

**EFFECTO DE VARIANTES POLIMÓRFICAS EN LOS GENES  
ABCG5/ABCG8 SOBRE LAS CONCENTRACIONES  
PLASMÁTICAS DE COLESTEROL HDL EN PACIENTES CON  
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR HETEROCIGOTA**

**ANTONIO GARCÍA RÍOS**

TITULO: *Efecto de variantes polimórficas en los genes ABCG5/ABCG8 sobre las concentraciones plasmáticas de colesterol DHL en pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigota*

AUTOR: ANTONIO GARCIA RIOS

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

ISBN-13: 9788478019625  
D.L.: CO-195-2010

# ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>5</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>1.</b>	<b>DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR (HF).....</b>	<b>7</b>
<b>2.</b>	<b>IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA HF HETEROCIGOTA (HFh).....</b>	<b>9</b>
	2.1. Problema de Salud Pública Internacional.....	9
	2.2. Hipercolesterolemia Familiar en la infancia.....	11
<b>3.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DE LA HFh.....</b>	<b>13</b>
	3.1. Características clínicas.....	13
	3.2. Características bioquímicas.....	16
	3.3. Diagnóstico clínico de la HFh.....	23
	3.4. Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en HFh.....	25
<b>4.</b>	<b>GENÉTICA DE LA HFh.....</b>	<b>28</b>
	4.1. Receptor de c-LDL (RLDL).....	28
	4.2. Diagnóstico genético.....	32
<b>5.</b>	<b>PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE COLESTEROL DEPENDIENTES DE ATP G5/G8 (ABCG5/G8).....</b>	<b>35</b>
	5.1. Homeostasis del colesterol.....	35
	5.2. Estructura y función de ABCG5/G8.....	37
	5.3. Regulación de ABCG5/G8.....	42
	5.4. Papel de ABCG5/G8 en la enfermedad cardiovascular.....	46

<b>III. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....</b>	<b>50</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>V. DISEÑO y METODOLOGÍA.....</b>	<b>52</b>
<b>1. COHORTE ESPAÑOLA DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR HETEROCIGOTA.....</b>	<b>52</b>
1.1 Funciones de las Unidades de Lípidos implicadas.....	52
1.2 Descripción de las visitas.....	54
<b>2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....</b>	<b>57</b>
2.1 Proceso de selección de los participantes.....	57
2.2 Criterios de inclusión.....	58
2.3 Criterios de exclusión.....	58
2.4 Cálculo del tamaño muestral.....	58
<b>3. DISEÑO DEL ESTUDIO.....</b>	<b>59</b>
<b>4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS Y BIOQUÍMICAS.....</b>	<b>60</b>
4.1 Extracción y almacenamiento de las muestras de sangre.....	60
4.2 Determinaciones bioquímicas básicas.....	61
4.3 Cuantificación de LDL oxidada y lipoperóxidos.....	62
<b>5. ANÁLISIS GENÉTICO.....</b>	<b>63</b>
5.1 Aislamiento del ADN.....	63
5.2 Genotipaje de los polimorfismos en los genes <i>ABCG5/G8</i> .....	63
<b>6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>68</b>
<b>7. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>69</b>

<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
1. <b>CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES.....</b>	<b>70</b>
2. <b>DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS</b>	
<b>ESTUDIADOS EN LOS GENES <i>ABCG5/G8</i>.....</b>	<b>71</b>
2.1 Distribución y frecuencia del polimorfismo (SNP) Y54C en el gen	
<i>ABCG8</i> .....	72
2.2 Frecuencia de otros SNPs estudiados en los genes <i>ABCG5/G8</i> .....	73
3. <b>DISTRIBUCIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E EN LA</b>	
<b>POBLACIÓN A ESTUDIO.....</b>	<b>74</b>
4. <b>EFFECTO DEL POLIMORFISMO Y54C EN EL GEN <i>ABCG8</i></b>	
<b>SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS....</b>	<b>77</b>
4.1 Asociación del SNP Y54C con las concentraciones de lípidos	
plasmáticos.....	77
4.2 Interacciones del SNP Y54C con variables de riesgo en pacientes con	
HFh.....	85
5. <b>EFFECTO DE OTROS SNPs EN LOS GENES <i>ABCG5/G8</i> SOBRE</b>	
<b>LAS CONCENTRACIONES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS.....</b>	<b>86</b>
5.1 Asociación con las concentraciones de lípidos plasmáticos.....	86
5.2 Interacciones con variables de riesgo en pacientes con HFh.....	92
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<b>VIII.    CONCLUSIONES.....</b>	<b>108</b>
<b>IX.    ABREVIATURAS.....</b>	<b>110</b>
<b>X.    REFERENCIAS.....</b>	<b>113</b>

## I. RESUMEN

**Introducción:** La Hipercolesterolemia Familiar (HF) es un desorden monogénico con una gran variabilidad interindividual en cuanto a expresión clínica, incluso en pacientes portadores de la misma mutación. Esto indica, que otros factores ambientales, genéticos o bien interacciones genes-ambiente, podrían jugar un importante papel.

**Hipótesis de trabajo:** Los transportadores ABCG5/G8 ejercen un papel fundamental en el balance neto del metabolismo lipídico, principalmente sobre el c-HDL debido al papel que desempeñan dentro de la vía del transporte reverso del colesterol. La presencia de determinados polimorfismos en los genes *ABCG5/G8* podría influir en el papel fisiológico de estos transportadores, modificando las concentraciones finales de lípidos plasmáticos.

**Objetivo principal:** Analizar si la presencia del polimorfismo Y54C en el gen del transportador *ABCG8* y otros SNPs seleccionados en los genes *ABCG5/G8* (i17892A>G, i18429C>T, Gln604GluC>G, i11836G>A / 5U145T>G, Asp19HisG>C, i14222T>C, Thr400LysG>T), modulan las concentraciones de c-HDL en pacientes con HF heterocigota (HFh).

**Objetivos secundarios:** Determinar el efecto de dichos polimorfismos sobre las concentraciones finales de colesterol total (CT), c-LDL, triglicéridos (TG), ApoA-I, ApoB y lipoproteína A, así como su influencia sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo (lipoperóxidos y LDL oxidada). Estudiar interacciones entre estos SNPs y variables de riesgo en HFh (sexo, tabaco, obesidad, presencia de arco corneal y/o xantomas).

**Población, diseño y metodología:** Los polimorfismos fueron genotipados en 586 pacientes con un diagnóstico genético de certeza de HF. Este diagnóstico se realizó mediante técnicas de ADN-microarray. Las determinaciones clínicas y bioquímicas fueron realizadas por un protocolo y procedimientos previamente establecidos.

**Resultados:** Los individuos portadores del alelo A para el SNP i11836G>A y los individuos homocigotos GG para el SNP Y54C presentaron mayores concentraciones de c-HDL. A su vez, los sujetos portadores del SNP Gln604GluC>G y los homocigotos

GG para Y54C, presentaron menores concentraciones de TG. Además, se observó una interacción entre algunos de los SNPs estudiados y el hábito tabáquico. De esta manera, ser fumador y portador del alelo minoritario para los SNPs i7892A>G, i18429C>T, i11836G>A en el gen *ABCG5* y 5U145T>G en el gen *ABCG8*, está relacionado con menores concentraciones de c-HDL y mayores niveles de CT, TG y de c-VLDL, respectivamente. Además, ser portador del alelo minoritario T y G para los SNPs i18429C>T y Gln604GluC>G en el gen *ABCG5* está relacionado con menores concentraciones de TG, solamente en sujetos no fumadores.

**Conclusiones:** La presencia de determinados SNPs en los genes *ABCG5/G8* modulan las concentraciones de lípidos plasmáticos en pacientes con HF. Este efecto a su vez, puede verse influenciado por la presencia del tabaco.

**Este trabajo carece de conflicto de intereses**

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

La Hipercolesterolemia Familiar (HF) es una enfermedad autosómica dominante (AD) caracterizada por muy altas concentraciones plasmáticas de colesterol vehiculizado por las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), depósitos anormales de colesterol (xantomas tendinosos y arco corneal) y un incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular prematura (ECV), especialmente coronaria<sup>1, 2</sup>. Se engloba dentro de las llamadas hipercolesterolemias autosómicas dominantes (HAD) y es el trastorno hereditario monogénico más frecuente<sup>3, 4</sup>.

El defecto principal de esta enfermedad se produce por una mutación en el gen que codifica el receptor de las LDL (RLDL), que se encuentra en el cromosoma 19<sup>5-7</sup>. La presencia de dicha mutación hace que estos receptores estén ausentes o bien que funcionen de manera anómala, lo que tendrá como consecuencia una disminución del aclaramiento del c-LDL del plasma. Ello implica un alto riesgo coronario, por lo que esta enfermedad es una de las principales causas del desarrollo de arteriosclerosis precoz.

La HF es una enfermedad hereditaria que se expresa desde el nacimiento. La persona afectada de HF, tiene el 50% de probabilidades de transmitir el gen anormal a sus descendientes, y un 50% de traspasar la información genética correcta. Por lo tanto, aproximadamente la mitad de los miembros de una familia desarrollará también HF. La penetrancia de la enfermedad es de casi el 100% y afecta por igual a los dos sexos. En la mayoría de los casos, si un niño o adulto, hijo de un paciente con HF, tiene valores normales de colesterol probablemente este sujeto no habrá heredado la enfermedad. Sin embargo, pueden existir hasta un 8% de personas portadoras de una mutación con valores normales de colesterol, especialmente en la edad joven. En este caso, el paciente padece la enfermedad y por tanto puede transmitir el gen defectuoso a su descendencia, de ahí la importancia que adquiere llegar a un diagnóstico de certeza de la enfermedad a través del diagnóstico genético.



Dentro de la HF podemos encontrar 2 variantes, según el mecanismo de transmisión implicado. Entre estas 2 variantes, encontraremos importantes diferencias en cuanto a frecuencia, expresión clínica y pronóstico, **tabla 1**. Así, la HF la podemos dividir en:

a) Hipercolesterolemia familiar heterocigota (HFh): el sujeto hereda uno de los alelos defectuoso, mientras que el otro es normal. En este caso, el paciente tiene el 50% de la dotación de RLDL normofuncionantes, y el resto están ausentes o no funcionan adecuadamente. Esto se traducirá en un menor aclaramiento del c-LDL del plasma, elevando su concentración por encima de 2-3 veces los valores normales. Aproximadamente, la mitad de aquellos pacientes desarrollará xantomas tendinosos, xantelasmas y arco corneal prematuro (< 45 años), así como enfermedad coronaria prematura (ECP) antes de la cuarta o quinta década. Se estima que 1 de cada 500 personas en la población general presenta HFh. En España se calcula que entre 80.000-100.000 personas la padecen <sup>8,9</sup>.

b) Hipercolesterolemia familiar homocigota (HFH): se heredan ambos alelos defectuosos, lo que produce una ausencia prácticamente total de RLDL. Al disponer de una menor cantidad de RLDL, la concentración de c-LDL alcanzará cifras superiores a 5 veces los valores normales, lo que hace que estos sujetos desarrollen una severa arteriosclerosis. Esto conducirá a la presencia de ECP con menos de 20 años <sup>10-13</sup>. Afortunadamente, su prevalencia es mucho menor, estimándose 1 por cada millón de personas.

**Tabla 1.** Fenotipo de la Hipercolesterolemia Familiar

	<b>HETEROCIGOTA</b>	<b>HOMOCIGOTA</b>
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	350-500	600-1200
<b>c-LDL (mg/dL)</b>	250-420	700-800
<b>Xantomas tendinosos</b>	30-40%	Alta prevalencia
<b>Enfermedad coronaria</b>	> 25 años	< 25 años
<b>Desorden genético</b>	RLDL: 1 alelo	RLDL: 2 alelos

\*Frecuencia de sujetos con diagnóstico clínico entre los que se encuentra mutación en el RLDL (heterocigota/homocigota) tras el análisis genético

## **2. IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR HETEROCIGOTA (HFh)**

### **2.1. Problema de Salud Pública Internacional**

La HF es uno de los desórdenes hereditarios monogénicos más frecuentes entre la población general. Como hemos reseñado previamente, la frecuencia de HFh es de aproximadamente 1/500 sujetos en la mayoría de los países, mientras que en la forma homocigota es de 1 caso por cada millón de personas. Sin embargo, en algunas poblaciones como la de Canadienses Franceses, Africanos en Sudáfrica, Libaneses y Finlandeses, esta prevalencia cambia mucho y es más alta a la descrita anteriormente <sup>14-16</sup>.

Se estima que existen en torno a 10 millones de personas afectas de HF a lo largo del mundo. De éstos, menos del 10% están diagnosticados, y a su vez dentro de éstos menos del 25% están correctamente tratados con fármacos hipolipemiantes. En España se ha estimado que casi 100.000 personas podrían estar afectadas de HFh y el riesgo de complicaciones cardiovasculares en este grupo de población es 5 veces superior al riesgo de la población general.

La HFh es un problema de Salud Pública debido a la alta incidencia de ECV prematura (< 55 años en hombres y < 60 años en mujeres) que conlleva la enfermedad y por la reducción en las expectativas de vida observada en las familias con HFh <sup>17, 18</sup>. El primer informe que describió un riesgo cardiovascular aumentado en HFh, demostró una posibilidad del 51 % de enfermedad coronaria fatal o no fatal en hombres y un riesgo correspondiente del 12 % en mujeres (ambos calculados para una edad de 50 años) <sup>19</sup>. Aproximadamente el 85% de los hombres y el 50% de las mujeres presentarán un evento coronario antes de los 65 años de edad si no son adecuadamente tratados <sup>20</sup>. En España, según datos del Registro Español de HFh, el 55% de los varones y el 22% de las mujeres con HF incluidas en el mismo, han desarrollado alguna manifestación de

ECV antes de los 60 años <sup>8</sup>. Hasta el 9% del total de ECP en el este de Finlandia <sup>21</sup> y Alemania <sup>22, 23</sup>, está asociada con HF.

