diámetro de las LDL frente al grupo control. Al igual que ocurre en algunos estudios como el de, Ayyobi¹³⁹ o Demacker¹⁴⁰. Las LDL pequeñas y densas se están proponiendo como uno de los criterios principales para el diagnóstico de la HFC y del síndrome metabólico, como expresión de la gran alteración del metabolismo de las partículas ricas en triglicéridos. Por otra parte, ya el ATPIII lo reconoce como factor de riesgo emergente.

Aunque nosotros hemos utilizado un método manual, no disponible para la mayoría de los laboratorios clínicos, se han desarrollado nuevos métodos semiautomáticos que harían más accesible esta metodología. Además estas técnicas recientes también permiten estudiar las subfracciones de las HDL, como hemos realizado en nuestro estudio, manifestándose también la presencia de subfracciones de HDL más pequeñas y por tanto más aterógenas en nuestros pacientes con HFC. A este respecto hay muy poca experiencia en la literatura, no hay ningún estudio realizado en la Comunidad Valenciana en pacientes con HFC, aspecto por el cual consideramos este hallazgo muy interesante, porque han aparecido algunos estudios que han relacionado estas subfracciones de HDL con mayor frecuencia de IAM^{141,142,143} y en general de mayor riesgo cardiovascular. En nuestro estudio no ha

sido posible realizar la correlación entre el tamaño de las HDL y pacientes mutados ya que en el subgrupo que hemos podido utilizar para realizar el estudio había solo un individuo. Sería también muy útil estudiar el efecto de los hipolipemiantes sobre estas fracciones. Nuestro grupo ha estudiado el efecto de la combinación simvastatina y ezetimiba sobre pacientes hiperlipemicos, mostrando, además de su efecto hipolipemiente, un perfil claramente beneficioso sobre las subfracciones de HDL, con una elevación de las partículas grandes y una disminución de las pequeñas en el grupo de pacientes tratados¹⁴⁴ mejorando el perfil lipídico de estos pacientes.

Las HDL son partículas muy heterogéneas, tanto estructural como funcionalmente, debido a su diferente contenido en lípidos, enzimas y apolipoproteínas. Las enzimas que intervienen en el metabolismo de las HDL pueden responder a cambios en las lipoproteínas ricas en triglicéridos y su composición. Los efectos de los distintos fármacos hipolipemiantes sobre las concentraciones de HDL y sus subfracciones son controvertidos y requieren el desarrollo de más estudios sobre este aspecto.

Aumentar las concentraciones de cHDL se considera uno de los objetivos de tratamiento para el riesgo cardiovascular residual. Además se recomienda la medición de las subclases de HDL en sujetos con aumento de riesgo cardiovascular.

Aparece una disminución en la Lp (a). Pensamos que esto es debido a que la Apo(a), principal proteína de la Lp (a), podría

unirse a las lipoproteínas ricas en triglicéridos antes que a las LDL para formar la Lp (a). Esto se ha comprobado en situaciones donde aparece un aumento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos.

En este momento están en discusión y revisión las Guías Clínicas sobre HFC. Recientemente se ha publicado un Documento de Consenso en España elaborado por varias sociedades científicas. Debido a la elevada aterogenicidad de esta enfermedad, la estratificación del riesgo por métodos habituales puede estar infraestimada en estos pacientes. Se recomienda que sean considerados de alto riesgo y que se comience el tratamiento farmacológico hipolipemiente lo antes posible.

Polimorfismos de LPL

Aunque se ha buscado un marcador genético que explique claramente la HFC, ninguno de los “genes candidatos” ha conseguido explicar por sí mismo esta compleja enfermedad. Sus bases genéticas no han sido aun determinadas y se ha propuesto que este desorden es probablemente heterogéneo y oligogénico^{145,146}.

Nosotros hemos estudiado polimorfismos de la LPL, LH y el genotipo de la Apo E. No hemos encontrado ninguna referencia que se hayan estudiado estos polimorfismos en la Comunidad Valenciana.

El gen de la lipoproteinlipasa enzima glucoproteica que juega un papel clave en el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos como son los QM y lipoproteínas de muy baja densidad VLDL¹⁴⁷, hidrolizando los triglicéridos y favoreciendo el intercambio de apolipoproteínas y fosfolípidos con lipoproteínas de alta densidad, transformándose así, los QM y sobre todo las VLDL en partículas cada vez más pequeñas y cargadas de colesterol.

La alteración del catabolismo de estas partículas da lugar a la aparición de VLDL mas pequeñas y más cargadas de colesterol y concentraciones elevadas de Apo B que condicionan la aparición de mayor número de partículas LDL pequeñas y densas (fenotipo B de las LDL)¹⁴⁸ las cuales son más aterogénicas, partículas que también están relacionadas con la HFC¹⁴⁹, así como con la enfermedad cardiovascular^{150,151}.

Hemos estudiado varios codones polimórficos en el gen de la LPL asociados con el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos^{152,153,154}. El polimorfismo N291S¹⁵⁵ induce un cambio de aminoácido asparragina por serina en la posición 291 del enzima. Este polimorfismo se sitúa en el exón 6 siendo uno de los más frecuentes. La frecuencia de esta mutación oscila entre 2-5%¹⁵⁶ en población caucásica, estando ampliamente aumentada la prevalencia en nuestros pacientes (9.7%), mientras que en la muestra de nuestra población general estudiada, no hemos encontrado este polimorfismo. Algunos datos sugieren que esta mutación afectaría a la lipemia postprandial a través de una alteración en su actividad enzimática^{157,158} empeorando

posiblemente el fenotipo de la HFC, habiéndose descrito respuestas postprandiales alteradas a comidas ricas en grasas, incluso en los casos de pacientes que inicialmente eran normolipémicos¹⁵⁹.

Estos datos son coincidentes con los encontrados por nosotros, ya que los pacientes portadores del polimorfismo tienen concentraciones más elevadas de triglicéridos, LDL, VLDL, c-noHDL, Apolipoproteína B100 y menor diámetro de las LDL, así como disminuidas de HDL y Apolipoproteína A-I, perfil sugerente de una alteración en el metabolismo de las partículas ricas en triglicéridos, claramente más aterógeno¹⁶⁰; de hecho en algunos estudios llevados a cabo en HFC este polimorfismo se ha relacionado con los pacientes que han presentado cardiopatía isquémica^{161,162,163}.

Los pacientes portadores del polimorfismo N291S presentan un fenotipo B de las LDL en mayor porcentaje que los pacientes sin este polimorfismo, los cuales tenían mayor porcentaje de fenotipo A. La mutación presente en un alto porcentaje de nuestros pacientes con HFC, podría alterar el fenotipo de la enfermedad mediante la alteración de las partículas ricas en triglicéridos.

Este hecho podría ser expresión final de una mayor alteración en el metabolismo de las partículas ricas en triglicéridos, que haría que estos pacientes presentaran un perfil lipídico más aterógeno, y por tanto un mayor riesgo cardiovascular.

En el exón 5 no ha aparecido la mutación en ningún paciente. La relación que creíamos podía existir por su presencia en la HTA no la hemos podido confirmar.

En el exón 2 tampoco hemos encontrado diferencias significativas. Sí que hemos observado una correlación significativa entre el promotor LPL y el exón 2 que podríamos explicar por la existencia de un desequilibrio de ligamiento entre estas 2 mutaciones, que les hace presentarse simultáneamente.

También aparece con mayor frecuencia la mutación en el promotor de la LPL en pacientes HFC comparados con población general. Parece que esta mutación se asocia con aumento en los niveles de triglicéridos. En el resto de mutaciones no hemos observado cambios significativos frente a la población general.

Polimorfismos de LH

La LH es una enzima que se sintetiza en el retículo endoplásmico de las células del hígado y reside en la superficie de estas. Tiene dos actividades: fosfolipasa y triglicérido lipasa e interviene en el modelado de partículas IDL para su transformación en LDL eliminando fosfolípidos y triglicéridos en los pasos finales. También elimina fosfolípidos y triglicéridos de las HDL, provocando un aclaramiento de HDL del plasma, así como la conversión de HDL2 a HDL3, y su deficiencia da lugar a un patrón lipídico en el que aumentan el colesterol y los triglicéridos, siendo el aumento de colesterol debido fundamentalmente a la elevación

de HDL. Variaciones en la actividad de la LH pueden predisponer a enfermedad arterial coronaria por su efecto sobre el tamaño y densidad de las partículas LDL y HDL.

La deficiencia de LH se transmite de forma recesiva y es muy poco frecuente. Se han descrito algunas mutaciones en casos raros de déficit familiar de LH que se asocian con pérdida de actividad del enzima o con una alteración en su procesamiento celular.

De los cuatro polimorfismos encontrados en la zona del promotor de la LH y que se encuentran en completo desequilibrio de ligamiento, el más estudiado en relación con la HFC es el C514T, que parece explicar un 38% de la variabilidad en la actividad de la LH. No hemos encontrado diferencias entre pacientes y población control, pensamos que por su gran variabilidad.

Genotipo apo E

Otro de los genes estudiados es el de la Apo E. Este es un gen con tres alelos codominantes (E2, E3 y E4) que dan lugar a 6 posibles genotipos: E2/E2, E3/E3, E4/E4, E2/E3, E2/E4 y E3/E4. La frecuencia de los alelos E4, E3 y E2 en la población control obtenidos por electroforesis en gel de acrilamida son 17.2%, 75,8% y 7% respectivamente, semejantes a los publicados en población caucásica. Estas isoformas se diferencian en la sustitución de uno de los aminoácidos en la posición 112-158, lo

que va a modificar el reconocimiento de sus receptores específicos, especialmente en el caso de la ApoE2.

El papel principal de la Apo E en el metabolismo lipoproteico es el aclaramiento por parte del hígado de las lipoproteínas ricas en TG (VLDL y QM) y de sus remanentes ya que actúan como ligando para el receptor hepático de las LDL y para el receptor de los remanentes (LRP). Pero además, también regula la producción hepática de las partículas VLDL y la lipólisis de las mismas por parte de la LPL.

Los portadores de la isoforma E2 tienen menos colesterol intracelular debido a la escasa afinidad que tienen por el receptor de las LDL, lo que disminuye la captación hepática de QM y VLDL. Esto provoca un aumento en el número de receptores de LDL en el hepatocito. Además parece ser que la Apo E2 disminuye la conversión de VLDL en LDL. En nuestro estudio no apareció ningún portador de la isoforma E2.

Por su parte, la isoforma E4 tiene una mayor afinidad por las VLDL y los QM, lo que implica un aumento de colesterol intracelular que da lugar a una disminución de las expresiones de los receptores de la LDL. Dado que las proteínas ricas en Apo E son peor sustrato para la lipólisis, debido a su efecto inhibitor¹⁶⁴, el enriquecimiento en las isoformas E4 podría propiciar una lipólisis parcial. Así, las partículas que contengan esta isoforma también serían sustratos peores para la LPL. Esto se observa en nuestros pacientes con HFC existe una mayor presencia de la

isoforma E4 (E3/E4), 36,8% frente al 17.2% que aparece en la población general lo que acompaña de un aumento del colesterol total, HDL, LDL y TG.

En resumen, nuestros pacientes con HFC presentan un perfil claramente aterógeno, con aumento sobre todo en lipoproteínas ricas en triglicéridos, así como mayor presencia de partículas LDL pequeñas y densas y subfracciones de HDL también pequeñas (última expresión de alteración de estas partículas).

Aunque la base genética de la enfermedad no está claramente establecida, sí que parece que determinados polimorfismos podrían empeorar este perfil lipídico, como la presencia de la mutación N291S y la mutación del promotor de la LPL, así como la presencia del genotipo E3/E4.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1.- Los pacientes con HFC que presentan la mutación N291S tienen un mayor predominio del fenotipo B de las LDL.

2.- Los pacientes con HFC presentan un diámetro menor de las LDL comparados con el grupo control, así como mayor proporción de subfracciones de HDL de tamaño pequeño. Todo ello expresión de la alteración del metabolismo de las partículas ricas en triglicéridos que estos pacientes presentan.

3.- Los pacientes con HFC presentan una mayor frecuencia de aparición de la mutación N291S del promotor de la LPL, así como del genotipo E3/E4. Enzimas relacionadas con el metabolismo de las proteínas ricas en triglicéridos.

4.- Los pacientes con HFC que presentan la mutación N291S tienen un empeoramiento del perfil lipídico expresado con una disminución de las HDL y aumento de las LDL pequeñas y densas, partículas más aterógenas.

De entre todos los polimorfismos estudiados en nuestros pacientes con HFC, el N291S es el que se correlaciona con un perfil lipídico más aterógeno, por tanto podríamos considerarlo como un marcador genético de mayor riesgo cardiovascular en nuestros pacientes.

BIBLIOGRAFIA

¹ Daniels T, Killinger K, Michael J, Wright R, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *International J Biological Sciences* 200; 5(5): 474-488.

² Martínez Triguero ML, Veses Martín S, Garzón Pastor S y. Hernández Mijares A. Alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas. *Medicine* 2012; (9): 1125-1129.

³ Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2009; 50:S 189-194.

⁴ Errico LT, Xiangyu Chen, Martin Campos JM, Julve J, Escolà-Gil JC y Blanco-Vaca F. Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas. *Clin Invest Arterioscl.* 2013; 25(2): 98-103.

⁵ Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe SEA 2007.

⁶ Medrano MJ, Cerrato E, Boix R, Delgado-Rodríguez M. *Medicina Clínica* 2005; 124: 606-612.

⁷ Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesobro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation* 1990; 82: Supl 3 1147-1159.

⁸ Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesobro JH, Fuster V. Endothelium and atherosclerosis. *J Hiperten* 1992; 10: S43-S50.

⁹ Cunningham KS, Gottlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2005; 85: 9-23

¹⁰ National Cholesterol Education Program (NCEP): Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III): Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP): Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-3421.

¹¹ Lahoz C, Mostaza JM, *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60(2): 184-195.

¹² Rubio MA, Moreno C, Cabrerizo L. Guías para el tratamiento de las dislipemias en el adulto: Adult Treatment Panel III (ATP-III) *Endocrinol Nutr* 2004; 51(5): 254-265

¹³ Reiner Z, Catapano AL, De Bacher G, Graham I, Taskinene M-R, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dislipidaemias. *European Heart Journal.* 2011; 32: 1769-1818.

¹⁴ Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoprotein. An integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med.* 1967; 276: 32-44; 94-103; 148-156.

¹⁵ Hiperlipemias. Clínica y tratamiento. Carmena R. y Ordovás JM. Ed. Doyma 1999.

¹⁶ Prevention of coronary heart disease. Scientific background and new clinical guidelines. Recommendations of the

European atherosclerosis Society prepared by the International Task force of Prevention of Coronary Heart Disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1992; 2: 113-156.

¹⁷ Hernández Mijares A. Hipertrigliceridemias primarias. En: Documento de Consenso SEMERGEN-SEEN-SEA. Atención conjunta al paciente con hipertrigliceridemia. Barcelona: Edicomplet; 2011; 17-21.

¹⁸ Wong 5K, Ryan RO. Characterization of apolipoprotein A-V structure and mode of plasma triacylglycerol regulation. *Curr Opin Lipidol*. 2007; 18: 319-324.

¹⁹ Young SG, Davies BS, Voss CV, Gin P, Weinstein M.M, Tontonoz P, et al. GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. *J Lipid Res*. 2011; 52: 1869-1884.

²⁰ Rubiés-Prat J. Hiperlipoproteinemias secundarias. *Clin Invest Arterioscl* 2002; 14(3): 142-149

²¹ Herranz L, Zapata A, Grande C, Megía A, Pallardó LF. Body fat distribution, insulin mediated suppression of non-esterified fatty acids and plasma triglycerides in obese subjects. *Horm Metab Res*. 1998; 30: 141-145.

²² Garvey WT, Kwon S, Zheng D, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, et al. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes*. 2003; 52: 453-462.

²³ Thompson GR, Soutar AK, Spengel FA, Jadhav A, Gavigan SJ, Myant NB. Defects of receptor-mediated low density lipoprotein catabolism in homozygous familial

hypercholesterolemia and hypothyroidism in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 1981; 78: 2591-2595

²⁴ Rodríguez Arroyo LA. SEMERGEN.DOC Dislipemias. Edicomplet. 2009:15-20.

²⁵ Solá Izquierdo E, Bergoglio MT, Jover Fernandez A y Hernández Mijares A. Hiperlipemias secundarias. Medicine 2012; 11(19): 1137-1144

²⁶ Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG: Hyperlipidemia in coronary heart disease II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. J Clin Invest 1973; 52:1544-1568.

²⁷ Nikkila EA, Aro A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. Lancet 1973; 1: 954-958.

²⁸ Mc Neely MJ, Edwards KL, Marcovina SM, Brunzell JD, Motulsky AG, Austin MA. Lipoprotein and apolipoprotein abnormalities in familial combined hyperlipidemia: a 20-year prospective study. Atherosclerosis. 2001; 159: 471-481.

²⁹ Aitman TJ, Goldsland IF, Farren B, Crook D, Wong HJ, Scott J. Defects of insulin action on fatty acid and carbohydrate metabolism in familial combined hyperlipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 748-754.