Numerosos estudios han demostrado que la principal causa de muerte en pacientes con HFh es la ECP <sup>24, 25</sup>. Se estima que cerca de 200.000 personas mueren cada año por ECP debida a HF. A su vez, se ha demostrado también que la HFh no tratada, acorta la esperanza de vida en una media de 25 años con respecto a la población general, ya que las personas con esta hipercolesterolemia fallecen de ECP <sup>26</sup>. En cambio, si los pacientes son identificados a edades tempranas y tratados adecuadamente, la esperanza de vida es similar a la del resto de la población general. Por todas estas razones, resulta crucial la temprana identificación de los pacientes con HFh y sus familiares, con el fin de empezar con el tratamiento adecuado de manera temprana de cara a la prevención de ECP y muerte en esta población.

En la última década, varios nuevos fármacos se han desarrollado con el fin de optimizar el tratamiento de pacientes con enfermedades de alto riesgo cardiovascular como HFh <sup>27</sup>. Hoy en día, hay suficiente evidencia que demuestra que la mortalidad y morbilidad cardiovascular se ve reducida con el uso de estatinas en pacientes de alto riesgo <sup>28-32</sup>, aunque para los pacientes con HF la evidencia es más escasa <sup>18, 33</sup>. Un reciente estudio llevado a cabo en España por Alonso y colaboradores <sup>34</sup>, evalúa la eficiencia de distintas estrategias preventivas en pacientes con HF, mediante un modelo de coste-efectividad en el que utilizan una estatina en monoterapia a distintas dosis y un tratamiento combinado. Ellos concluyen que el manejo preventivo con distintas estrategias terapéuticas resulta eficiente.

Otros estudios han analizado diferentes aspectos relacionados con la enfermedad. Así, trabajos realizados sobre calidad de vida en pacientes con HF demuestran que no existen diferencias con respecto a la población general, aunque en algún estudio se manifiesta que sí existe preocupación por el riesgo de ECP <sup>35, 36</sup>. En este sentido Hyttinen y colaboradores <sup>37</sup>, estudiaron recientemente la calidad de vida en pacientes mayores de 65 años y concluyen que la HF no está asociada con pobre calidad de vida en personas que superan los 65 años. En sus conclusiones destacan que aquellos sujetos se caracterizaron por llevar un estilo de vida saludable y por un tratamiento a largo plazo con estatinas.

En resumen, el diagnóstico precoz y adecuado tratamiento de los pacientes con HFh aumenta la supervivencia de esta población manteniendo al mismo tiempo una buena calidad de vida.

## **2.2. Hipercolesterolemia Familiar en la infancia**

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en España. Su impacto demográfico, sanitario y social está aumentando y va a continuar haciéndolo en las próximas décadas. Por ello, la adecuada detección y tratamiento de la hipercolesterolemia así como del resto de los factores de riesgo es fundamental para prevenir las enfermedades cardiovasculares.

El proceso aterosclerótico comienza ya en la niñez y progresa lentamente en la adolescencia, pudiendo conducir con posterioridad al desarrollo de cardiopatía isquémica. Los factores de riesgo de aterosclerosis, siendo la hipercolesterolemia uno de los principales, actúan desde las primeras décadas de la vida <sup>38-40</sup>.

La HFh es un desorden monogénico que se expresa ya desde el nacimiento y se caracteriza por la exposición a elevadas concentraciones de c-LDL. Sin tratamiento, los individuos afectados pertenecientes al grupo de edades comprendidas entre los 20 y los 39 años tienen 100 veces más riesgo de desarrollar ECP que los individuos no afectados de su mismo grupo de edad <sup>17</sup>. Numerosos estudios, han demostrado que ya desde la infancia, los niños afectados de HF tienen evidencia de disfunción endotelial <sup>41, 42</sup> y de afectación del grosor de la íntima-media arterial <sup>43-46</sup>. Como consecuencia de estas observaciones, han sido documentados casos de isquemia miocárdica y de estenosis de arterias coronarias en adultos jóvenes con este desorden <sup>47, 48</sup>. Nicholls y colaboradores <sup>49</sup>, demostraron recientemente que era claramente beneficiosa la identificación precoz de los individuos afectados de HFh, así como la efectividad del tratamiento a edades tempranas.

Todos estos hallazgos, apoyan fuertemente que el comienzo del tratamiento debería realizarse en la juventud. Basados en la eficacia y seguridad del uso de estatinas en adultos con HFh, varios estudios se han llevado a cabo sobre niños. Todos estos estudios llegan a la conclusión de que las estatinas reducen los niveles de c-LDL, inducen regresión de la aterosclerosis a nivel arterial y no tienen efectos adversos sobre el crecimiento, maduración sexual, niveles hormonales ni efectos adversos a nivel muscular o hepático <sup>50,51</sup>.

Recientemente, se ha publicado un metaanálisis llevado a cabo por Avis y colaboradores <sup>52</sup>, en el que se ha evaluado la eficacia y particularmente la seguridad de la terapia con estatinas en niños con HFh. En esta revisión sistemática, se demuestra que el uso de estatinas reduce significativamente el colesterol total (CT), c-LDL y la ApoB, así como que aumenta de forma significativa las concentraciones de c-HDL y ApoA-I. Además, no se encontraron diferencias entre los grupos en cuanto a los parámetros de seguridad establecidos salvo unas mínimas diferencias en el crecimiento que favorecieron al grupo tratado. Estos hallazgos apoyan la eficacia y seguridad del uso de estatinas en niños con HFh.

En conclusión, la HFh es una enfermedad con alto riesgo cardiovascular que se expresa ya desde el nacimiento por lo que resulta imprescindible un diagnóstico precoz, quedando ampliamente demostrado la efectividad y seguridad a largo plazo del tratamiento a edades tempranas <sup>53</sup>.

### 3. CARACTERÍSTICAS DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR HETEROCIGOTA

#### 3.1. Características clínicas

En la práctica clínica habitual, el fenotipo de los pacientes con HFh se encuentra con más frecuencia que el presentado por los pacientes con HFH. Típicamente, la primera manifestación de los pacientes con HFh ha sido la presencia de ECP, aunque hoy en día gracias a los avances en el diagnóstico (sobre todo genético) y prevención de la enfermedad, se puede llegar al diagnóstico de una manera más temprana<sup>54-57</sup>. Esto último, junto a la mejora en el tratamiento de la enfermedad con modernas drogas, ha mejorado de manera considerable el pronóstico de estos pacientes<sup>58-60</sup>.

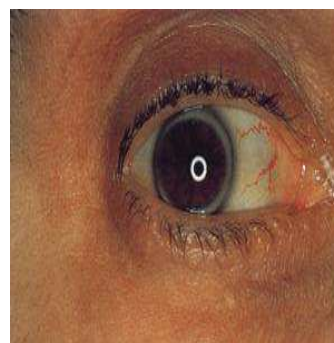
Los criterios clínicos utilizados para la identificación de los pacientes con HF se basan principalmente en las concentraciones elevadas de colesterol total, a expensas de c-LDL (por encima del percentil 95 de los valores de la población de referencia), en la historia familiar de hipercolesterolemia grave y/o de ECV prematura y en los depósitos anormales de colesterol en tejidos extravasculares (arco corneal y/o xantomas tendinosos). Los signos físicos más importantes a tener en cuenta dentro de los pacientes con HF será la búsqueda de depósitos anormales de colesterol. Estos depósitos se van a localizar principalmente en tendones, córnea y piel, aunque puede haber otras localizaciones (**Figura 1**).



A) Xantoma tendinoso



B) Xantelama



C) Arco corneal

**Figura 1.** *Depósitos anormales de colesterol: xantoma tendinoso (A), xantelasma (B) y arco corneal (C). Libro: Cardiopatía en la mujer adulta. Cap. XII: comorbilidades. Chappuis J.M, 2005.*

En HF, por tanto, las cifras elevadas de c-LDL desde los primeros años de la vida también se asocian al depósito de colesterol en tejidos extravasculares. En pacientes con HFh estas manifestaciones no aparecen, usualmente, hasta los 25-30 años mientras que en los pacientes con HFH estas lesiones son ya evidentes antes de los 10 años.

El depósito de colesterol en los tendones constituye una lesión denominada “xantoma”<sup>61, 62</sup>. Los xantomas se producen por un depósito de lípidos muy semejante al que ocurre en la lesión vascular arteriosclerótica, con proliferación de células espumosas (macrófagos cargados de lípidos) y acumulación extracelular de colesterol en el intersticio perivascular de las fibras tendinosas. Los xantomas tendinosos son característicos de la HFh, pero también se pueden encontrar en otras alteraciones lipídicas, tanto primarias, como la xantomatosis cerebrotendinosa<sup>63</sup>, la disbetalipoproteinemia<sup>64</sup> y la fitosterolemia<sup>65, 66</sup>, como secundarias, destacando la hipercolesterolemia de la cirrosis biliar primaria<sup>67</sup>.

Los xantomas suelen localizarse en los tendones de Aquiles, aunque también se detectan en los codos y en los nudillos de las manos. Para su palpación se requiere experiencia y constituye la base del diagnóstico clínico de HF. A veces, la identificación mediante el examen físico no es fácil y se ha demostrado que el examen mediante ultrasonidos puede aumentar la sensibilidad del diagnóstico<sup>68-73</sup>.

Se desconoce la razón por la que unos pacientes desarrollan xantomas y otros no, a pesar de tener cifras similares de c-LDL e incluso tener la misma mutación en el gen del RLDL<sup>74</sup>. Una de las hipótesis que se baraja, es la baja sensibilidad que puede tener el examen físico directo del paciente, es decir que el diagnóstico de xantomas mediante el examen físico es subjetivo, ya que depende de la experiencia clínica del médico y en ocasiones, su detección puede estar dificultada por la existencia de irregularidades o nódulos en los tendones. Asimismo, pacientes que hayan practicado deporte durante muchos años o que hayan sufrido un traumatismo en los tendones

(rupturas fibrilares, esguinces, etc) pueden tener un engrosamiento del tendón que puede hacer dudar a la hora de considerarlo como xantoma.

En la práctica clínica habitual existen unos criterios clínicos descritos por el grupo *MEDPED* (*Make Early Diagnosis to Prevent Early Death*) holandés <sup>75</sup> en el que se establece un *score* para el diagnóstico clínico de HFh. Mediante la utilización de estos criterios clínicos, la mera detección de xantomas tendinosos proporciona un diagnóstico de probabilidad de HF (6 puntos). Por este motivo, la identificación de los xantomas es crucial para el diagnóstico de esta entidad en la práctica clínica habitual y su trascendencia puede ir más allá del mero diagnóstico ya que se ha demostrado que su presencia, por sí sola, puede suponer un aumento del riesgo de ECV <sup>76</sup>.

El depósito anormal de colesterol en la córnea se conoce con el nombre de arco corneal y su presencia, con menos de 45 años, supone una puntuación de 4 puntos dentro del *score* establecido por el grupo *MEDPED* holandés para el diagnóstico clínico de HFh, estableciendo un diagnóstico de posibilidad de HFh. Numerosos estudios han encontrado relación entre arco corneal y lípidos plasmáticos <sup>77,78</sup>. Un reciente estudio ha demostrado que la presencia de arco corneal se asocia con incremento de arteriosclerosis en pacientes con HF y que pacientes con más severo arco corneal tienden a tener más severa calcificación arteriosclerótica <sup>79</sup>. Pueden existir depósitos anormales de colesterol a otros niveles como párpados (xantelasma) o musculatura extensora de la mano, pero no son tan específicos de HF y pueden presentarse también en sujetos sin alteraciones del metabolismo lipídico.

En resumen, la presencia de depósitos anormales de colesterol (xantomas y/o arco corneal) es una de las principales características clínicas que define la enfermedad. La detección de dichos depósitos tiene importancia no sólo de cara al diagnóstico de la enfermedad, sino también de cara al pronóstico de la misma ya que su presencia, en pacientes con HF, se ha relacionado con un mayor riesgo de ECV.



### 3.2. Características bioquímicas

La característica bioquímica que va a definir a los pacientes con HFh son unas concentraciones extremadamente elevadas de c-LDL, presentes ya desde el nacimiento<sup>1</sup>. Está plenamente establecido que los niveles de c-LDL están relacionados con la incidencia de eventos coronarios y muerte cardiovascular<sup>80</sup>. Numerosos ensayos clínicos con fármacos hipolipemiantes han demostrado que el descenso de las concentraciones de c-LDL en plasma conduce a una significativa reducción en la morbimortalidad cardiovascular. Este efecto se ha observado, tanto en individuos sanos como en aquellos que ya habían sufrido un episodio previo<sup>81,82</sup>.

A continuación, se procederá a describir el fenotipo característico de HFh respecto a cada una de las fracciones lipídicas y parámetros de estrés oxidativo.

#### 1. Lipoproteínas de baja densidad (c-LDL)

La causa de la elevación de c-LDL en pacientes HFh se encuentra, principalmente, en una mutación en el gen que codifica el RLDL<sup>5-7</sup>. Las características clínicas y bioquímicas de los sujetos varían considerablemente según el individuo sea heterocigoto u homocigoto para la enfermedad, **tabla 1**.

La gran heterogeneidad que presentan las mutaciones en el RLDL hace muy difícil agrupar a los sujetos dentro de un mismo fenotipo. Varios estudios han investigado la correlación genotipo-fenotipo en pacientes HFh portadores de distintas mutaciones en RLDL, encontrando una distinta respuesta en función del tipo de mutación presentada<sup>83-86</sup>. Bertolini y colaboradores<sup>87</sup>, demostraron que los pacientes con una mutación nula en el RLDL presentaban mayores concentraciones de c-LDL (18%) que aquellos sujetos con una mutación defectuosa. Estudios posteriores han corroborado ese hallazgo<sup>88</sup>. Por otro lado, es conocido también que diferentes mutaciones en el mismo dominio e incluso la misma mutación en distintos sujetos, puede dar lugar a diferentes fenotipos<sup>89</sup>.