³⁰ Bredie SJ, Tack CJ, Smits P, Stalenhoef AF. Non obese patients with familial combined hyperlipidemia are insulin resistant

compared with their non affected relatives. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1997; 17: 834-840.

³¹ De Graaf J, Stalenhoef AFH. Defects of lipoprotein metabolism in familial combined hyperlipidemiae. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 189-196.

³² Veerkamp MJ, De Graaf J, Stalenhoef AFH. Role of insulin resistance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 2005; 25: 1026-1031.

³³ Castro Cabezas M, de Bruin TW, Valk HW, Shoulders CC, Jansen H, Willem Erkelens D. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. A mechanism associating hepatic apolipoprotein B overproduction and insulin resistance. *J Clin Invest* 1993; 92: 160-168.

³⁴ Hoffer MJ, Bredie S.J.Boomsma DI, Reymer PW, Kastelein JJ., Knijff PD et al. The lipoprotein lipase (Asn291-Ser) mutations associated with elevated lipid level families whit FCH. *Atherosclerosis* 1997; 119: 159-167.

³⁵ De Bruin TWA, Castro Cabezas M, Dallinga-Yhie G, et al.. Familial Combined Hyperlipidaemia – do we understand the pathophysiology and genetics? In Betteridge DJ. ed. *Lipids: current perspectives*. London: Martin Dunitz 1996; 101-109.

³⁶ Sniderman AD, Ribalta J, Castro Cabezas M. How should FCH be defined and how should we think about its metabolic bases? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2001; 11: 259-273.

³⁷ Venkatesan S, Cullen P, Pacy P, et al. Stable isotopes show a direct relation between VLDL Apo B overproduction and

serum triglyceride levels and indicate a metabolically and biochemically coherent basis for familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb*, 1993; 13: 1110-1118.

³⁸ Arner P. Is familial combined hyperlipidemia a genetic disorder of adipose tissue? *Curr Opin Lipidol*. 1997; 8: 89-94.

³⁹ Castro Cabezas M, De Bruin TWA, De Valk HW, Shoulders CC, Jansen H, Erkelens DW. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. A mechanism associating hepatic apolipoprotein B overproduction and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1993; 92: 160-168.

⁴⁰ Ascaso JF, Merchante A, Real J, Lorente R, Martínez-Valls J, Carmena R. Influence of obesity on plasma lipoproteins, glycaemia and insulinaemia in patients with familial combined hyperlipidemia. *Int J Obes*. 1997; 17: 834-840.

⁴¹ Kalant D, Cain SA, Maslowska M, Sniderman AD, Cianflone K, Monk PN. The chemo attractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein. *J Biol Chem*. 2003; 278: 11: 123-129.

⁴² Ylitalo K, Large V, Pajukanta P, Reynisdottir S, Porkka KV, Vakkilainen J, et al. Reduced hormone-sensitive lipase activity is not a major metabolic defect in Finnish FCHL families. *Atherosclerosis*. 2000; 153: 373-381.

⁴³ Sniderman AD, Ribalta J, Castro Cabezas M. How should FCHL be defined and how should we think about its metabolic bases? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2001; 11: 259-273.

⁴⁴ Ribalta J, Castro-Cabezas M, Plana N y Masana L. Visión actualizada de la hiperlipidemia familiar combinada aplicada a la

mejora de su diagnóstico. *Clin Invest Arterioscl*. 2005; 17(1): 34-47.

⁴⁵ Austin MM, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willet WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 1988; 260: 1917-1921.

⁴⁶ Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM, Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. 1990; 82: 495-506.

⁴⁷ Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of 435 High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The 436 Third Report of The National Cholesterol Education Program 437 (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of 438 High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). 439 Q7 *JAMA*. 440 2001; 285: 2486-2497.

⁴⁸ Hernández-Mijares A, Bañuls C, Bellod L, Jover A, Sola E, Victor M, Rocha M. Estudio de las subfracciones lipoprotéicas tras el tratamiento con simvastatina y ezetimiba, en monoterapia o combinado, en pacientes hiperlipidémicos. *Clin Inves Arterioscler* 2012; 196: 1-9.

⁴⁹ Castelli WP, Garrison RI, Wilson PW, Abbott RD, Kalonsdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986; 256: 2835-2838.

⁵⁰ Assman G, Fruchart JC, Shepherd J, Sirtori C. Raising HDL cholesterol with reduction of cardiovascular risk. The role of nicotinic acid- a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-c. *Chapman Current Med Res Opinion* 2004; 20: 1253-1268.

-
- ⁵¹ Kontush A, Clapman MJ. Anti atherogenic small, dense-HDL – guardian angel of the arterial wall? *Clin Pract Cardiovasc Med* 2004; 3: 144-153
- ⁵² Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. High-density-lipoprotein subfractions- What the Clinicians Need to Know. *Cardiology* 2013; 124: 116-125.
- ⁵³ Martin SS, Joshi PH, Blaha MJ. High-density lipoprotein and endothelial function in patients with myocardial infarction: Pieces in a puzzle. *Atherosclerosis* 2014; 237: 838-839.
- ⁵⁴ Martin SS, Khokhar AA, May HT, Kulkarni KR. Blaha MJ, Joshi PH. HDL cholesterol subclasses, myocardial infarction, and mortality in secondary prevention: the lipoprotein investigators collaborative. *European Heart Journal* doi:10.1093/eurheartj/ehu264
- ⁵⁵ Veerkamp MJ, de Graaf J, Bredie SJH, Hendriks JCM, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Diagnosis of familial combined hyperlipidemia based on lipid phenotype expression in 32 families. Results of a 5-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 274-282.
- ⁵⁶ de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AFH. Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. *J R Soc Med* 2002; 95: 46-53.
- ⁵⁷ Bredie SJH, Demacker PnM, Stalenhoef AFH. Metabolic and genetic aspects of familial combined hyperlipidemia with emphasis on low-density lipoprotein heterogeneity. *Eur J Clin Invest* 1997;27: 802-811.

⁵⁸ Ayyobi AF, McGladdery SH, McNeely MJ, Austin MA, Motulsky AG, Brunzell JD. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1289-1294.

⁵⁹ Sniderman AD, Castro Cabezas M, Ribalta J, Carmena R, de Bruin TWA, deGraaf J, Erkelens DW, Humphries SE, Masana L, Real JT, Talmud PJ, Taskinen MR. A proposal to redefine familial combined hyperlipidemia-Third Workshop on FCHL held in Barcelona from 3 to 5 May 2001, during the scientific sessions of the European Society for clinical Investigation. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 71-73.

⁶⁰ Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG: Hyperlipidemia in coronary heart disease II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973; 52: 1544-1568.

⁶¹ Cullen P, Farren B, Scott J, Farrall M. Complex segregation analysis provides evidence for a major gene acting on serum triglyceride levels in 55 British families with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 1233-1249.

⁶² Bredie SJ, Van Drongelen J, Kiemeney LA, Demacker PN, Beaty TH, Stalenhoef AF. Segregation analyses of plasma apolipoprotein B levels in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 834-840.

⁶³ Jou SH, Bredie SJ, Kiemeney LA, Demarcker PN, Stalenhoef AF. A common genetic mechanism determines plasma apolipoprotein B levels and dense LDL subfraction distribution in

familial combined hyperlipidemia. *Am J Hum Genet.* 1998; 63: 586-594.

⁶⁴ Bredie SJH, Demacker PnM, Stalenhoef AFH. Metabolic and genetic aspects of familial combined hyperlipidemia with emphasis on low-density lipoprotein heterogeneity. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 802-811.

⁶⁵ Pihlajamäki J, Austin M, Edwards K, Laakso M. A major gene effect on fasting insulin and insulin sensitivity in familial combined hyperlipidemia. *Diabetes* 2001; 50: 2396-2401.

⁶⁶ Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, Porkka KVK, Ylitalo K, Pihlajamäki J, et al. Linkage of familial combined hyperlipidaemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet.* 1998; 18: 369-373.

⁶⁷ Pajukanta P, Terwilliger JD, Perola M, Hiekkalinna T, Nuotio I, Ellonen P, Parkkonen M, Hartiala J, Ylitalo K, Pihlajamäki J, Porkka K, Laakso M, Viikari J, Ehnholm C, Taskinen MJ, Peltonen L. Genome wide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol, and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1453-1463.

⁶⁸ Aouizerat BE, Allayee H, Cantor RM, Davis RD, Lanning C, Wen P, Dallinga-Thie G, De Bruin T, Rotter JI, Lusk AJ. A genome scan for familial combined hyperlipidemia reveals evidence of linkage with a locus on chromosome 11. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 397-412.

⁶⁹ Naoumova RP, Bonney SA, Eichenbaum-Voline S, Patel HN, Jones B, Jones EL, Amey J, Colilla S, Neuwirth CK, Allotey R, Seed M, Betteridge DJ, Galton DJ, Cox NJ, Bell GI, Scott J

Shoulders CC. Confirmed locus on chromosome 11p and candidate loci on 6q and 8p for the triglyceride and cholesterol traits of combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 2070-2077.

⁷⁰ Coon H, Myers RH, Borecki IB, Arnett DK, Hunt SC, Province MA, et al. Replication of linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q with additional heterogeneous effect of apolipoprotein A-I/C-III/A-IV *locus*. The NHLBI Family Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 2275-2280.

⁷¹ Huertas-Vázquez A, del Rincón JP, Canizales-Quinteros S, Riba L, Vega-Hernández G, Ramírez Jiménez S, Auron-Gómez M, Gómez-Pérez FJ, Aguilar-Salinas CA, Tusie-Luna MT. Contribution of chromosome 1q21-q23 to familial combined hyperlipidemia in Mexican families. *Ann Hum Genet* 2004; 68: 419-427.

⁷² Hoffer MJ, Bredie S.J. Boomsma DI, Reymer PW, Kastelein JJ., Knijff PD, Demacker PN, Stalenhoef AF, Havekes LM, Frants RR. The lipoprotein lipase (Asn291-Ser) mutation is associated with elevated lipid level families with FCH. *Atherosclerosis* 1997; 119: 159-167.

⁷³ Allayee H, Dominguez KM, Aouizerat BE, Krauss RM, Rotter JI, Lu J, Cantor RM, de Bruin TW, Lusis AJ. Contribution of the hepatic lipase gene to the atherogenic lipoprotein phenotype in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2000; 41: 245-252.

⁷⁴ Wojciechowski AP, Farrall M, Cullen P, Wilson TM, Bayliss JD, Farren B, Griffin BA, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Familial combined hyperlipidaemia linked to the Apolipoprotein AI-CII-AIV gene cluster on chromosome 11q23- q24. *Nature* 1991; 349: 161-164.

-
- ⁷⁵ Dallinga-Thie GM, van Linde-Sibenius, TM, Rotter JI, Cantor RM, Bu XD, Lusi AJ, de Bruin TWA. Complex genetic contribution of the Apo AI-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. *J Clin Invest* 1997; 99: 953-961.
- ⁷⁶ Eichenbaum-Voline S, Olivier M, Jones EL, Naoumova RP, Jones B, Gau B, Patel HN, Seed M, Betteridge DJ, Galton DJ, Rubin EM, Scott J, Shoulders CC, Pennacchio LA. Linkage and association between distinct variants of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 167-174.
- ⁷⁷ Aouizerat BE, Allayee H, Bodnar J, Krass KL, Peltonen L, de Bruin TW, Rotter JI, Lusi AJ. Novel genes for familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 113-122.
- ⁷⁸ Bredie SJ, Vogelaar JM, Demacker PN, Stalenhoef AF. Apolipoprotein E polymorphism influences lipid phenotype expression, but not the low density lipoprotein subfraction distribution in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 1996; 126: 313-324.
- ⁷⁹ Geurts JM, Janssen RG, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Cantor RM, Bu X, Aouizerat BE, Allayee H, Rotter JI, de Bruin TW. Identification of TNFRSF1B as a novel modifier gene in familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2067-2074.
- ⁸⁰ Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusi AJ, Gentile M, et al. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet*. 2004; 36: 47-476.

-
- ⁸¹ Sparkes RS, Mohandas T, Heinzmann C, Gordon JI, Klisak I, Zollman S et al. Human fatty acid binding protein assignments: intestinal to 4q28-4q31 and liver to 2p11. *Cytogenet Cell Genet* 1987; 46: 697.
- ⁸² Eurling PM, van der Kallen CJ, Geurts JM, et al. Identification of the PPARA locus on chromosome 22q13.3 as a modifier gene in familial combined hyperlipidemia. *Mol Genet Metab* 2002; 77: 274-281.
- ⁸³ Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusis AJ, Gentile M, et al. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet.* 2004; 36: 471-476.
- ⁸⁴ Hoffstedt J, Ryden M, Wahrenberg H, van Harmelen V, Arner P: Upstream transcription factor-1 gene polymorphism is associated with increased adipocyte lipolysis. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 5356-5360.
- ⁸⁵ Karen L. Wion, Todd G., Aldons J. Lusis, Michael C. Schotz, Richard M. Lawn. Human Lipoprotein Lipase complementary DNA sequence. *Science* 1987; 235: 1638-1641.
- ⁸⁶ Bensadoun A, Lipoprotein lipase. *Annu Rev Nutr.* 1991; 11: 217-237.
- ⁸⁷ Nikkila EA, Taskinen MR, Kekki M. Relation of plasma high density lipoprotein cholesterol to lipoprotein-lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle man. *Atherosclerosis* 1978; 29: 497-486.

-
- ⁸⁸ Ira J. Goldberg IJ. and Merkel M. Lipoprotein Lipase: Physiology Biochemistre, and molecular biology. *Frontiers in Bioscience* 2001; 6: 388-405.
- ⁸⁹ Osborne et al. *Biochemistre.* 1985; 24: 5606-5611.
- ⁹⁰ Braun JEA, Severson DL. Regulation of synthesis, procesing and traslocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 1992; 287: 337-347.
- ⁹¹ Enerback S et al *Biochem Biophys. Act.* 1993; 1169: 107-125.
- ⁹² Wion KL, Kirchgesner TG, Lusic AJ, Schotz M, Lawn RM. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence, *Science* 1987; 235: 1638-1641.
- ⁹³ Goldberg J. and Martin Merkel. Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry and molecular biology. *Frontiers in Bioscience* 2001; 6: 388-405.
- ⁹⁴ Sparkes, RS, Zollman S, Klisak I, Kirchgessner TG, Komaromy MC, Mohandas T, et al. Human genes involved in lipolisis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. *Genetic* 1987; 1: 138-144.
- ⁹⁵ Witte Koek ME, Pimstone PW, Reymer L, Feuth, GJ. Botma, JC. Defesche et al. A common mutation in the lipoprotein lipase (N291S) alters the lipoprotein phenotype and risk for cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 97: 729-735.

-
- ⁹⁶ Hu Y, Liu W, Huang R, Zhang X: A systematic review and meta analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn291Ser variant and diseases. *J Lipid Res* 2006; 47: 1908-1914.
- ⁹⁷ Gerdes C, Fisher RM, Nicaud V, Boer J, Humphries SE, Talmud PJ, Faergeman O.: Lipoprotein lipase variants D9N and N291S areas sociated with increased plasma triglyceride and lower high-density lipoprotein cholesterol concentrations: studies in the fasting and postprandial states: the European Atherosclerosis Research Studies. *Circulation* 1997; 96: 733-740.
- ⁹⁸ Christian Gerdes MD. Rachel M. Fisher, PhD; Viviane Nicand, MA; Jolanda Boer, MSc; Steve E. Humphries, PhD; Philippa Jet al. Lipoprotein lipase variant D9Nand N291S are associated with increased plasma triglyceride and lower high-density lipoprotein cholesterol concentrations. *Circulation* 1997; 96: 733-740.
- ⁹⁹ Hayden MR, Kastelein JJ, Funke H, Brunzell JD and Ma Y: Phenotypic variation of mutations in the human lipoprotein-lipase gene. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 506-509.
- ¹⁰⁰ Yang WS, Nevin ND, Iwasaki L, Peng R, Brown BG, Brunzell JD et al. Regulatory mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial combined hiperlipidemia and coronary disease. *J. Lipid Res* 1996; 37: 2627-2637.
- ¹⁰¹ Philip W. Connelly PW. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism *Clinica Chimica Acta* 286 (1999): 243–255.
- ¹⁰² Bamberger M, Lund-Katz S, Philips MC, Rothblat GH: Mechanism of the hepatic lipase induced accumulation of high-

density lipoprotein cholesterol by cells in culture. *Biochemistry* 1985; 24: 3693-3370.

¹⁰³ Scriver, Beaudet, Valle Sly. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th Ed. McGraw-Hill, II: 28002-28004.

¹⁰⁴ Hegele RA, Tu L, Connelly PW Human hepatic lipase mutations and polymorphisms. *Hum Mutat*. 1992; 1(4): 320-324.

¹⁰⁵ Datta S, Luo C-C, Li W-H, van Tuinenj P, Ledbetter DH, Brown MA, Chen S-H et al. Human hepatic lipase: Cloned cDNA sequence, restriction fragment length polymorphisms, chromosomal localization and evolutionary relationships with lipoprotein lipase and pancreatic lipase. *J. Biol Chem* 1988; 263: 1107-1110.