La influencia del tipo de mutación en el RLDL sobre el riesgo cardiovascular ha sido tratada en diferentes trabajos. Souverin y colaboradores <sup>90</sup>, estudiaron la influencia específica de las 86 mutaciones más prevalentes en la población de los Países Bajos y concluyeron que la supervivencia depende más de los niveles de c-LDL causados por la mutación que del tipo de mutación en sí misma. Por otro lado, Alonso y colaboradores <sup>91</sup> demostraron recientemente que el tipo de mutación en el RLDL, junto con factores de riesgo clásicos, como tabaco o el ratio CT/c-HDL, puede tener una gran influencia en el riesgo cardiovascular de pacientes con HFh.

En condiciones normales, aproximadamente el 70% de las partículas de c-LDL son aclaradas desde la circulación por el hígado y la actividad del RLDL en esta función es el mecanismo crucial para mantener las concentraciones plasmáticas de c-LDL <sup>1</sup>. Por lo tanto, el principal defecto en HFh resulta de un descenso en el aclaramiento de c-LDL, vía RLDL. Otros defectos genéticos en el RLDL, ApoB o PCSK9 pueden dificultar el aclaramiento de c-LDL, pero ellos se considerarán más adelante como grupos distintos. El déficit de aclaramiento de c-LDL por parte del RLDL conducirá a altas concentraciones de c-LDL en plasma, convirtiéndose ésta en la característica que define a los pacientes con HFh.

Otro mecanismo que contribuye a elevar las concentraciones en sangre de c-LDL viene derivada de esa falta de aclaramiento de dichas partículas por parte del hígado. Esta falta de aclaramiento, estimulará la síntesis de colesterol dando lugar a una sobreproducción de c-VLDL, la cual finalmente incrementará la concentración de c-LDL en plasma. Kajinami y colaboradores <sup>92</sup>, realizaron un estudio para describir la distribución de apoproteínas en plasma en pacientes con HFh y encontraron que la ApoB se encontraba elevada 2,5 veces sobre los valores normales, lo que era consistente con la elevación de c-LDL. A su vez, ApoC-I, C-II y ApoE se encontraron significativamente elevadas. Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de ApoA-I y ApoA-II.

Las partículas de c-LDL pequeñas y densas constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de ECV <sup>93-95</sup>. Recientemente, Tsuyoshi y colaboradores <sup>96</sup> han demostrado que el tratamiento con estatinas en pacientes con HFh disminuye las concentraciones de dichas partículas, lo que contribuye a una disminución del riesgo cardiovascular. En este

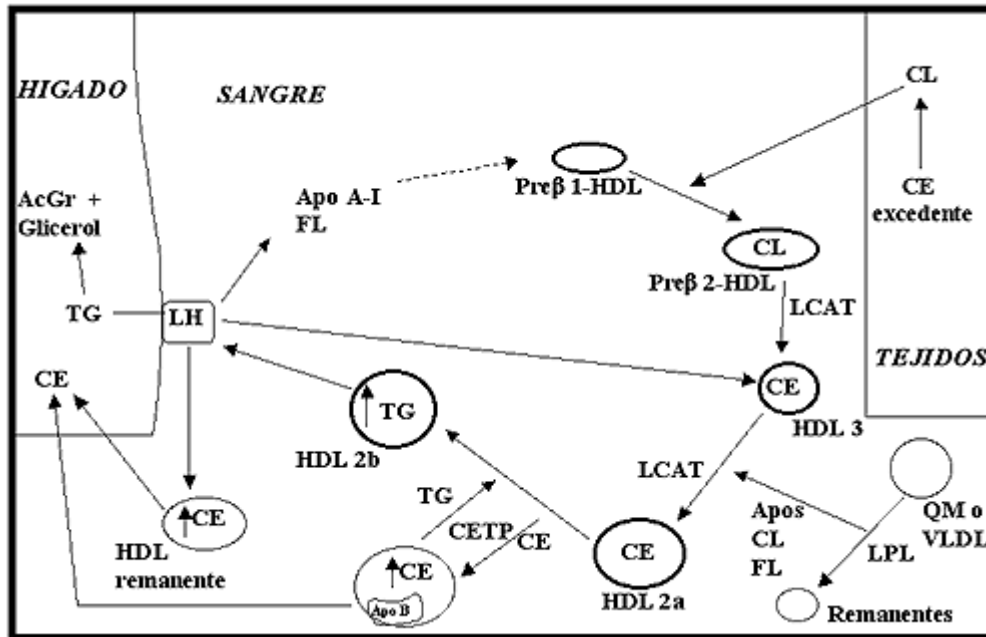
contexto, Hogue y colaboradores <sup>97</sup> demostraron que el genotipo de la mutación RLDL también estaba asociado con el tamaño de las partículas de c-LDL en pacientes con HF.

Actualmente, a la tradicional visión de que el defecto en el RLDL trae como consecuencia un aumento de las concentraciones de c-LDL a través de una disminución del aclaramiento, se le están uniendo nuevos mecanismos que pudieran explicar la alta variabilidad interindividual existente en la HF. Así, la sobreproducción de ApoB contenida en las lipoproteínas y la supresión de la enzima hidroximetilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) reductasa pueden ser unos indicadores de que una revisión de este paradigma es necesaria <sup>98, 99</sup>.

## 2. Lipoproteínas de alta densidad (c-HDL)

Las c-HDL, las cuales transportan aproximadamente un tercio del colesterol plasmático, son las encargadas de retirar el exceso de colesterol desde las células <sup>100, 101</sup>. Las c-HDL son una clase de partículas multifuncional y heterogénea que transportan una gran variedad de lípidos y moléculas lipofílicas. Una de las funciones más importantes de las c-HDL es el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para su eliminación por la bilis. Esto ocurre por una vía conocida como transporte reverso del colesterol (TRC), la cual requiere la coordinación de múltiples mecanismos celulares y proteínas plasmáticas, convirtiéndose en la vía metabólica protectora de la aterogénesis <sup>102-105</sup>. En la **figura 2** se representa un esquema de este proceso fisiológico.

Aunque las c-HDL contienen diferentes proteínas, el 70% de ellas están representadas por la apoA-I. El hígado y el intestino sintetizarán y secretarán esta proteína a la circulación como una lipoproteína pobre en lípidos, la cual rápidamente irá adquiriendo fosfolípidos y colesterol desde las células, principalmente hepáticas, aunque también adquiere colesterol procedente de otras células localizadas en la periferia, principalmente macrófagos. Por tanto, las concentraciones de ApoA-I, al ser las proteínas que mejor representan a las c-HDL, nos pueden ayudar a medir indirectamente la eficiencia de la vía antiaterogénica del TRC.



FL: fosfolípidos. CL: colesterol libre. CE: colesterol esterificado. TG: triglicéridos. Ac Gr: ácido graso. LH: lipasa hepática. LPL: lipoproteínlipasa. CETP: proteína transportadora de colesterol esterificado. LCAT: lecitina colesterol aciltransferasa.

**Figura 2.** Esquema del transporte reverso del colesterol. Espondaburu OR. A. Bioq. Clin. 2006; 40 (2): 165-72

Las concentraciones séricas de c-HDL están relacionadas inversamente con la incidencia de ECP<sup>106-108</sup>. Numerosos factores tanto ambientales<sup>109, 110</sup> como genéticos<sup>111-113</sup> ejercen su influencia sobre las concentraciones plasmáticas de c-HDL.

La HFh se suele acompañar de concentraciones bajas de c-HDL. Frenais y colaboradores<sup>114</sup>, demostraron que las concentraciones de c-HDL, pero no de ApoA-I, en pacientes con HFh eran menores en comparación con sujetos normales. Otro estudio en pacientes con HF demostró que existía un predominio de c-HDL de pequeño tamaño así como un incremento de la actividad de la lipasa hepática<sup>115</sup>. También se ha sugerido que la excreción de colesterol puede estar incrementada en pacientes con HF, al observarse en distintos estudios una disminución del índice de saturación de colesterol en la bilis durante el tratamiento con fármacos hipolipemiantes<sup>116, 117</sup>.

Las partículas de c-HDL evitan la oxidación de las LDL a través de la activación plaquetaria del factor acetil-hidrolasa y de la paraoxonasa (especialmente la isoenzima 1). Estas enzimas asociadas a las c-HDL hidrolizan los lípidos hidroperoxidados de las

partículas de c-LDL. Por otro lado, se ha demostrado que el c-HDL mejora la función endotelial al disminuir la expresión de moléculas de adhesión estimuladas por la LDL-oxidada (LDL-ox) <sup>118</sup>.

En definitiva, todos estos mecanismos descritos ponen de manifiesto la importancia que las partículas de c-HDL tienen en pacientes con HFh ya que a través del transporte reverso de colesterol serán las encargadas de conducir el colesterol remanente desde los tejidos, incluida la pared arterial, hacia el hígado para su posterior reutilización o eliminación a través de la bilis. A su vez, las moléculas de c-HDL tienen otros muchos papeles protectores como evitar la oxidación de las partículas de c-LDL o mejorar la función endotelial. Todo ello contribuye a que las HDL sean una de las principales vías protectoras contra la aterogénesis.

### 3. Triglicéridos (TG)

Estudios experimentales y clínicos han demostrado que el trastorno en el metabolismo de los TG juega un papel importante en el desarrollo de arteriosclerosis prematura <sup>119, 120</sup>. Las concentraciones de TG en pacientes con HFh suelen encontrarse en rangos normales, aunque en la clínica nos podemos encontrar con pacientes que presentan valores elevados de TG.

El trastorno en el metabolismo de los TG, presente en los sujetos con HF, se va a caracterizar por un acúmulo postprandial de lipoproteínas remanentes de colesterol y el incremento de estos remanentes también ha sido asociado con el desarrollo de ECV <sup>121-123</sup>. Watts y colaboradores <sup>124</sup>, demostraron como pacientes con HF que presentaban una alteración en el metabolismo postprandial de las lipoproteínas tenían más alto riesgo para ECV.

Por otro lado, ha sido demostrado que las partículas de c-LDL pequeñas y densas se correlacionan positivamente con las concentraciones de TG y c-LDL e inversamente con el c-HDL <sup>125</sup>. Aunque son varios los factores determinantes del tamaño de las LDL, el más poderoso podrían ser los niveles de TG <sup>126</sup>. Kolovu y colaboradores <sup>127</sup>, demostraron recientemente que hombres con HFh presentaban una anormal respuesta postprandial al aclaramiento de TG, por lo que esta evidencia podría

contribuir a explicar la alta heterogeneidad en el riesgo de ECP que presentan estos pacientes. Este mismo grupo, había observado previamente la misma respuesta en mujeres postmenopáusicas con HFh <sup>128</sup>. A su vez, la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) ha sido identificada también como un importante predictor del tamaño de las partículas de c-LDL en pacientes con HFh <sup>129</sup>.

Otros mecanismos que pudieran explicar la elevación de TG en algunos pacientes con HFh pueden ser la interacción con otros genes como por ejemplo el genotipo  $\epsilon 2/\epsilon 2$  del gen de la ApoE o bien la interacción con factores ambientales tales como alcohol, sobrepeso y diabetes mellitus, elementos que por otro lado tienen fuertemente contrastada su relación con concentraciones elevadas de TG.

#### 4. Lipoproteína A (Lp (a))

Importantes estudios han demostrado la asociación que existe entre la Lp (a) y la presencia de enfermedad cardiovascular en diversas poblaciones, incluidas poblaciones con HF <sup>130-135</sup>. Sin embargo, otros estudios como los realizados por Carmena y colaboradores <sup>136</sup>, concluyeron que el riesgo cardiovascular en el grupo de pacientes con HF analizado se relacionó con la edad, el sexo, CT, c-LDL y ApoB pero no con las concentraciones de Lp (a).

Real y colaboradores <sup>137</sup>, analizaron las concentraciones de Lp (a) en un grupo de pacientes con HF sin ECV. Para ello reclutaron 60 pacientes con HF sin ECV y los compararon con 74 sujetos normolipémicos sin antecedentes de ECV del área de Valencia (España). Ellos encontraron que los pacientes con HF tenían más riesgo cardiovascular debido a la potenciación de la hipercolesterolemia con elevadas concentraciones de Lp (a), indicando que esto podría contribuir a la explicación de alta variabilidad clínica que presentan estos pacientes. Un reciente estudio llevado a cabo en niños y adolescentes entre 8-18 años con alta sospecha de HF investigó la asociación entre historia familiar de ECP y concentraciones y tamaño de la Lp (a). Ellos concluyeron que elevadas concentraciones de pequeñas isoformas de Lp (a) pueden ser un importante factor de riesgo para el desarrollo de ECP en niños y adolescentes con hipercolesterolemia <sup>138</sup>.

En definitiva, la HFh se encuentra asociada a elevadas concentraciones plasmáticas de Lp (a) y esto puede afectar al pronóstico de la enfermedad.

#### 5. LDL oxidada (LDL-ox) y lipoperóxidos (LPO)

En la última década se ha consolidado la teoría oxidativa de la aterosclerosis <sup>139</sup>, que considera la lesión arterial inicial, la estría grasa y su progresión a placa de ateroma, íntimamente asociadas a la acumulación en macrófagos de c-LDL que han sido mínimamente oxidadas.

Las LDL-ox pueden ayudar a expandir la lesión arteriosclerótica, contribuyendo a ello a través de las siguientes acciones proaterogénicas: internalización continua de colesterol y apoptosis celular, reacción inflamatoria por linfocitos T, amplificación de la respuesta inflamatoria y formación de células espumosas <sup>140-145</sup>. Además de los estudios que prueban su papel en la lesión arteriosclerótica, se ha comprobado la existencia de anticuerpos contra la LDL-ox en humanos <sup>146</sup> y se ha confirmado que la medida de la susceptibilidad de las partículas de c-LDL a la oxidación está correlacionada de forma independiente con la magnitud de las lesiones arterioscleróticas <sup>147</sup>.

En la clínica, los niveles de LDL-ox se han relacionado claramente con enfermedad arterial coronaria <sup>148-150</sup>. En pacientes con HF, también se ha observado una elevación en los niveles de LDL-ox <sup>151</sup> y el título de autoanticuerpos contra LDL-ox ha sido incluso correlacionado con el grosor de los xantomas a nivel del tendón de Aquiles <sup>152</sup>.

El estrés oxidativo es el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la acción efectiva de los sistemas antioxidantes. Al respecto, se ha demostrado que los sujetos con alto riesgo cardiovascular tienen concentraciones más altas de LPO, un marcador de daño oxidativo a los lípidos, y menor actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa. Napoli y colaboradores <sup>153</sup>, demostraron en pacientes con HFH una elevación en las concentraciones basales de LPO así como un mayor índice de oxidación de las partículas de c-LDL comparado con controles normolipémicos.

En definitiva, los pacientes con HF presentan un alto riesgo cardiovascular debido a la alta carga arteriosclerótica que conlleva la enfermedad. En la creación y progresión de la lesión arteriosclerótica van a jugar un papel determinante las LDL-ox y los LPO.

### 3.3. Diagnóstico clínico de HFh

El diagnóstico de HFh se puede realizar siguiendo unos criterios clínicos o por medio de un análisis genético en el que se demuestra la presencia de la mutación en el RLDL. Los criterios clínicos usados para identificar los pacientes con HFh incluyen: elevadas concentraciones plasmáticas de CT a expensas de c-LDL (por encima del percentil 95 de los valores de la población de referencia), historia familiar de hipercolesterolemia, especialmente en niños, depósitos de colesterol en tejidos extravasculares (xantomas y/o arco corneal) e historia familiar de ECV prematura.

El diagnóstico clínico de HFh, sin embargo, no es un diagnóstico inequívoco y pueden ser usados diferentes criterios y programas. Para el programa *MEDPED* americano <sup>154</sup>, los criterios de diagnóstico se focalizan en las concentraciones individuales de c-LDL y en la historia familiar de hipercolesterolemia con evidencia de un patrón de transmisión dominante <sup>155</sup>. La presencia de niños con hipercolesterolemia incrementa el diagnóstico de probabilidad.

Recientemente, se han descrito nuevos criterios *MEDPED* para el diagnóstico clínico de HFh por parte del grupo holandés de HF (*Dutch Lipid Clinic Network*) <sup>75</sup>. Estos criterios incluyen historia personal y familiar de concentraciones elevadas de c-LDL, historia de ECV (coronaria, carotídea y de arterias periféricas) y presencia de xantomas y/o de arco corneal con menos de 45 años. Según este *score* hay 3 posibilidades de diagnóstico de HFh:

- + Certeza: mayor o igual a 8 puntos
- + Probable: 6 y 7 puntos
- + Posible: entre 3 y 5 puntos



En la **tabla 2** se recoge el score para el diagnóstico clínico de HFh por parte de la Dutch Lipid Clinic Network.

**Tabla 2.** *Diagnóstico clínico de HFh por parte de la Dutch Lipid Clinic Network (MEDPED)*

<b>HISTORIA FAMILIAR</b>	<i>Score</i>
I- Familiar de primer grado con enfermedad coronaria y/o vacular precoz	1
II- Familiar de primer grado con c-LDL $\geq$ 210 mg/dL y/o	1
III- Familiar de primer grado con Xantomas y/o Arco corneal	2
IV- Niño menor de 18 años con c-LDL $\geq$ 150 mg/dL	2
<b>HISTORIA PERSONAL</b>	
I- Antecedentes de enfermedad coronaria precoz*	2
II- Antecedentes de enfermedad vascular periférica o cerebral precoz*	1
<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
I- Xantomas tendinosos	6
II- Arco corneal antes de los 45 años	4
<b>ANALÍTICA en AYUNAS (con TG &lt; 200 mg/dL, &lt; 2,3 mmol/L)</b>	
I- c-LDL $\geq$ 330 mg/dL (8,5 mmol/L)	8
II- c-LDL 250-329 mg/dL (6,5-8,5 mmol/L)	5
III- c-LDL 190-249 mg/dL (4,9-6,5 mmol/L)	3
IV- c-LDL 155-189 mg/dL (4,0-4,9 mmol/L)	1
<b>ANÁLISIS ADN</b>	
Mutación presente en el gen del RLDL	8

\*Precoz viene definido por: < 55 años en hombres y < 60 años en mujeres

Diagnóstico: cierto ( $\geq$ 8), probable (6-7) y posible (3-5)

A pesar de la alta sensibilidad y especificidad de los criterios clínicos de HFh, hay que recordar que no es un diagnóstico inequívoco y que el diagnóstico de certeza sólo se obtiene a través del análisis genético de la mutación en el RLDL. Debido a la importancia de obtener un diagnóstico temprano con el fin de evitar complicaciones de

la enfermedad, es obligado determinar las concentraciones de c-LDL en familiares de primer grado de pacientes con HFh y recomendado en todos los familiares de 2º grado <sup>156</sup>. Por tanto, dentro de las familias en los que existe un paciente con HF, se recomienda el estudio de los niños a partir de los 2-3 años de edad.

El diagnóstico clínico de HFh puede ser realizado si alguno de los siguientes criterios se encuentra presente en un familiar de primer grado de un paciente con HFh <sup>9</sup>:

- Xantomas tendinosos
- Arco corneal antes de los 45 años con un c-LDL  $\geq$  190 mg/dL (4,9 mmol/L)
- c-LDL  $\geq$  250 mg/dL (6,5 mmol/L) en sujetos mayores de 18 años o  $\geq$  190 mg/dL (4,9 mmol/L) si menos de 18 años
- c-LDL entre 190-249 mg/dL (4,9-6,5 mmol/L) en al menos 2 ocasiones

En todos los familiares de primer grado con c-LDL > 160 mg/dL (4,1 mmol/L) o > 135 mg/dL (3,5 mmol/L) si tiene menos de 18 años, es recomendable repetir las concentraciones de c-LDL al menos una vez cada dos años.

### **3.4. Factores de riesgo clásicos de ECV en pacientes con HFh**

La HFh es una enfermedad muy heterogénea debido a que su expresión clínica, en cuanto a ECV, es altamente variable en términos de edad de comienzo e incluso en cuánto a severidad de la misma. Los factores de riesgo clásicos no necesariamente juegan el mismo papel en la expresión de ECP en HFh o al menos no con la misma intensidad con la que lo hacen en la población general <sup>157-160</sup>.

La importancia de los factores ambientales en HFh emergió cuando Pimstone y colaboradores en 1998 <sup>161</sup>, compararon los valores lipídicos y la prevalencia de ECP en pacientes con HFh chinos que residían en China con los que residían en Canadá, todos con mutaciones definidas en el RLDL. Aquellas diferencias podrían ser debidas, al menos en parte, a las diferencias encontradas en la dieta, ejercicio físico y demás factores ambientales.

A lo largo de los 10 últimos años, numerosos estudios han evaluado los factores de riesgo asociados a ECV en pacientes con HFh en diferentes cohortes y países <sup>15-18, 157</sup>. Todos los estudios concluyen en que los factores de riesgo clásicos juegan un papel importante dentro de la HFh, aunque no siempre con la misma intensidad. En este contexto, la ECP es de 2 a 5 veces más frecuente en hombres con HFh que en mujeres, con un exceso de riesgo atribuible mucho mayor al de la población general <sup>74</sup>.

Jansen y colaboradores <sup>162</sup> realizaron recientemente un estudio para determinar la contribución de los factores de riesgo clásicos en el desarrollo de ECV en pacientes con HFh. Llevaron a cabo un estudio retrospectivo, multicéntrico, sobre una cohorte de 2400 pacientes y concluyeron que factores de riesgo clásicos como sexo masculino, tabaco, HTA, diabetes mellitus, c-HDL y Lp (a) eran los factores de riesgo predictores de ECV más importantes en pacientes con HFh. Recientemente, Alonso y colaboradores <sup>91</sup> confirmaron la importancia de identificar algunos factores de riesgo clásicos como el tabaco y el ratio CT/c-HDL, con el fin de prevenir la aparición de ECP y de tratar adecuadamente a los pacientes con HFh.

Un panel internacional de expertos se reunió en 2004, para la realización de una guía de diagnóstico y manejo de HFh <sup>9</sup>. En este grupo de trabajo, se recogieron los que son considerados factores de riesgo mayores para ECV en pacientes con HFh. Entre ellos tenemos:

1. Edad: hombres  $\geq 30$  años y mujeres  $\geq 45$  años o postmenopáusicas
2. Tabaco: fumadores activos
3. Historia familiar de ECP en familiares de primer grado (ECP es considerada < 55 años en hombres y < 65 años en mujeres)
4. c-LDL > 330 mg/dL (8,5 mmol/L)
5. c-HDL < 40 mg/dL (1,0 mmol/L)
6. TA > 140/90 mmHg
7. Diabetes mellitus
8. Lp (a) > 60 mg/dL

La identificación de estos factores de riesgo es de gran importancia porque está internacionalmente aceptado que la intervención terapéutica deberá realizarse

proporcional al riesgo absoluto individual de desarrollar un evento cardiovascular <sup>163</sup>. Según la presencia de factores de riesgo mayores y/o la presencia clínica o subclínica de arteriosclerosis, se establecen 3 categorías de riesgo en HFh que ayudarán a establecer los objetivos terapéuticos:

1. Bajo riesgo a 10 años: ningún factor de riesgo mayor

2. Moderado riesgo a 10 años:

+ Con  $\geq 2$  factores de riesgo mayores

+ Arteriosclerosis subclínica: grosor íntima-media  $> 0,10$  cm y/o índice tobillo brazo (ITB)  $< 0,9$

3. Clínica de ECV o equivalente coronario

Previamente se ha señalado que además de los factores de riesgo clásicos, la presencia de depósitos extravasculares de colesterol como xantomas y arco corneal, se ha asociado a un aumento del riesgo de arteriosclerosis y como resultado final a un aumento de ECP <sup>76, 79</sup>. En el siguiente capítulo se expondrá la influencia genética de otros factores así como la propia influencia del RLDL sobre el fenotipo de la enfermedad.

En conclusión, la temprana identificación y control de factores de riesgo clásicos es de gran importancia en la HFh ya que juegan un papel fundamental en la prevención de ECP. No obstante hay que destacar, que la presencia de estos factores de riesgo clásicos no siempre actúan con la misma intensidad en pacientes con HF y su impacto varía en diferentes cohortes y países.

## 4. Genética de la Hipercolesterolemia Familiar heterocigota

### 4.1. Receptor de c-LDL (RLDL)

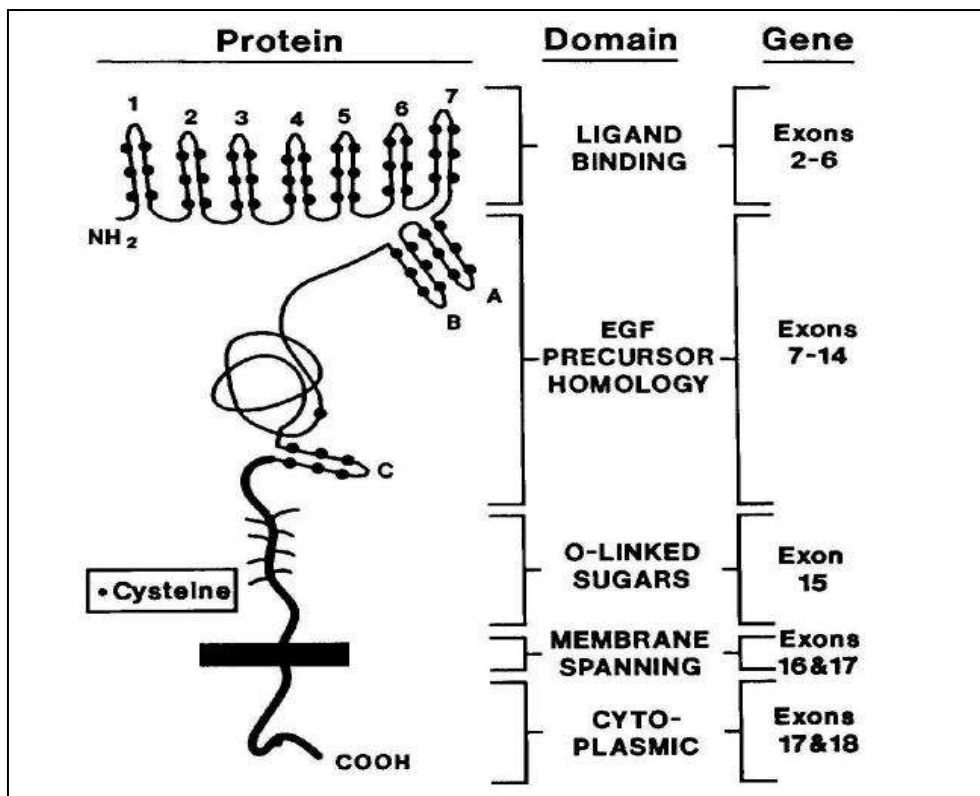
La HF es el desorden monogénico más común asociado con el desarrollo de ECV prematura. Generalmente, la HF es el resultado de defectos en el gen del RLDL que se encuentra en el cromosoma 19 y es transmitido con carácter autosómico dominante (AD). Hasta la fecha, se han descrito más de 1000 mutaciones del gen del RLDL a lo largo del mundo y más de 200 mutaciones se han descrito en España (<http://www.ucl.ac.uk/fh>; <http://www.necker.fr>)<sup>164, 165</sup>.