¹⁰⁶ Ameis D, Stahnke G, Kobayashi J, Lee G, Busher M, Schotz MC. Isolation and characterization of the human hepatic lipase gene. *J. Biol Chem* 1990; 265: 6552-6555.

¹⁰⁷ Murtomaki S, Tahvanainen E, Antikainen M, Tirt L, Nicaud V, Jansen H, and Ehnholm C. Hepatic lipase gene polymorphisms influence plasma HDL levels. Results from Finnish EARS participants. *European Atherosclerosis Research Study. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 1879-1884.

¹⁰⁸ Perret B, Mabile L, Martinez L, Tercé F, Barbaras R, Collet X. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *Journal of Lipid Research*. 2002; 43: 1163-1169.

¹⁰⁹ Chang SF, Scharf JG, and Will H. Structural and functional analysis of the promoter of the hepatic lipase gene. *Eur. J. Biochem*. 1997; 247: 148-159.

-
- ¹¹⁰ Deeb S and Peng R. The C-514T polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter diminishes its activity. *J. Lipid* .2000; 41:155-158.
- ¹¹¹ Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, et al. Apo E promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron*. 2008; 58(5) :681-693.
- ¹¹² Zannis VI, Just PW, Breslow JL: Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet* 1981; 33: 11-24.
- ¹¹³ Utermann G, Hees M. Steimetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. *Nature* 1977; 269: 604-698.
- ¹¹⁴ Davignon J, Gregg RE. Sing CE. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1988; 8: 1-21.
- ¹¹⁵ Mailly F. Moll P. Kottke BA, et al. Estimation of the frequency of isoforms-genotype discrepancies at the apolipoprotein E locus in heterozygotes for the isoforms. *Genet Epidemiol* 1992; 9: 239-248.
- ¹¹⁶ Rall SC Jr., Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 4696-4700.
- ¹¹⁷ Brow MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.

-
- ¹¹⁸ Gregg RE, Zech LA, Schaefer EJ, et al. Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E₄ in humans. *J Clin Invest* 1986; 78: 815-821.
- ¹¹⁹ Moreno JA, José López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Influencia de los factores genéticos y ambientales en el metabolismo lipídico y riesgo cardiovascular asociado al gen Apo E. *Med Clin*. 2006; 127(9): 343-351.
- ¹²⁰ Schafer E, Lamon-Farva S, Johnson S, et al. Effects of gender and menopausal status on the apo E phenotype and plasma lipoprotein levels. Results from the Framingham offspring study. *Arterioscler. Thromb* 1994;14: 1105-1113.
- ¹²¹ Fotiou FK. Automated rate nephelometric determination of apolipoproteins A1 and B in human serum by consecutive addition of antibodies. *Anal Chem*. 1992; 64(15): 1698-1701.
- ¹²² Stein EA, Myers GL. NCEP Recommendations for Triglyceride Measurement: Executive Summary. *Clin Chem*. 1995; 41: 1421-1426.
- ¹²³ Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin. *Clin Chem* 1995 ;41: 717-723.
- ¹²⁴ Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499 –502.

-
- ¹²⁵ Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA: Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1986; 128: 417-431.
- ¹²⁶ Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans *Journal of Lipid Research* 1982; 23: 97-104.
- ¹²⁷ Austin MA, Hokanson JE, Brunzell JD: Characterization of low density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 395-403.
- ¹²⁸ Oravec S, Dostal E, Dukat A, Gavornik P, Kucera M, Gruber K. HDL subfractions analysis: a new laboratory diagnostic assay for patients with cardiovascular diseases and dyslipoproteinemia. *Neuro Endocrinology Letters* 2011; 32(4): 502-509.
- ¹²⁹ Hecker KH, Roux KH: High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* 1996; 20: 478-485.
- ¹³⁰ Hixson J, Vierner T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lip Res* 1990; 31: 545-548.
- ¹³¹ Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.
- ¹³² Guo SW, Thompson EA (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48: 361-372.

-
- ¹³³ Sniderman AD, Castro CM, Ribalta J, Carmena R, de Bruin TW, de Graaf J, et al. A proposal to redefine familial combined hyperlipidaemia -- third workshop on CHL held in Barcelona from 3 to 5 May 2001, during the scientific sessions of the European Society for Clinical Investigation. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32: 71-73.
- ¹³⁴ Nikkila EA, Aro A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet.* 1973; 1: 954-958.
- ¹³⁵ Halkes CJM, Van Dijk H, Verseyden C, De Jaegere PPT, Plokker HWM, Meijssen et. al. Gender differences in postprandial ketone bodies in normolipidemic subjects and in untreated patients with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1875-1880
- ¹³⁶ Delawi D, Meijssen S, Castro Cabezas M. Intra individual variations of fasting lipids, apolipoproteins and postprandial lipidemia in familial combined hyperlipidemia compared to controls. *Clin Chim Acta.* 2003; 328: 139-145.
- ¹³⁷ Sarwar N, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation.* 2007; 115: 450-458.
- ¹³⁸ Pedragosa A, Merino J, Aranda JL, Galiana J, Godoy D, Panisello JM, Ascaso JF. Perfil clínico de los pacientes con hipertrigliceridemia muy severa del Registro de Hipertrigliceridemias de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscler.* 2013; 25: 8-15
- ¹³⁹ Ayyobi AF, Mc Gladdery SH, McNeely ML et al. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial

combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 23: 1289-1294.

¹⁴⁰ Demacker PN, Veerkamp MJ, Bredeie SJ, et al. Comparison of the measurement of lipids and lipoproteins versus assay of apolipoprotein B for estimation of coronary heart disease risk: A study in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2000; 153: 483-490.

¹⁴¹ Martin SS, Joshi PH, Blaha MJ. High-density lipoprotein and endothelial function in patients with myocardial infarction: Pieces in a puzzle. *Atherosclerosis* 2014; 237: 838-839

¹⁴² Martin SS, Khokhar AA, May HT, Kulkarni KR, Blaha MJ, Joshi PH, Toth PP, Muhlestein JB. HDL cholesterol subclasses, myocardial infarction, and mortality in secondary prevention. *European Heart Journal* doi:10.1093/eurheartj/ehu264

¹⁴³ Pirillo A , Norata GD, Catapano AL. High-Density Lipoprotein Subfractions. *Cardiology* 2013;124: 116–125

¹⁴⁴ Hernández Mijares A, Bañuls C, Bellod L, Jover A, Sola E, Víctor VM y Rocha M. Estudio de las subfracciones lipoproteicas tras el tratamiento de simvastatina y ezetimiba, en monoterapia o combinado, en pacientes hiperlipémicos. *Clin Invest Arterioscler*. 2012; 196.1-9

¹⁴⁵ Jarvik, GP, Brumzell, JD, Austin, MA, Krauss, RM, Motulsky, AG, and Wijsman, E. *Arterioscler. Thromb.* 1194; 14: 1687-1694.

¹⁴⁶ López-Ruiz A, Martínez-Triguero ML, Morillas-Ariño C y Hernández-Mijares A. Genes implicados en la Hiperlipemia Familiar Combinada. *Clin Invest Arterioscler*. 2006;18(2): 63-67

-
- ¹⁴⁷ Karen L, Wion, Todd G, Aldons J, Lusic, MC. Schotz, Richard M. Lawn. Human Lipoprotein Lipase complementary DNA sequence. *Science* 1987; 235: 1638-1641.
- ¹⁴⁸ Ayyobi AF, Mc Gladdery SH, McNeely ML et al. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 23: 1289-1294.
- ¹⁴⁹ Georgieva AM, van Greevenbroek MMJ, Browsers MCGJ et al. Subclasses of low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein in familial combined hyperlipidemia: relationship to multiple lipoprotein phenotype 2004; 24: 744-749.
- ¹⁵⁰ Austin MA; Breslow JL, Hennekens GH, Buring JE, Willett WC and Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260: 1917-1921.
- ¹⁵¹ Austin MA, King MC, Viranizan KM and Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype: a proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990; 82: 495-506.
- ¹⁵² Nevin DN, Brunzell JD and Deeb SS. The LPL gene in individuals with familial combined hyperlipidemia and decreased LPL activity. *Arterioscler. Tromb.* 1994,14:869-873.
- ¹⁵³ Hoffer MJ, Bredie SJ, Boosma DI, Reymer PW, Kastelein JJ, Demacker PN, Stanlenhoef AF, Havekes LM, Frants RR, The lipoprotein lipase (Asn291→Ser) mutations is associated with elevated lipid levels in families with familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1996; 119: 159-167.