Se han identificado otros *loci* responsables de otras formas de hipercolesterolemia hereditaria con un fenotipo similar al de la HF<sup>166-172</sup>, como el defecto familiar de apoB<sup>166-169</sup> (mutaciones de la apoB-100 que dificultan la unión del c-LDL con sus receptores), algunas mutaciones del gen de la apoE, mutaciones ligadas al cromosoma 1p32<sup>166, 170, 171</sup> y defectos del gen de la proproteína convertasa subtilisina/resina tipo 9 (PCSK9)<sup>166, 172</sup>, que codifica una enzima que controla el número de RLDL en la membrana plasmática de los hepatocitos. Otros desórdenes monogénicos en genes relacionados con hipercolesterolemia son: hipercolesterolemia autosómica recesiva (ARH)<sup>173</sup>, deficiencia de colesterol 7 alfa-hidroxilasa (CYP7A1)<sup>167</sup> y sitosterolemia familiar.

El gen del RLDL, de 45 kilobases (Kb) aproximadamente, está localizado en el brazo corto del cromosoma 19 (región p13.1-p13.3), y consta de 18 exones y 17 intrones, **Figura 3**. El exón 1 codifica la secuencia señal de 21 aminoácidos hidrofóbicos. Este péptido es hidrolizado en el retículo endoplásmico durante el proceso de translocación para dar lugar a la proteína madura de 839 aminoácidos. Los exones 2 a 6 codifican el dominio de unión al ligando, y los exones 7 a 14, el dominio homólogo al precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El exón 15 codifica la región que une azúcares. El exón 16 y la primera mitad del 17 corresponden al dominio transmembrana, y el resto del exón 17 y la zona 5' del exón 18 codifican el dominio citoplásmico.

El RLDL es una proteína transmembrana formada por 839 residuos de aminoácidos organizados en 5 dominios <sup>174-176</sup>, **figura 3:**

1. Dominio de unión al c-LDL (292 residuos)
2. Dominio que lleva unidos azúcares y con homología con EGF (417 residuos)
3. Dominio con azúcares unidos a oxígeno (58 residuos)
4. Dominio transmembrana (22 residuos)
5. Dominio citosólico (50 residuos).

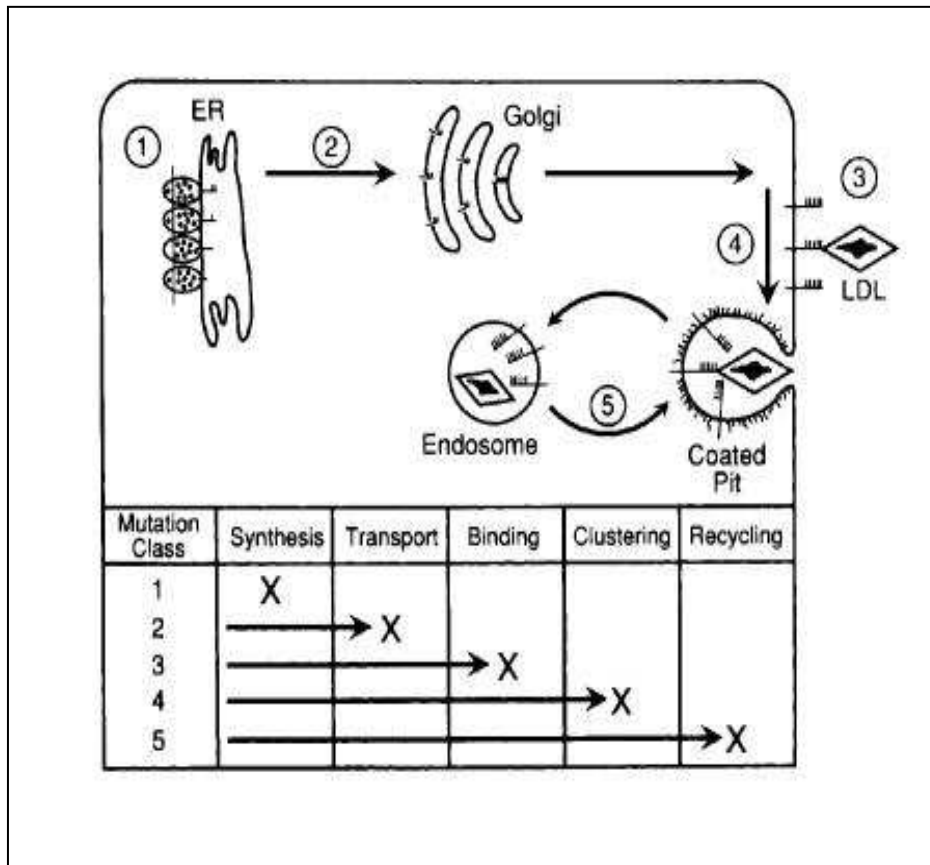


**Figura 3.** Estructura de la proteína del RLDL y su relación con la estructura genética. Imagen obtenida de John R Burnett and Amanda J Hooper. *Common and Rare Gene Variants Affecting Plasma LDL Cholesterol. Clin Biochem Rev.* 2008 Feb;29(1):11-26

La unión del c-LDL con su receptor (RLDL) es el primer mecanismo de las células para incorporar el colesterol desde el plasma. Dicha unión inicia un proceso de endocitosis, “endocitosis mediada por receptores”, con la formación de un endosoma que permite la internalización de los complejos receptor-ligando. Cambios de pH provocan la disociación del receptor, el cual regresa a la membrana, mientras el endosoma se fusiona con un lisosoma cuyas enzimas catalizan la hidrólisis de ésteres de colesterol y otros lípidos, así como de las proteínas presentes en el c-LDL. El aumento de contenido intracelular de colesterol determina la inhibición de la síntesis de los RLDL y gracias a la liberación de LDL derivadas del colesterol se estimula la esterificación del colesterol por la acilcoenzima A colesterol aciltransferasa (ACAT), lo que da lugar a un mecanismo para almacenar el exceso de colesterol libre en forma de gotitas lipídicas de colesterol esterificado. En las células capaces de sintetizar colesterol, como las células hepáticas, se produce la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa implicada en la síntesis de colesterol.

En definitiva, la incorporación del colesterol es un proceso altamente regulado por lo que las mutaciones ocurridas sobre el RLDL en la HF se traducirán en una menor expresión o menor funcionalidad de dicho receptor y por tanto en un acumulo de c-LDL en plasma. Las mutaciones encontradas en el RLDL son divididas en 5 categorías en función del efecto sobre la proteína, **figura 4**<sup>3</sup>:

1. Clase I o de alelos nulos: no síntesis del receptor
2. Clase II o alelos defectuosos para el transporte (la más frecuente)
3. Clase III o defectos en la unión. No unión RLDL
4. Clase IV o alelos defectuosos para la internalización
5. Clase V o defectos de reciclaje. El receptor no vuelve a la superficie.



**Figura 4.** Clasificación de las mutaciones en el RLDL basada en la función del mismo. Imagen obtenida de John R Burnett and Amanda J Hooper. *Common and Rare Gene Variants Affecting Plasma LDL Cholesterol. Clin Biochem Rev. 2008;29(1):11-26*

La expresión clínica de la HF es altamente variable y se ha demostrado que esta variabilidad puede deberse en parte, a la actividad del RLDL. Alonso y colaboradores<sup>91</sup>, confirmaron recientemente la importancia de identificar factores de riesgo clásicos como el tabaco, así como la importancia de identificar también el tipo de mutación en el gen del RLDL, con el objetivo de una detección precoz de la enfermedad y un adecuado tratamiento de la misma. También se ha demostrado que las mutaciones en pacientes que desencadenan una actividad residual del RLDL son consideradas menos severas clínicamente que aquellas en las que la actividad del RLDL es indetectable<sup>88</sup>. En este sentido, Koeijvoets y colaboradores<sup>177</sup>, demostraron recientemente que niños con HFh y con un genotipo nulo, tuvieron concentraciones más altas de c-LDL y más grosor del diámetro íntima-media, que niños con una mutación defectuosa en el RLDL. Otros estudios anteriores ya sugerían estas diferencias de riesgo entre sujetos, demostrando que existía una fuerte correlación entre la actividad del RLDL y la severidad de la enfermedad<sup>178</sup>.



También es conocido que incluso pacientes con la misma mutación en el RLDL tienen una amplia variabilidad interindividual en los niveles de c-LDL y en la expresión clínica de ECV sugiriendo que otros factores metabólicos, ambientales, genéticos o interacciones genes-ambiente podrían estar implicados <sup>74, 87, 89</sup>.

En definitiva, el hecho de que la variabilidad en la expresión clínica esté influida enormemente por el defecto genético, así como la importancia de un diagnóstico precoz de cara a prevenir la aparición de ECP hacen que el diagnóstico genético o de certeza de HFh sea una de las mejores herramientas en la lucha contra la enfermedad.

#### **4. 2. Diagnóstico genético**

El diagnóstico de HFh es importante, no sólo desde el punto de vista del pronóstico del paciente, sino también por las implicaciones que sobre el resto de miembros de la familia tiene la enfermedad.

En el diagnóstico de HF no existen criterios clínicos específicos, por lo que se emplean criterios arbitrarios basados en concentraciones de c-LDL, historia personal y familiar de ECV prematura (coronaria, carotídea y periférica) y la presencia de depósitos extravasculares de colesterol (xantomas y arco corneal).

La gran variabilidad interindividual de la HF hace que el diagnóstico basado en las concentraciones de CT o c-LDL no permita realizar una identificación inequívoca de estos pacientes. Además, los valores de colesterol varían con la edad, género y características de la población estudiada. Por otro lado, los valores lipídicos no siempre están disponibles para cada grupo, especialmente para niños y adolescentes. Un estudio reciente llevado a cabo sobre una cohorte danesa de pacientes con HF demostró que no existe una correlación cercana entre diagnóstico clínico y genético ya que utilizando sólo el diagnóstico clínico basado en valores de c-LDL, del 23-33% de los pacientes con diagnóstico genético no serían diagnosticados. Este estudio demuestra que un porcentaje considerable de pacientes con HF no serían diagnosticados con el sólo uso de un

diagnóstico clínico basado en valores lipídicos <sup>179</sup>. Umans-Eckenhause y colaboradores <sup>180</sup> también demostraron que el error diagnóstico al utilizar las concentraciones de c-LDL es cercano al 30%, por lo que sugiere que ante la sospecha clínica, hay que realizar un análisis genético.

El diagnóstico genético, por tanto, es el método preferido para el diagnóstico de HFh ya que ofrece un diagnóstico inequívoco de certeza <sup>1, 9, 56, 181</sup>. Recientemente, un estudio ha analizado la eficacia y la relación coste beneficio del diagnóstico genético como *screening* en pacientes con HF. Los autores concluyen que dicho diagnóstico conduce a beneficios sobre la salud de los pacientes sin que se vea alterada la relación coste-efectividad, por lo que sugieren la implantación de programas de screening con diagnóstico genético en este grupo de pacientes <sup>182</sup>. Otros estudios más recientes también apoyan con sus resultados la idea de establecer el diagnóstico genético dentro de programas de *screening* en pacientes con HF <sup>183, 184</sup>.

El panel de expertos internacionales reunidos en 2004 para la elaboración de la guía de diagnóstico y manejo de la HFh <sup>9</sup> recomendaron establecer un diagnóstico de certeza en las siguientes situaciones:

- Poblaciones en los que sólo unas pocas mutaciones son responsables de la mayoría de los casos
- Poblaciones en las que la mutación causante de la enfermedad fuese conocida y se cuente con herramientas rápidas para el diagnóstico genético
- Sujetos en los que el diagnóstico clínico es incierto y que pertenecen a familias con mutaciones conocidas.

A pesar de las recomendaciones realizadas para la realización del diagnóstico de certeza, el mejor fenotipo dentro de la enfermedad para la realización de dicho diagnóstico todavía no se ha establecido claramente. Recientemente, un grupo español estableció que la presencia de xantomas y las concentraciones de c-LDL, ajustadas por edad, tienen alto valor en el diagnóstico clínico de HF, así como para establecer la indicación de la realización de un diagnóstico genético de certeza <sup>185</sup>.

Los métodos de diagnóstico basados en el análisis del gen, son los métodos recomendados por la OMS en el programa *MEDPED* para la búsqueda de pacientes con HF<sup>26</sup>. Sin embargo, estos métodos presentan también una serie de inconvenientes:

1. La gran heterogeneidad de las mutaciones, de las que se conocen en torno a 1000 a lo largo del mundo. Se han encontrado mutaciones de todo tipo: de cambio de aminoácido o *missense*, de codón de parada o *nonsense*, de ajuste o *splicing*, de cambio de la pauta de lectura o *frameshift*, mutaciones en pauta o *inframe* y deleciones e inserciones que se distribuyen a lo largo de todo el gen
2. El gran tamaño del gen (45 Kb) dificulta el diagnóstico ya que la mutación puede estar localizada en cualquier sitio del mismo.

Gracias a los avances de la biología molecular hoy en día es posible abordar el diagnóstico de la HF mediante técnicas de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (*SSCP*) o electroforesis en geles con gradiente desnaturizante (*DGGE*) que permiten detectar cambios pequeños en la secuencia del ADN, de hasta una base pero tienen el inconveniente es que son muy laboriosas y difíciles de aplicar al diagnóstico rutinario. Por otra parte, estas técnicas no permiten la detección de grandes deleciones o inserciones, determinación que requiere del uso de la técnica de *Southern* o la realización de métodos de reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) largas. Además las técnicas de *SSCP* o *DGGE* requieren de una secuenciación posterior para la caracterización de la mutación.