-
- ¹⁵⁴ Gagné EJ, Genest J, Zahag H, Claarke LA and Hayden MR. Analysis de DNA Changes in the LPL gene in patients with familial combined hyperlipidemia. *Arteriocler. Thromb.* 1994; 14: 1250-1257.
- ¹⁵⁵ Bockcmeer FM, Qinghva Liu, Mamotte C, Burke U, Taylor R. Lipoprotein lipase D9N, N291S and S477X polymorphisms: their influence on premature coronary heart disease and plasma lipids. *Atherosclerosis.*2001; 157: 123-129.
- ¹⁵⁶ Witte Koek ME, Pimstone PW, Reymer L Feuth GJ, Botma JC, Defesche et al. A common mutation in the lipoprotein lipase (N291S) alters the lipoprotein phenotype and risk for cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 97: 729-735.
- ¹⁵⁷ Ragazzi H, Day BW, McClure RJ, Kamboh MI. Structure function analysis of D9N and N291 S mutations in human lipoprotein lipase using molecular modelling. *J Mol Graph, Model* 2001; 19(6): 487-494.
- ¹⁵⁸ Mero N, Suurinkeroinen L, Syuänne M, Knudesen P, Uki-Järvinen H, Taskinen M-R. Delayed clearance of postprandial large TG-rich particles in normolipemic carriers of LPL Asn291 Ser gene variant. *J Lipid Res.* 1999; 40: 1663-1670.
- ¹⁵⁹ Pimstone SN, Clee SM, Gague E, Miao L, Zhang H, Stein EA, Hayden MR. A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291Ser) results in altered postprandial chylomicron triglyceride and retinyl palmitate response in normolipidemic carriers. *Journal of Lipid Research* 1996; 37: 1675-1684.

¹⁶⁰ Gerdes C, Fisher RM, Nicaud V, Bore J, Humphries S, talmud P, Faergeman O. lipoprotein lipase variants D9N and N291S are associated with increased plasma triglyceride and lower high-density lipoprotein cholesterol concentrations. Studies in the fasting and postprandial states: The European Atherosclerosis research Studies. *Circulation* 1997; 96: 733-740.

¹⁶¹ Hopkins PN, Heiss G, Ellison C, Province MA, Pankow JS, Eckfeldt JH, Hunt SC. Coronary artery disease in familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia. *Circulation* 2003; 108: 1-5.

¹⁶² National Cholesterol Education Program (NCEP) : Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adults treatment panel III). Final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-3421.

¹⁶³ Lamarche B, St-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Despres JP. A prospective, population-based study of low density lipoprotein particle size as a risk factor for ischemic heart disease in men. *Can J Cardiol* 2001; 17: 859-865.



ANEXO

Short paper

Open Access

Small and dense LDL in familial combined hyperlipidemia and N291S polymorphism of the lipoprotein lipase gene

Antonio López-Ruiz*¹, María M Jarabo¹, María L Martínez-Triguero², María Morales-Suárez-Varela³, Eva Solá^{1,4}, Celia Bañuls^{1,3}, Marta Casado⁵ and Antonio Hernández-Mijares^{1,3,4}

Address: ¹Service of Endocrinology, University Hospital Dr Peset, Valencia, Spain, ²Service of Clinical Analysis, University Hospital La Fe, Valencia, Spain, ³CIBER CB/06/02/0045 research group, CIBER Actions in Epidemiology and Public Health, Valencia, Spain, ⁴Medicine Department, University of Valencia, Valencia, Spain and ⁵Institute of Biomedicina of Valencia (CSIC), CIBERhd, Valencia, Spain

Email: Antonio López-Ruiz* - alru63@hotmail.com; María M Jarabo - jarabo_mar@gva.es; María L Martínez-Triguero - martinez_mlutri@gva.es; María Morales-Suárez-Varela - maria.m.morales@uv.es; Eva Solá - sola_eva@gva.es; Celia Bañuls - Celia.Bañuls@uv.es; Marta Casado - mcasado@ibv.csic.es; Antonio Hernández-Mijares - hernandez_antmij@gva.es

* Corresponding author

Published: 31 March 2009

Received: 12 January 2009

Lipids in Health and Disease 2009, 8:12 doi:10.1186/1476-511X-8-12

Accepted: 31 March 2009

This article is available from: <http://www.lipidworld.com/content/8/1/12>

© 2009 López-Ruiz et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

There is a predominance of small and dense LDL cholesterol particles in familial combined hyperlipidemia (FCH). The lipoprotein lipase gene could exert an influence in these circumstances.

To study the relationship of pattern B LDL and lipids with N291S polymorphism of lipoprotein lipase (LPL) in FCH patients.

Lipid profile, apolipoproteins, diameter of LDL and N291S polymorphism were determined in 93 patients with FCH and 286 individuals from the general population.

FCH patients with N291S polymorphism showed a lower mean diameter of LDL. FCH patients with pattern B LDL showed higher concentrations of triglycerides, VLDLc, non-HDLc and apo B100 and lower levels of HDLc than those with pattern A. Of FCH patients with polymorphism 87.5% presented pattern B and 12.5% pattern A, while patients without polymorphism presented pattern A in 69.2% cases and pattern B in 30.8% cases, with differences being statistically significant ($p < 0.004$). The prevalence of this mutation in our FCH patients was 9.7%.

The prevalence of N291S mutation in our FCH patients was similar to the 9.3% described in Dutch FCHL patients but clearly higher than the 2–5% described for other Caucasian populations. No polymorphism was found in our general population sample. FCH patients with phenotype B of LDL possessed an atherogenic lipid profile. The relationship between small and dense LDL and the presence of the N291S mutation may identify patients with high cardiovascular risk.

Background

A common form of dyslipemia associated with insulin resistance (obesity, diabetes mellitus, familial combined hyperlipidemia) is constituted by the presence of the

atherogenic lipoprotein phenotype, characterized by elevated levels of triglycerides, small LDL particles and reduced HDL cholesterol [1]. This lipid triad frequently occurs in patients with premature coronary disease [2].

Small and dense LDL particles are formed largely as a response to high levels of triglycerides, and increase the risk of coronary heart disease [3]. LDL particles show a bimodal distribution in peak size and can be separated into two phenotypes; pattern A, in which larger, more buoyant LDL predominate, and pattern B, in which smaller, more dense LDL predominate. The National Cholesterol Education Program (ATP III) considers small and dense LDL as a lipid risk factor.

Familial Combined Hyperlipidemia (FCH; MIM 144250) is the most frequent genetic hyperlipidemia. It is characterized by a tendency towards the appearance of coronary disease before 60 years of age [4]. The prevalence of this disease is 1–2% in the general population [5] and 10–20% among patients with premature coronary disease [6]. FCH presents a complex phenotype that is not completely understood, and which can vary between the patient and affected relatives [7]. Therefore, it is difficult to diagnose. It is also characterized by the presence of the atherogenic lipoprotein phenotype and an increase in apolipoprotein B100 [8].

Several genes have been studied in relation with FCH, which is a polygenic disease. One of the genes involved in FCH is lipoprotein lipase (LPL, E.C. 3.1.1.34) [9], a glycoprotein enzyme that plays a key role in the catabolism of lipoproteins rich in triglycerides, such as chylomicrons, and very low density lipoproteins (VLDL). LPL action takes place in endothelial cells surrounding the lumen of capillary vessels, where it adheres to heparan sulphate proteoglycans [10].

More than 80 structural mutations have been detected within the LPL gene. The frequency of these mutations in the general population is estimated to be at least 1/500. These heterozygous mutations are the main cause of some lipid disorders. One of these mutations is N291S localized in exon 6 of LPL [11–13].

The aim of our study was to analyze the relationship of the atherogenic lipoprotein profile, especially the predominance of small and dense LDL, with the prevalence of N291S LPL polymorphism in Spanish patients with FCH from the Community of Valencia with respect to with the general population.

Materials and methods

Our study sample consisted of 33 families with Familial Combined Hyperlipidemia (FCH), with a mean of 4.4 individuals per family, all of them living in the Autonomous Community of Valencia (SE of Spain). From a total of 146 subjects, 93 were diagnosed with FCH according to the criteria of Bredie SJ et al. [14]. Total cholesterol and triglycerides levels superior to the 90th percentile (adjusted to age and gender) and apo B100 values superior to 1.2 g/L represented a diagnosis of FCH in 43 men

and 50 women, aged from 15 to 75 years. In order to assess polymorphism in the general population, 286 genetically independent healthy controls of similar gender and age were randomly selected.

Venous blood was collected for biochemical measurements. Total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were measured through enzymatic methods and high density lipoproteins cholesterol (HDLc) using a direct method in a Beckman LX20 auto analyzer. The intraserial variation coefficient was < 3.5% for all these determinations. When TG values were under 400 mg/dL, LDL cholesterol concentration was calculated using Friedewald's formula [15]. Non-HDL cholesterol was obtained from the difference between total cholesterol and HDL cholesterol. Apolipoproteins AI and B100 were determined by immunonephelometry in a Dade Behring BNII (intra-assay variation coefficient < 5.5%).

LDL B phenotype was measured by polyacrylamide gradient gel electrophoresis (2–16%) using the methodology described by Nichols et al. [16]. The assignment of LDL subclass phenotypes was based on particle diameter: pattern A, mean diameter > 25.5 nm, and pattern B, predominance of small and dense particles with a mean diameter ≤ 25.5 nm [17].

Approval was obtained from the relevant institutional review board, and all participants gave their informed consent.

DNA analysis for RFLP detection in LPL

DNA was extracted from tubes of 15 mL of blood with EDTA-K₃, according to the method of Miller et al. [18], and was conserved at 4 °C until analysis was performed.

N291S was identified after PCR amplification of a 238 bp fragment using the following oligonucleotides: forward 5' GCCGAGATACAATCTTGGTG 3' and reverse 5' CTGCTCTTTGGCTCTGACTGT 3'. Such a polymorphism adds a restriction site for the Ava II enzyme. PCR reaction was performed in 25 µl total volume containing 0.3 mM of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 1× Taq buffer, 2 mM MgCl₂, 100 ng of genomic DNA and 2.5 U Taq polymerase (Netzyme) in a Master-Cycler thermocycler (Eppendorf). PCR was performed by means of a touchdown protocol [19] according to the following conditions: an initial denaturation step of 10 minutes at 94 °C was followed by 4 cycles of 30 seconds at 94 °C, 30 seconds at 60 °C and 45 seconds at 72 °C. This was followed by 20 cycles of 30 seconds at 94 °C, 30 seconds at 60 °C minus 0.5 °C in each cycle and 45 seconds at 72 °C, and then 10 cycles of 30 seconds at 94 °C, 30 seconds at 50 °C and 45 seconds at 72 °C. The final extension consisted of 10 minutes at 72 °C. The PCR product was digested for 4 hours at 37 °C with Ava II and then analyzed with an 8% polyacr-

ylamide gel. If the polymorphism was present, two fragments of 215 and 23 bp (HT+) appeared; if not, the site was destructured in the normal chain, which remained non-digested (238 bp; WT).

Study design

The study was conducted based on a case-control design. Ninety-three FCHL patients were recruited and matched according to sex and age with a control group of 286 subjects from the general population.

Statistics

Between-groups comparison was performed using an ANOVA followed by a parametric t-test. Due to skewed distribution of TG, TG analyses were performed on logarithmically transformed values. Statistical analyses were carried out using the Microsoft Excel Data Analysis Package (Microsoft, Inc.).

The Mann-Whitney nonparametric test was used to compare lipid concentrations in FCH patients with pattern A and those with pattern B. To test differences in triglycerides levels, values were logarithmically transformed prior to statistical analysis.

χ^2 was performed in order to determine whether populations were in Hardy-Weinberg equilibrium and in order to compare different phenotypes. Significance was set at $p < 0.05$.

Statistic analyses were carried out using the SPSS-15.0 program for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

A total of 93 patients, all diagnosed with FCH, were studied: 43 men (46.3%) and 50 women (53.7%), aged between 15 and 75. 286 subjects from the general population were also studied. Lipid parameters are expressed in Table 1. Significant differences were observed between the two groups in all the variables studied. FCH patients showed higher levels of total cholesterol, triglycerides, LDLc, non-HDLc and apo B100, and lower levels of HDLc, apo A and a smaller LDL diameter.

When non-mutated wild-type (WT) and heterozygote (HT) patients were compared, a smaller average diameter of LDL particles was observed among the latter, with the difference being statistically significant. Table 2 shows the lipid values of pattern A patients compared to those of pattern B patients. FCH patients with pattern B LDL displayed higher concentrations of triglycerides, VLDLc, non-HDLc and apo B100 and lower levels of HDLc than FCH patients with pattern A.

Patients with polymorphism presented pattern B in 87.5% of cases and pattern A in 12.5% of cases, while

Table 1: Lipid concentrations in cases (FCH patients) and controls.

	FCH Patients	Controls	P value*
Total cholesterol	238.67 ± 50.10	185.13 ± 28.30	0.001
Triglycerides	204.71 ± 192.16	88.27 ± 42.45	0.001
LDLc	156.85 ± 39.97	113.50 ± 25.20	0.001
HDLc	47.77 ± 17.18	53.93 ± 14.48	0.001
VLDLc	40.28 ± 36.52	17.65 ± 8.49	0.001
Non-HDLc	192.94 ± 48.68	131.50 ± 29.09	0.001
Apo AI	133.55 ± 32.52	152.79 ± 29.03	0.001
Apo B100	125.80 ± 28.11	95.25 ± 21.15	0.001
LDL diameter	25.45 ± 0.78	26.14 ± 0.74	0.001

* ANOVA Test

Values are expressed as mean ± standard deviation. Units are mg/dL in all parameters except LDL diameter (nm).

patients without polymorphism presented pattern A in 69.2% of cases and pattern B in 30.8% of cases. These differences were statistically significant ($p < 0.004$).

N291S polymorphism of LPL occurred in 9.7% of FCH patients, while no individual in the study sample from the general population presented this mutation. Both samples were in Hardy-Weinberg equilibrium, as the patients showed a $\chi^2 = 0.216$ and $2p = 0.6423$ and the general population a $\chi^2 = 0$ and $2p = 1$.

Discussion

FCH is a disease with a complex phenotype that is not completely understood, and remains difficult to diagnose. This dyslipemic syndrome is associated with disturbances in all lipoprotein fractions. The key underlying abnormality of this condition is elevation of VLDL due to overproduction or defective catabolism [20]. Small and dense LDL is the final expression of this catabolism. These particles are more easily oxidized and display a higher affinity for the extracellular matrix and a higher degree of retention in arterial wall than their larger, normal-sized coun-

Table 2: Lipid concentrations in FCH patients with pattern A and pattern B

	Pattern A (n = 26)	Pattern B (n = 27)	P-value*
Total cholesterol	227.88 ± 41.86	238.03 ± 50.86	0.450
Triglycerides	127.80 ± 65.77	344.55 ± 234.40	0.001
HDLc	55.00 ± 18.54	35.59 ± 7.94	0.001
LDLc	147.50 ± 34.64	149.06 ± 53.11	0.569
VLDLc	25.53 ± 13.11	65.34 ± 43.71	0.001
Non-HDLc	172.88 ± 32.40	202.44 ± 50.71	0.022
Apo AI	144.00 ± 39.87	121.33 ± 20.49	0.029
Apo B100	118.13 ± 22.22	133.69 ± 30.21	0.042
ApoB/ApoA	0.90 ± 0.29	1.50 ± 0.35	0.022
Diameter	26.06 ± 0.57	24.86 ± 0.42	0.001

* Mann-Whitney test

Values expressed as mean ± Standard Deviation. Units are mg/dL in all parameters

terparts [21]. Small and dense LDL has been accepted as an emergent cardiovascular risk factor by the National Cholesterol Education Programme (Adult Treatment Panel III) [22], as many studies have demonstrated that the predominance of these particles is associated with an increase in cardiovascular risk more than classic lipid variables [23,24]. FCH patients with phenotype B of LDL show a clearly atherogenic lipid profile. There is evidence that hypolipidemic treatment can modify the distribution of LDL subclasses [25]. Very high risk patients, including those with this atherogenic lipoprotein profile, may benefit from more potent lipid-lowering therapies [26].

It has been suggested that FCH is a heterogeneous and oligogenic disease [27]. One of the genes likely to exert an influence in this disease is the lipoprotein lipase gene. Many codon polymorphisms of the LPL gene have been described, some of them associated with alterations of the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins [28]. One of the most frequent polymorphisms is located in exon 6 (rs268, c. 1128 A>G; N291S) [29]. The prevalence of this mutation in our FCH patients was 9.7%, which is similar to the 9.3% described for Dutch FCH patients [5] but considerably higher than the 2-5% described for other Caucasian populations [30]. No polymorphism was detected in the sample from the general population, which reflects findings in other populations [5] in which no carriers were found, suggesting that the N291S mutation is more frequent among FCH patients. The mutation is likely to affect postprandial lipemia by altering its enzymatic activity [31], resulting in an increase of VLDL particles and high concentrations of apo B100 and leading to the appearance of a greater number of small and dense LDL particles as the final and most important expression of the catabolism of triglyceride-rich lipoprotein particles [32]. In this way, the FCH phenotype of patients with the polymorphism is negatively affected, with altered postprandial responses to fat-rich meals being described, even in patients that were initially normolipemic [33].