En la actualidad se han desarrollado “biochips”, diseñados para detectar mutaciones de forma rápida y sencilla. Para la fabricación del “biochip” es necesario disponer previamente de la información del número y características de las mutaciones que se quieren determinar. En España se ha desarrollado una técnica para el diagnóstico de certeza de la HFh mediante la detección del defecto genético<sup>165</sup>. El principio en el que se basa el “biochip” (*Lipochip*®) es la capacidad que tiene el ADN para reconocer su secuencia complementaria. Básicamente se trata de una superficie de vidrio modificada químicamente en la que están depositadas múltiples secuencias génicas complementarias a cada una de las mutaciones del gen del RLDL conocidas hasta el

momento. Este test permite el análisis simultáneo de todas las mutaciones descritas de forma específica, rápida y fiable. No obstante, ésta es una herramienta de diagnóstico dinámica que permite ir incorporando nuevas mutaciones. En los casos en los que no se detecta la mutación por *Lipochip*®, se procede a la secuenciación del gen <sup>186</sup>.

En conclusión, el diagnóstico genético es el método preferido para el diagnóstico de HFh ya que ofrece un diagnóstico inequívoco de certeza. En este contexto, numerosos estudios han demostrado la necesidad de establecer el diagnóstico genético dentro de programas de *screening* en pacientes con HF.

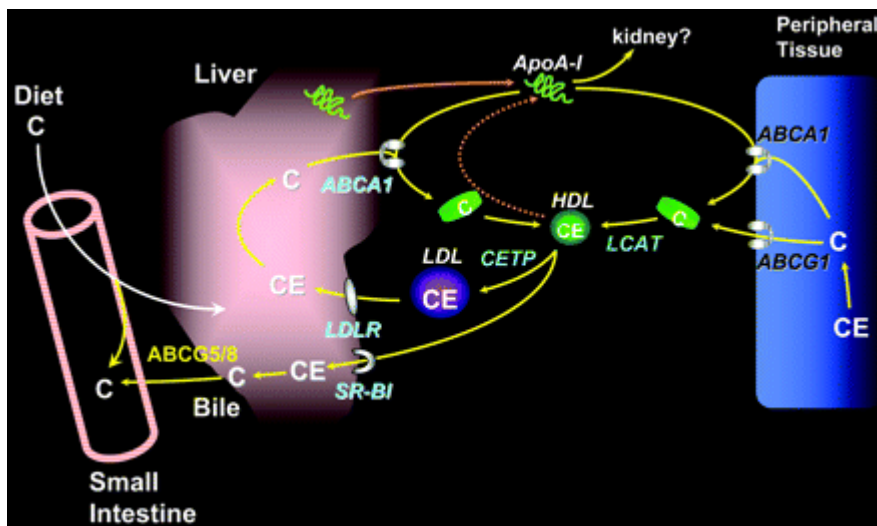
## **5. Proteínas transportadoras de colesterol dependientes de ATP G5/G8 (ABCG5/G8)**

Los mecanismos que regulan la absorción de colesterol en el intestino son poco conocidos. La pared intestinal, constituye una barrera fisiológica que hace que sólo se absorba el 40% del colesterol ingerido, condicionando que sea muy escasa la absorción de esteroides de origen vegetal, como el sitosterol, que sólo se absorbe un 5%. Recientemente, se ha descrito la existencia de dos proteínas, ABCG5 y ABCG8, que juegan un papel fundamental en la absorción de colesterol y esteroides vegetales, por lo que ejercen una influencia determinante sobre el balance final del metabolismo lipídico. Mutaciones en los genes que codifican a estas dos importantes proteínas condicionarán un dramático incremento en la absorción de colesterol y esteroides vegetales.

### **5.1. Homeostasis del colesterol**

La homeostasis del colesterol en el organismo se mantiene mediante el equilibrio de la síntesis endógena del esteroide con su absorción intestinal y con la secreción biliar de ácidos biliares y colesterol <sup>187</sup>. En la **figura 5** se esquematizan las interacciones entre los tejidos periféricos, el hígado y el intestino en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol.

El hígado representa un papel central en la regulación del metabolismo del colesterol y de las cifras séricas de c-LDL, sin embargo, el balance global del colesterol depende de que las entradas (síntesis y dieta) se equilibren con las pérdidas (eliminación fecal).



C: colesterol libre; CE: ésteres de colesterol; LCAT: lisolecitina colesterol aciltransferasa; CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; LDLR: receptor LDL; SR-B1: receptor scavenger clase B tipo 1.

**Figura 5.** Vía fisiológica del colesterol. Imagen obtenida de Jonh F. Oram, Ashley M. Vaughan. *Circulation research* 2006;99:1031.

Actualmente, la regulación de la absorción intestinal del colesterol está adquiriendo cada vez más protagonismo ya que la eficiencia de este proceso determina, tanto la excreción fecal de colesterol como la cantidad que llega al hígado vehiculizada en los remanentes de quilomicrones. Obviamente, la masa de colesterol excretada en las heces depende enteramente de la eficiencia de su absorción intestinal (del colesterol biliar y dietético a la vez) y, por esto, la regulación de la absorción intestinal del colesterol tiene un interés creciente como diana terapéutica para reducir las cifras de colesterol<sup>188-192</sup>.

Tras la formación de micelas por parte de los ácidos biliares, las moléculas de colesterol pasan desde el lumen al citoplasma de los enterocitos a través del ribete en cepillo. Tradicionalmente se ha creído que esto tiene lugar por un proceso de difusión

pasiva, aunque algunos estudios indican la presencia de un transportador proteínico<sup>190</sup>. El argumento a favor de una proteína de transporte activo se basaba en parte en la especificidad de la absorción del colesterol, ya que otros esteroides estructuralmente muy similares presentes en la dieta, los fitosteroides y los esteroides marinos, se absorben en menor grado<sup>193</sup> y a que la absorción del colesterol es sensible al efecto de ciertas proteasas<sup>194, 195</sup>.

Aunque los fitosteroides se absorben de un modo mucho más ineficiente que el colesterol, el mecanismo de absorción es similar y, ya que su origen es exclusivamente dietético, el cociente fitosteroides/colesterol en el plasma puede utilizarse como un marcador fiable de la absorción del colesterol<sup>196</sup>. Actualmente se sabe que esta selectividad está mediada por dos transportadores de membrana, ABCG5 y ABCG8, que actúan conjuntamente como un heterodímero, bombeando esteroides fuera de los hepatocitos (contribuyen a la secreción biliar de colesterol) y de los enterocitos (devuelven esteroides absorbidos al lumen intestinal)<sup>197</sup>.

Este sutil mecanismo de regulación está desestructurado en la sitosterolemia, una rara enfermedad autosómica recesiva debida a hiperabsorción intestinal de esteroides (incluidos los fitosteroides) y la incapacidad para excretarlos en la bilis, que cursa con altas concentraciones de fitosteroides en sangre, xantomatosis y aterosclerosis prematura. Esta enfermedad, es debida a la presencia de mutaciones en los genes *ABCG5/G8*<sup>198-200</sup>.

Hoy en día, el papel que juegan los genes *ABCG5/G8* en la determinación genética de las concentraciones de lípidos plasmáticos está siendo objeto de importantes y novedosas investigaciones, debido a la importante función de dichos transportadores en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol.

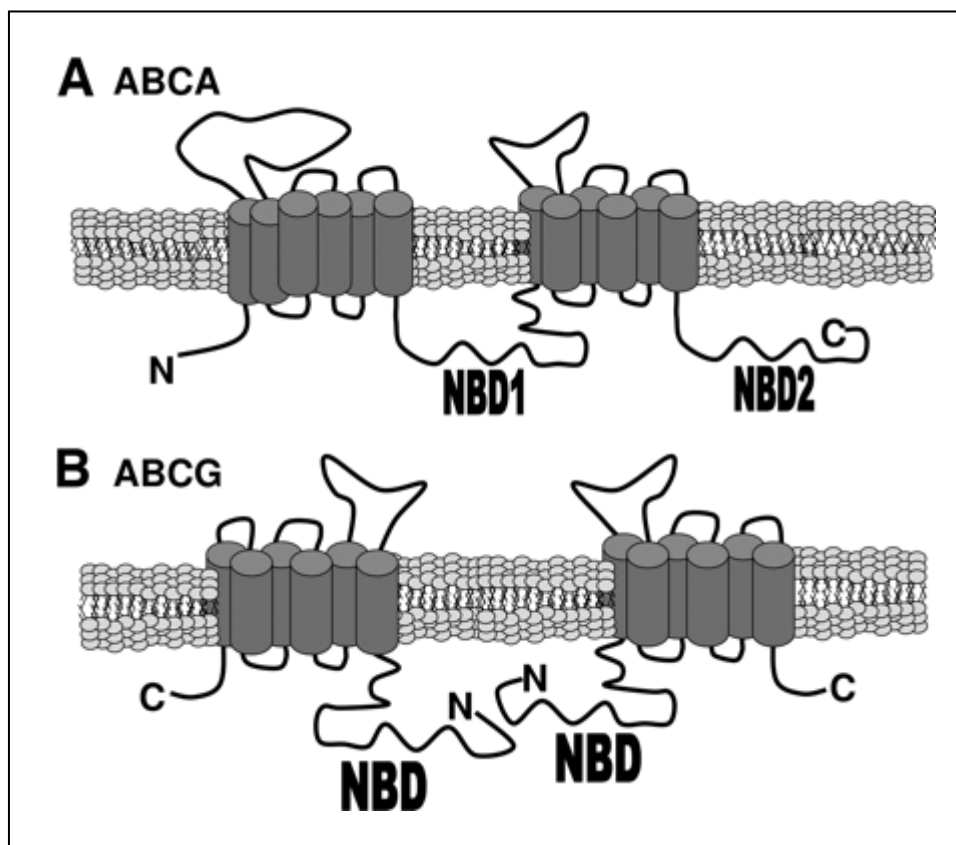
## **5.2. Estructura y Función de ABCG5/G8**

Los transportadores ABCG5 y ABCG8 son proteínas transmembrana, en forma de hemitransportadores, cuya asociación forma un dímero funcionalmente activo que bombea los esteroides absorbidos en el ribete estriado y los devuelve hacia el lumen intestinal. A su vez, actúa con el mismo fin a nivel hepático promoviendo la excreción

hacia la bilis de esteroides vegetales y contribuyendo a la secreción biliar de colesterol, por lo que controla de esta manera el flujo compensatorio de la entrada de esteroides que determina el balance neto de absorción<sup>201-203</sup>.

Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de transportadores de membrana ABC que está subdividida en 7 subclases (desde la subclase ABCA hasta la ABCG) y se caracteriza porque estas proteínas necesitan ATP para generar la energía necesaria para el transporte de metabolitos a través de sus membranas.

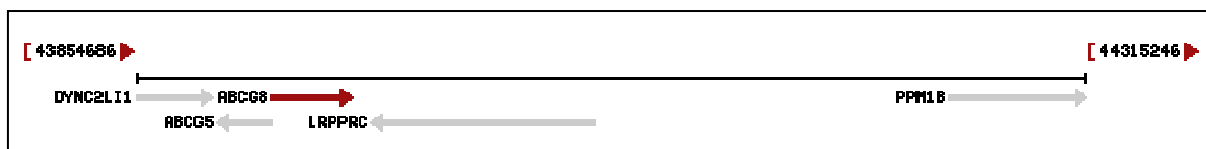
Se ha demostrado que la familia de transportadores ABC va a jugar un papel principal en la homeostasis del colesterol y en la expresión de ECV, sobre todo las subclases ABCA y ABCG<sup>204</sup> (**figura 6**).



NBD: dominios de unión. C: extremo C-terminal. N: extremo N-terminal

**Figura 6.** Orientación topográfica de los transportadores ABCA (A) y ABCG (B). Imagen obtenida de Jonh F. Oram, Ashley M. Vaughan. *Circulation research* 2006;99:1031

Los genes *ABCG5* y *ABCG8* que codifican estas proteínas, se encuentran ubicados en la banda 21 del brazo corto del cromosoma 2 (2p21), separados entre ellos por tan sólo 140 pares de bases y su expresión tiene lugar a nivel intestinal y hepático<sup>205</sup>, **figura 7**. Mutaciones en dichos genes dan lugar a la sitosterolemia en la que se ha demostrado que además de existir un exceso de esteroides vegetales provocado por la hiperabsorción de los mismos, estos pacientes también presenta hipercolesterolemia, por lo que parece que la absorción de colesterol podría ser más eficiente que en individuos sanos<sup>206</sup>.



**Figura 7.** Distribución de los genes *ABCG5-ABCG8*. **Cromosoma: 2; Localización: 2p21**

En cultivos celulares de hepatocitos, Graf y colaboradores<sup>202-204</sup> demostraron que *ABCG5/G8* funcionan como heterodímeros y que la expresión de ambos es necesaria para promover la excreción de esteroides vegetales hacia la bilis. Estudios realizados tanto en humanos como en animales de experimentación han demostrado que estos transportadores regulan la retención de esteroides así como la secreción biliar de colesterol<sup>207-211</sup>.

En un principio, las observaciones realizadas en los pacientes con mutaciones en los genes *ABCG5/G8* en las que sólo se acumulaban esteroides vegetales en plasma llevaron a pensar que estos transportadores intervenían de manera selectiva sobre los esteroides vegetales sin llegar a tener influencia sobre el colesterol. Posteriormente, Langheim y colaboradores<sup>212</sup> objetivaron, en modelos animales, que estos transportadores también promovían la secreción hepatobiliar de colesterol. En dicha secreción parece jugar un papel importante otro transportador ABC, el MDR2 (*ABCB4*) el cual se conoce porque media la secreción biliar de fosfolípidos y secundariamente de colesterol<sup>213</sup>.