These previously published data coincide with our results; polymorphism-carrier patients have been reported to present a smaller LDL diameter, suggesting a clearly atherogenic alteration of the metabolism of triglyceride-rich particles [34]. In fact, in some studies regarding FCH, this polymorphism has been related to patients who had previously presented an ischemic cardiopathy [11].

In our study, patients with the N291S polymorphism showed a smaller average LDL diameter, corresponding with pattern B and constituting the final expression of the alteration of the metabolism of triglyceride-rich particles. This represents a higher cardiovascular risk among such patients. On the other hand, most patients without this polymorphism had pattern A, constituting a clear differ-

ence between both groups. We are aware of the limitations of this study in relation to the number of patients with the polymorphism. Unfortunately, its low prevalence among the general population makes it difficult to conduct a genetic study with a large number of patients that would permit us to draw more solid conclusions. That said, our data show important differences between the two patterns.

In conclusion, FCH patients with pattern B of LDL show a clearly atherogenic lipid profile. The relationship between small and dense LDL and the presence of the allele encoding for N291S mutation of the LPL gene, present in a high percentage of our FCH patients, could disrupt the phenotype of the disease by altering the clearance of triglyceride-rich lipoproteins. Such phenotype expression is the basis for a more atherogenic profile. Therefore, based on our results in FCH patients in the Autonomous Community of Valencia, the cardiovascular risk of those with pattern B of LDL who carry this polymorphism could be considerably reduced through rigorous treatment of Hyperlipemia.

Abbreviations

FCH: Familial combined hyperlipidemia; LPL: lipoprotein lipase; WT: non-mutated wild-type; HT: Heterozygote.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AH-M, AL-R and MM-T participated in the design of the study, MJ, AL-R and MM-T carried out the laboratory studies. CB and MM performed the statistical analysis and interpretation of data. MC and AL-R carried out the molecular genetic studies. ES and AH-M have been involved in the revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

MC was supported by grant SAF2006-06760 from CICYT, Spain and by a grant from Instituto de Salud Carlos III (Red de Centros FIS-RECAVA RD06/0014/0025).

References

1. Grundy SM: **Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia and the metabolic syndrome.** *Am J Cardiol* 1998, **81(4A)**:18B-25B.
2. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM: **Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk.** *Circulation* 1990, **82**:495-506.
3. St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, Mauriège P, Bernard PM, Després JP, Lamarche B: **Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Quebec Cardiovascular Study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**:553-559.
4. Eurlings PM, Kallen CJ van der, Geurts JM, van Greevenbroek MM, de Bruin TW: **Genetic dissection of familial combined hyperlipidemia.** *Mol Genet Metab* 2001, **74**:98-104.

5. Hoffer MJV, Bredie SJH, Boomsma DI, Reymers PWA, Kastelein JJP, de Knijff P, Demacker PNM, Stalenhoef AFH, Havekes LM, Franss RR: **The lipoprotein lipase (Asn291-Ser) mutation associated with elevated lipid level families with familial combined hyperlipidaemia. Atherosclerosis** 1996, **119**:159-167.
6. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG: **Hyperlipidemia in coronary heart disease II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. J Clin Invest** 1973, **52**:1544-1568.
7. Porkka KV, Nuotio I, Pajukanta P, Ehnholm C, Suurinkeroinen L, Svanne M, Lehtimäki T, Lahdenkari AT, Lahdenperä S, Ylitalo K, Antikainen M, Perola M, Raitakari OT, Kovanen P, Viikari JS, Peltonen L, Taskinen MR: **Phenotype expression in familial combined hyperlipidemia. Atherosclerosis** 1997, **133**:245-253.
8. Ayyobi AF, McCladdery SH, McNeely MJ, Austin MA, Motulsky AG, Brunzell JD: **Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2003, **23**:1289-1294.
9. Hu Y, Liu W, Huang R, Zhang X: **A systematic review and meta-analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn291Ser variant and diseases. J Lipid Res** 2006, **47**:1908-1914.
10. Enerback S, Gimble JM: **Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulator at the transcriptional and post-transcriptional level. Biochem Biophys Acta** 1993, **1169**:107-125.
11. Gerdes C, Fisher RM, Nicaud V, Boer J, Humphries SE, Talmud PJ, Faergeman O: **Lipoprotein lipase variants D9N and N291S are associated with increased plasma triglyceride and lower high-density lipoprotein cholesterol concentrations: studies in the fasting and postprandial states: the European Atherosclerosis Research Studies. Circulation** 1997, **96**:733-740.
12. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Abildgaard S, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG: **A common substitution (Asn291Ser) in Lipoprotein Lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease. J Clin Invest** 1997, **99**:1606-1613.
13. Reymers PW, Groenemeyer BE, Gagné E, Miao L, Appelman EE, Seidel JC, Kromhout D, Bijvoet SM, Oever K van de, Bruin T, Hayden MR, Kastelein JJP: **A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291Ser) contributes to the expression of familial combined hyperlipidemia. Hum Mol Genet** 1995, **4**:1543-1549.
14. Bredie SJ, Demacker PN, Stalenhoef AF: **Metabolic and genetic aspects of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on low-density lipoprotein heterogeneity. Eur J Clin Invest** 1997, **27**:802-811.
15. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS: **Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge. Clin Chem** 1972, **18**:499-502.
16. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA: **Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. Methods Enzymol** 1986, **128**:417-431.
17. Austin MA, Hokanson JE, Brunzell JD: **Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance. Curr Opin Lipidol** 1994, **5**:395-403.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res** 1988, **16**(3):1215.
19. Hecker KH, Roux KH: **High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and step-down PCR. Biotechniques** 1996, **20**:478-485.
20. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J: **Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2008, **28**:1225-1236.
21. Packard CJ: **Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease. Curr Opin Lipidol** 2006, **17**:412-417.
22. Rajman I, Echo PI, Chowieńczyk PJ, Riter JM: **LDL particle size: an important drug target? Br J Clin Pharmacol** 1999, **48**:125-133.
23. Grundy SM, Cleeman JJ, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ, National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association: **Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. Circulation** 2004, **110**:227-239.
24. Jarvik GP, Brunzell JD, Austin MA, Krauss RM, Motulsky AG, Wijsman E: **Genetic predictors of FCH in four large pedigrees. Influence of ApoB level major locus predicted genotype and LDL subclass phenotype. Arterioscler Thromb** 1994, **14**:1687-1694.
25. Nevin DN, Brunzell JD, Deeb SS: **The LPL gene in individuals with familial combined hyperlipidemia and decreased LPL activity. Arterioscler Thromb** 1994, **14**:869-873.
26. Van Bockmeyer FM, Liu Q, Mamotte C, Burke U, Taylor R: **Lipoprotein lipase D9N, N291S and S447X polymorphisms: their influence on premature coronary heart disease and plasma lipids. Atherosclerosis** 2001, **157**:123-129.
27. Wittekoek ME, Pimstone SN, Reymers PW, Feuth L, Botma GJ, Defeseche JC, Prins M, Hayden MR, Kastelein JJP: **A common mutation in the lipoprotein lipase (N291S) alters the lipoprotein phenotype and risk for cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. Circulation** 1998, **97**:729-735.
28. Razzaghi H, Day BW, McClure RJ, Kambh M: **Structure-function analysis of D9N and N291S mutations in human lipoprotein lipase using molecular modelling. J Mol Graph Model** 2001, **19**:487-494, 587-590.
29. Georgieva AM, van Groenenbroek MM, Krauss RM, Brouwers MC, Vermulden VM, Robertus-Teunissen MG, Kallen CJ van der, de Bruin TW: **Subclasses of low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein in familial combined hyperlipidemia: relationship to multiple lipoprotein phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2004, **24**:744-749.
30. Pimstone SN, Clew SM, Gagne SE, Miao L, Zhang H, Stein EA, Hayden MR: **A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291Ser) results in altered postprandial chylomicron triglyceride and retinyl palmitate response in normolipidemic carriers. J Lipid Res** 1996, **37**:1675-1684.
31. Hopkins PN, Heiss G, Ellison RC, Province MA, Pankow JS, Eckfeldt JH, Hunt SC: **Coronary artery disease risk in familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia: a case-control comparison from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. Circulation** 2003, **108**:519-523.
32. National Cholesterol Education Program (NCEP): **Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III); Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP); Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III) final report. Circulation** 2002, **106**:3143-3421.
33. Vakkilainen J, Steiner G, Ansquer JC, Aubin F, Rattier S, Foucher Ch, Hamsten A, Taskinen MR, DAIS Group: **Relationships between low-density lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease: the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS). Circulation** 2003, **107**:1733-1737.
34. Hurt-Camejo E, Camejo G, Sartipy P: **Phospholipase A2 and small, dense low-density lipoprotein. Curr Opin Lipidol** 2000, **11**:465-471.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