En dichos estudios también se observó que la disminución en la absorción de esteroides vegetales en ratones con sobreexpresión de *ABCG5/G8* era atribuible a un incremento de la secreción biliar de colesterol por lo que se sugería que la capacidad de los enterocitos de secretar esteroides vegetales a través de *ABCG5/G8*, juega un papel menor en la regulación de la absorción neta de dichas sustancias. Por tanto, es conocido que el sistema *ABCG5/G8* en el hígado juega el papel más importante en el control dietético de la absorción de esteroides vegetales. Esta idea ha sido sustentada por un estudio que demostró que en un paciente con un trasplante hepático por transportadores *ABCG5/G8* genéticamente no funcionantes, normalizó las concentraciones de esteroides vegetales tras el trasplante a pesar de que en el intestino los transportadores *ABCG5/G8* aún estaban deteriorados <sup>214</sup>.

Los transportadores *ABCG5/G8* también se expresan en la membrana apical de los enterocitos, aunque en menor medida que en el hígado, y allí limitan la absorción de esteroides vegetales desde el lumen. También se ha mostrado en animales de experimentación que la absorción neta de colesterol se correlaciona con el grado de expresión de *ABCG5/G8* en yeyuno e íleon <sup>215</sup>. Recientemente, Tachibana y colaboradores <sup>216</sup> han confirmado que la expresión de *ABCG5/G8* a nivel intestinal es necesaria junto con los ácidos biliares para la efusión de esteroides vegetales por el enterocito. Aún así, parece ser que la vía de secreción intestinal de esteroides vegetales en el enterocito es el primer mecanismo de defensa ante un suplemento dietético de esteroides vegetales, pero que el principal papel en disminuir la fracción de absorción es llevado a cabo por la vía hepática de los transportadores *ABCG5/G8*.

En resumen, la fase mucosa comprende la transferencia del colesterol a través del ribete en cepillo hacia el interior del enterocito. Este proceso, que fue inicialmente atribuido a un mecanismo de difusión pasiva, en la actualidad se sabe que es un mecanismo altamente selectivo y que, con toda probabilidad, constituye el paso limitante en el control de la absorción del colesterol <sup>217</sup>. En este sentido, el descubrimiento de los transportadores *ABCG5* y *ABCG8* ha contribuido notablemente al conocimiento de los mecanismos que participan en la absorción intestinal de colesterol y esteroides vegetales. La expresión de estos transportadores parece ser exclusiva de la membrana de los enterocitos y de los hepatocitos. En el enterocito estos

transportadores actúan conjuntamente devolviendo los esteroides vegetales a la luz intestinal, con lo que impiden su absorción, mientras que en el hepatocito estos transportadores participan de forma crucial en el mecanismo de excreción biliar del colesterol<sup>208, 209</sup>.

### 5.2.1 Futuras investigaciones

En la actualidad, uno de los aspectos aún por dilucidar es hasta que punto la absorción de esteroides y colesterol comparten idénticos mecanismos, o si la vía del colesterol es totalmente independiente de la de los esteroides vegetales y del sistema ABCG5/G8. La hipótesis de un mecanismo compartido es avalada por los datos obtenidos de un estudio con un modelo de ratón transgénico, en el que la sobreexpresión de estas proteínas se acompañó de un aumento de la excreción biliar de colesterol y de un descenso del 50% en la tasa de absorción de colesterol y de esteroides vegetales<sup>210</sup>. Además, en otro estudio en que los ratones fueron alimentados con una dieta rica en colesterol se observó un aumento en la expresión del ARN mensajero de los transportadores ABCG5 y ABCG8 en el hígado e intestino delgado, lo que indica que estas proteínas pueden participar de forma directa en el mecanismo de regulación de la absorción y excreción de colesterol<sup>215</sup>. Otro argumento favorable al respecto podría ser que el tratamiento con ezetimiba reduce aproximadamente un 50% tanto la tasa de absorción de colesterol como la de esteroides vegetales<sup>189</sup>.

De cualquier forma, se ha establecido que en la captación del colesterol y de esteroides vegetales, en el ribete en cepillo, influye el sistema ABCG5/G8, aunque otras proteínas aún no identificadas podrían jugar un papel importante. En este sentido, recientemente se han identificado dos proteínas localizadas en la zona del ribete en cepillo, y ausentes en otros tejidos como el hepático, una de las cuales puede estar relacionada con la captación del colesterol mientras que la otra interacciona con los inhibidores de la absorción del colesterol<sup>218</sup>. Además, ha sido identificada la proteína *Niemann-Pick C1 like 1* (NPC1L1), la cual se expresa en la membrana de los enterocitos y parece jugar un papel importante en la absorción de esteroides vegetales procedentes de la dieta<sup>219, 220</sup>.

Desde el punto de vista terapéutico, la importancia de esta fase en la regulación de la absorción del colesterol y el descubrimiento de los transportadores ABCG5/G8 ha abierto un nuevo campo de estudio de los mecanismos genéticos reguladores de la absorción de colesterol.

### 5.3. Regulación de ABCG5/G8

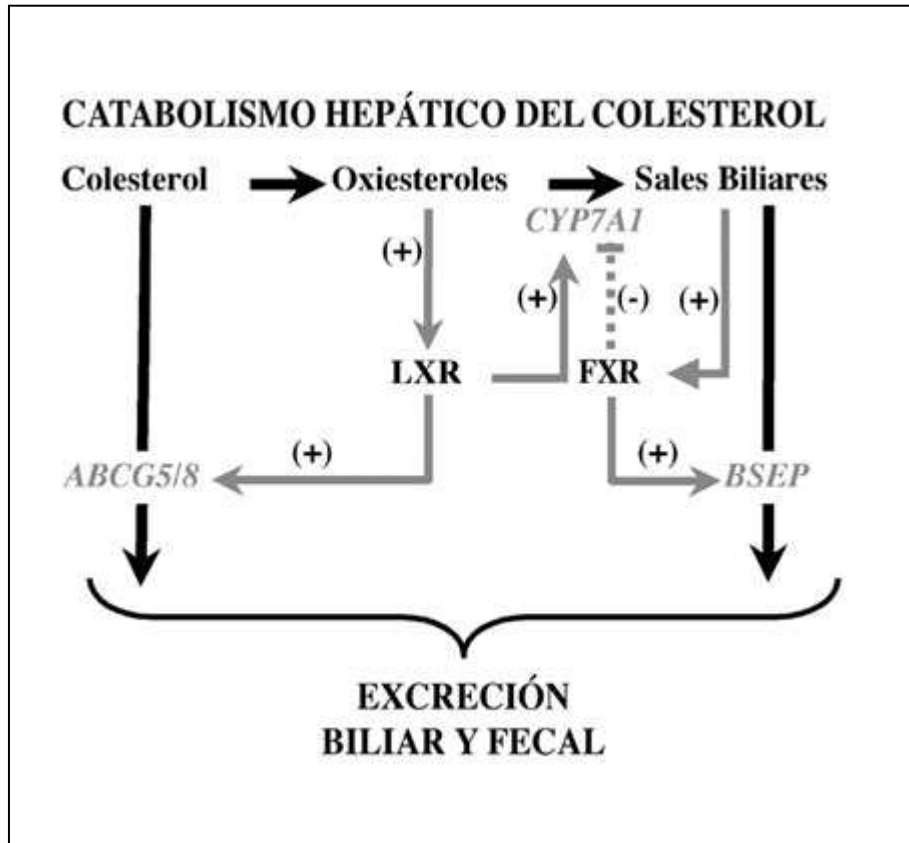
ABCG5 y ABCG8 son proteínas transportadoras que son reguladas por receptores nucleares heterodiméricos <sup>215</sup>.

Los receptores nucleares son factores transcripcionales que juegan un importante papel en la regulación de la expresión génica. Después de interactuar con sus ligandos específicos, los receptores nucleares se unen a regiones específicas del genoma y modifican la transcripción de numerosos genes <sup>221</sup>.

Dentro de los receptores nucleares existe un grupo de receptores que funcionan como heterodímeros del receptor retinoide X (RXR), por lo que también se les conoce como receptores nucleares heterodiméricos (RNH). Dentro de este grupo encontramos los receptores nucleares de oxisteroles o receptor X hepático (LXRs) y los receptores farnesoide X (FXRs). El descubrimiento de los ligandos endógenos de LXRs y FXRs ha establecido la importancia de estos receptores nucleares en el metabolismo hepático de colesterol <sup>222, 223</sup>.

El hígado es el órgano central del metabolismo corporal del colesterol, no sólo por su alta actividad sintética, sino porque elimina reguladamente este lípido a través de la vía biliar, tanto como colesterol libre como transformado en ácidos biliares <sup>188</sup>. Durante la biosíntesis de ácidos biliares el colesterol es modificado oxidativamente hasta oxisteroles. Estas moléculas activan potentemente al LXR <sup>222, 223</sup> y estimulan la transcripción del gen que codifica la enzima colesterol-7 $\alpha$ -hidroxilasa, aumentando la síntesis de ácidos biliares. Por su parte, los ácidos biliares neosintetizados en el hígado o captados desde la circulación, actúan como agonistas endógenos del receptor nuclear FXR <sup>224, 225</sup>, el cual, a su vez, reprime la síntesis de ácidos biliares a través de la disminución de la transcripción del gen de la colesterol-7 $\alpha$ -hidroxilasa. Así, estos dos

receptores actúan como sensores y moduladores de un fino sistema de regulación recíproca, que mantiene la homeostasis del colesterol por medio de su conversión a ácidos biliares, **figura 8**.



**Figura 8.** Relaciones funcionales entre los receptores nucleares LXR $\alpha$  y FXR en la regulación del metabolismo hepatocelular del colesterol. Cortés V. *Rev Med C* 2005;133:1483-1492

En resumen, la conversión del colesterol en sales biliares a nivel hepático constituye la principal vía de eliminación de colesterol del organismo y ocurre exclusivamente en los hepatocitos. Esta vía catabólica está regulada por la acción coordinada de los receptores nucleares LXR $\alpha$  y FXR. La activación de LXR $\alpha$  por oxisteroles determina la regulación positiva de la transcripción del gen de la enzima colesterol 7 $\alpha$  hidroxilasa (CYP7A1), la cual cataliza la etapa limitante en la síntesis de

sales biliares. Por su parte, las sales biliares activan al receptor FXR, el cual, en forma opuesta a LXR $\alpha$ , inhibe la expresión de CYP7A1.

Adicionalmente, LXR $\alpha$  y FXR aumentan el transporte de colesterol libre y sales biliares hacia la bilis aumentando la expresión de los genes *ABCG5/G8* y *BSEP (bile salt export pump)*, respectivamente, los cuales determinan la excreción de estos lípidos a través de la membrana canalicular hepatocitaria.

En definitiva, la mayoría del conocimiento que concierne al papel que juegan los genes *ABCG5/G8* sobre el metabolismo lipídico proviene de modelos animales. Así, se ha demostrado en ratones, que la deficiencia de *ABCG5/G8* se ha asociado con una reducción en la secreción biliar de colesterol y un realce de la absorción de esteroides a nivel intestinal <sup>208</sup>. Por el contrario, la sobreexpresión de aquellos genes provoca un aumento en la secreción biliar de colesterol y una reducción de la absorción del colesterol procedente de la dieta y un incremento de la excreción fecal de esteroides <sup>209</sup>. Además, se ha demostrado recientemente que aquellos genes juegan un papel primordial en la vía del TRC y prevención de la aterosclerosis a través de su regulación por agonistas LXR <sup>226, 227</sup>.

### Receptor LXR

El receptor LXR existe como dos isoformas funcionales: LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ . La primera es expresada mayoritariamente en el hígado y en menor medida en el intestino, tejido adiposo, riñón, bazo y macrófagos <sup>228</sup>. LXR $\beta$ , en cambio, se expresa en casi todos los tejidos del organismo.

De los 2 tipos existentes, hay evidencias de que es LXR $\alpha$ , el que ejerce una mayor influencia sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Gracias al fenotipo de los ratones transgénicos deficientes de LXR $\alpha$  se conoce la relevancia de este receptor en el metabolismo lipídico. Estos animales presentan basalmente hipercolesterolemia y son incapaces de manejar sobrecargas dietéticas de colesterol, lo que determina mayor hipercolesterolemia y acumulación hepática masiva de este lípido <sup>209</sup>. Concordantemente, estos animales presentan un *pool* reducido de ácidos biliares y son

resistentes a estímulos que normalmente incrementan su tamaño, indicando un defecto en el catabolismo terminal de colesterol a nivel hepático.

En el hígado, el LXR $\alpha$  estimula la síntesis de sales biliares <sup>229</sup> e incrementa la secreción biliar de colesterol como resultado de una mayor expresión de los transportadores *ABCG5* y *ABCG8* en la membrana canalicular de los hepatocitos. De manera coordinada, la activación de LXR $\alpha$  incrementa la expresión de los mismos transportadores en la superficie apical del enterocito, con lo que disminuye la absorción intestinal de esteroides <sup>230</sup>. Estos dos efectos resultan, finalmente, en una mayor excreción de esteroides en las deposiciones y en un balance negativo de colesterol en el organismo, **figura 8**.

Los modelos experimentales citados permiten suponer que drogas capaces de activar LXR $\alpha$  deberían promover un perfil lipoproteico anti-aterogénico, facilitando el movimiento de colesterol desde la periferia hacia el hígado y su eliminación por las heces. Otros estudios han confirmado que LXR $\alpha$  regula la expresión de genes involucrados en el metabolismo del c-HDL <sup>231-233</sup>, aumenta la expresión de apolipoproteína E <sup>234, 235</sup> y eleva los niveles de la enzima de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) <sup>236</sup>. Esta enzima promueve el transporte reverso de colesterol y se ha demostrado en modelos murinos de resistencia insulínica que agonistas sintéticos de LXR $\alpha$ , incrementan significativamente la sensibilidad a la insulina y reducen paralelamente la glucemia <sup>237, 238</sup>.

Por otro lado, no todo son efectos beneficiosos por parte de LXR $\alpha$ . En este sentido se ha visto en animales de experimentación que la activación de LXR $\alpha$  induce hipertrigliceridemia, probablemente por una mayor lipogénesis hepática <sup>239, 240</sup>.

En definitiva, todos estos descubrimientos han convertido a los receptores nucleares heterodiméricos LXR en uno de los elementos más importantes del metabolismo hepático del colesterol y del metabolismo hidrocarbonado, convirtiéndose en diana para la investigación de nuevos agentes terapéuticos.

#### 5.4. Papel de *ABCG5/G8* en la enfermedad cardiovascular

Es conocido que mutaciones en los genes *ABCG5* y *ABCG8* dan lugar a un raro desorden genético llamado sitosterolemia. Esta enfermedad se caracteriza por un alto riesgo de ECP como consecuencia de un marcado aumento de las concentraciones de esteroides vegetales en plasma así como por un modesto incremento de las concentraciones de colesterol. Esto es provocado por la hiperabsorción de colesterol y esteroides vegetales a nivel intestinal y por una falta de excreción de los mismos hacia la bilis <sup>241, 242</sup>.

Los pacientes con sitosterolemia, al igual que ocurre en HFh, son altamente sensibles a dietas ricas en colesterol, convirtiéndose en marcadamente hipercolesterolémicos cuando se alimentan de dicha dieta <sup>243</sup>. No obstante, es conocido que existe una gran variabilidad interindividual en la respuesta de la colesterolemia a una sobrecarga dietética de colesterol, atribuible en parte a diferencias en la eficiencia de la absorción intestinal <sup>244-248</sup>.

A su vez, en la amplia dispersión de concentraciones plasmáticas de fitosteroides (indicativas de distintas tasas de absorción intestinal del colesterol) se ha visto que ejerce gran influencia la presencia de polimorfismos en el gen *ABCG8* <sup>249</sup>. También se ha demostrado que la inducción de diabetes tipo 1 en ratas conduce a una disminución de la expresión de *ABCG5* y *ABCG8* en hígado e intestino, así como a una alteración del flujo de esteroides y colesterol <sup>250</sup>. Recientemente Lally y colaboradores <sup>251</sup>, demostraron que pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan alta expresión de NCP1L1 y baja expresión de ARNm para *ABCG5/G8* en comparación con sujetos no diabéticos.

También se ha demostrado que la sobreexpresión de *ABCG5* y *ABCG8* sobre ratones aterogénicos atenúa la aterosclerosis inducida por la dieta en asociación con una disminución de las concentraciones de colesterol en plasma e hígado <sup>208</sup>. Este descubrimiento también sugiere que intervenciones farmacológicas que realcen la vía *ABCG5/G8* podrían proteger contra la ECV en pacientes con hipercolesterolemia debido a la eliminación de más colesterol a través de la bilis y la reducción de sus concentraciones en plasma.

De esta manera, variaciones genéticas en la zona *ABCG5/G8* han sido objeto de estudio. Así, Hubacek y colaboradores estudiaron la influencia de cinco polimorfismos (uno en el gen *ABCG5* y cuatro en el gen *ABCG8*) sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos tras cambios en la dieta. Ellos concluyen que dos de los SNPs estudiados (Tyr54Cys y Thr400Lys en el gen *ABCG8*) ejercían un papel determinante sobre las concentraciones plasmáticas de colesterol, ya que la presencia de dichos polimorfismos se encontraba relacionada con una reducción en las concentraciones de CT y de c-LDL. Además, estos autores observaron que dicha respuesta a los cambios de la dieta era género-específica produciéndose sólo en mujeres y demostrando que aquellos polimorfismos podrían tener un potencial interés sobre como variaciones genéticas en esta zona y podían influir sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos <sup>252</sup>.

Recientemente, se ha demostrado también que la presencia del polimorfismo C1895T en el gen *ABCG8* y la presencia del polimorfismo C1950G sobre el gen *ABCG5* se asocian con variaciones en las concentraciones de colesterol plasmático en niños prepuberales, como respuesta a cambios en la dieta <sup>253</sup>. Esta importante interacción gen-nutriente podría explicar la diferente respuesta existente entre individuos en cuanto a las concentraciones de lípidos plasmáticos tras la ingesta de grasa.

Además de producirse esta diferente respuesta en la dieta, determinados polimorfismos en los genes *ABCG5/G8* se han asociado con cambios en el metabolismo de colesterol durante la pérdida de peso <sup>254</sup> e incluso con una diferente respuesta al tratamiento con estatinas <sup>255, 256</sup>.

También en pacientes con presencia de cálculos en vesícula biliar, se ha demostrado asociación estadística entre SNPs en los genes *ABCG5/G8* y concentraciones de lípidos plasmáticos. Así, un estudio demostró asociación entre el SNP *ABCG5\_Gln604Glu* y concentraciones plasmáticas de c-HDL <sup>257</sup>, mientras que otro estudio encontró asociación entre el SNP *ABCG8\_Thr400Lys* y TG <sup>258</sup>.



Otros muchos estudios han demostrado, en diversas poblaciones, que la presencia de variaciones genéticas en los genes *ABCG5/G8* pueden afectar a las concentraciones de lípidos plasmáticos en humanos <sup>259-261</sup>.

En relación a estos genes y a pesar de la importancia que variaciones genéticas sobre *ABCG5/G8* tienen sobre el metabolismo del colesterol, muy pocos estudios se han llevado a cabo en pacientes con HF. Miwa y colaboradores <sup>262</sup>, estudiaron la influencia que un nuevo polimorfismo (M429V) sobre el gen *ABCG8* tenía sobre la absorción de colesterol en 100 pacientes japoneses con hipercolesterolemia primaria demostrando que en un 8% de los pacientes, el nuevo polimorfismo estaba asociado con alta eficacia en la absorción de colesterol.

Recientemente Koeijvoets y colaboradores <sup>263</sup>, estudiaron la posible relación entre la presencia de los polimorfismos D19H y T400K sobre el gen *ABCG8* y ECV en pacientes con HFh. Sus resultados mostraron que existía asociación entre el polimorfismo D19H y enfermedad coronaria y que individuos homocigotos para el genotipo de riesgo en el polimorfismo T400K presentaban un incremento del riesgo cardiovascular, concluyendo que variaciones genéticas en el gen *ABCG8* podrían tener influencia sobre el desarrollo de arteriosclerosis. A pesar de ello, no encontraron asociación entre estos SNPs y las concentraciones plasmáticas de colesterol.

Por otro lado, recientemente se ha descubierto la importancia que sobre el metabolismo lipídico tiene la interacción de variantes genéticas en los genes *ABCG5/G8* con el tabaco. Así, Junyent y colaboradores <sup>264</sup> demostraron que la presencia de variaciones genéticas en dichos genes, modulan el efecto que el tabaco tiene sobre las concentraciones plasmáticas de c-HDL.

En resumen, todas estas observaciones que se han realizado sobre *ABCG5/G8*, junto con la importante función que estos transportadores tienen sobre el mantenimiento de la homeostasis del colesterol, sugieren que la presencia de variaciones genéticas en estas localizaciones podría determinar alteraciones en el metabolismo lipídico, teniendo como consecuencia una modificación en el riesgo cardiovascular. Por tanto, el estudio de estas variaciones genéticas podría dar respuesta a la alta variabilidad interindividual

en cuanto a expresión clínica, respuesta a la dieta y respuesta al tratamiento farmacológico, existente en pacientes con HFh.

### III. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La incidencia y características de la enfermedad cardiovascular que afecta a los pacientes con Hipercolesterolemia Familiar heterocigota (HFh) es altamente variable, en términos de edad de comienzo y severidad, incluso en pacientes portadores de la misma mutación en el LDLR<sup>74, 157</sup>. Esto sugiere que otros factores ambientales, genéticos o interacciones genes-ambiente podrían jugar un importante papel en el desarrollo de arteriosclerosis de estos pacientes<sup>159, 160</sup>.

Recientemente se ha demostrado que los transportadores ABCG5/G8 realizan un papel fundamental promoviendo la excreción de colesterol a través de la vía del transporte reverso de colesterol<sup>226, 227, 265</sup>. En este sentido, numerosos estudios han puesto de manifiesto la asociación existente entre variaciones genéticas en los genes *ABCG5/G8* y las concentraciones de lípidos plasmáticos, principalmente c-HDL<sup>257-260, 262</sup>. Dentro de estas variaciones, el polimorfismo Y54C en el gen *ABCG8* ha presentado importantes asociaciones con CT y c-HDL, en diferentes estudios<sup>252, 254, 264</sup>.

A pesar de la importancia contrastada que los transportadores *ABCG5/G8* tienen en la cinética del colesterol en humanos, muy pocos estudios han investigado el papel que la presencia de variantes genéticas en estos locus podría tener sobre las concentraciones finales de lípidos plasmáticos en pacientes con HF.

Por tanto, si tenemos en cuenta que la HFh es una enfermedad muy heterogénea en cuanto a su expresión clínica y que los mecanismos responsables de la variabilidad individual en la respuesta dietética y farmacológica permanecen inciertos, nuestra **hipótesis** es que variaciones genéticas en los genes *ABCG5/G8* podrían tener influencia sobre las concentraciones de c-HDL y otros lípidos plasmáticos. Esto podría explicar la alta variabilidad interindividual y el alto riesgo de enfermedad cardiovascular que presentan los pacientes con HFh.

## **IV. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

En base a lo expuesto en nuestra hipótesis de trabajo, nuestro objetivo principal fue analizar si la presencia del polimorfismo Y54C en el gen del transportador *ABCG8* modula las concentraciones de c-HDL en pacientes con HFh, así como estudiar la influencia que sobre las concentraciones de c-HDL pueden tener otros polimorfismos existentes en la zona *ABCG5/G8* adyacentes al SNP Y54C.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

1. Determinar si la presencia del polimorfismo Y54C en el gen del transportador *ABCG8* modifica las concentraciones de otros lípidos plasmáticos: CT, c-LDL, TG, Apo A-I, ApoB y Lp (a), en el mismo grupo de pacientes.

2. Analizar si la presencia del SNP Y54C en el gen del *ABCG8* modula las concentraciones de LDL oxidada y de lipoperóxidos plasmáticos.

3. Estudiar las posibles interacciones existentes entre el polimorfismo Y54C en el gen *ABCG8* y otras variables de riesgo en hipercolesterolemia familiar heterocigota (sexo, tabaco, obesidad, presencia de xantomas y/o arco corneal).

4. Determinar el efecto que otros polimorfismos existentes en la zona *ABCG5/G8* adyacentes al SNP Y54C, pueden tener sobre las concentraciones de otros lípidos plasmáticos (CT, TG y c-LDL), así como estudiar las posibles interacciones entre estos nuevos polimorfismos y variables de riesgo en los mismos pacientes.

## **V. DISEÑO Y METODOLOGÍA**

### **1. COHORTE ESPAÑOLA DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR HETEROCIGOTA**

Los pacientes fueron seleccionados de la cohorte que la Fundación Española de Hipercolesterolemia Familiar tiene en España, ([info@colesterolfamiliar.com](mailto:info@colesterolfamiliar.com)). Esta cohorte está formada por un total de 1260 pacientes procedentes de familias distintas de diversas regiones del país.

La cohorte de pacientes con HF se creó con el objetivo de desarrollar un programa de seguimiento y evaluación periódica a largo plazo de familias con este diagnóstico lo que permitiría estudiar el riesgo (pronóstico) y la supervivencia en función de las características sociodemográficas, clínicas (fenotípicas) y genotípicas de los pacientes.

En un principio los pacientes fueron reclutados de 10 centros hospitalarios españoles y en la actualidad hasta 77 unidades de lípidos a lo largo de todo el país se encuentran participando en la cohorte bajo un protocolo estandarizado y con datos recogidos de manera homogénea por todas ellas.

#### **1.1. Funciones de las unidades de lípidos implicadas**

Las funciones de las unidades implicadas en su creación se recogieron siguiendo un protocolo estandarizado en el que existía un centro coordinador de referencia con sede en Madrid (Fundación de Hipercolesterolemia Familiar) encargado de coordinar las distintas unidades de lípidos participantes en el proyecto. Tanto el centro coordinador como las unidades de lípidos siguieron el protocolo previamente establecido, en el que aparecían definidas las funciones y objetivos de cada una de las partes.

### 1.1.1. Funciones del centro coordinador:

El centro coordinador de creación de la cohorte fue la Fundación de Hipercolesterolemia Familiar. Desde la fundación se estableció el manual de operaciones implicadas en el protocolo y además de coordinar, fue el centro de referencia para cada una de las Unidades de Lípidos implicadas en el proyecto. Las funciones del centro coordinador fueron las siguientes:

- Diseño del protocolo, manual de operaciones, cuaderno de registro y base de datos
- Contacto con centros e identificación de coordinadores locales
- Estudio piloto: identificación y registro de familiares de casos índice
- Apoyo a las Unidades de Lípidos para: contacto con los participantes, recuerdo de citas y recopilación de información epidemiológica
- Contacto con médicos de familia
- Seguimiento bianual de la cohorte de familiares
- Coordinación para la recogida de información genética, clínica y epidemiológica con Unidades de Lípidos y laboratorios
- Evaluación de eventos cardiovasculares (enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica) y episodios fatales (Instituto Nacional Estadística), estableciendo un comité independiente de confirmación de eventos de acuerdo a los criterios OMS-MONICA<sup>266, 267</sup>.
- Análisis estadístico de datos (demográficos, clínicos, analíticos, genéticos) y estimación del riesgo global individual según escala de riesgo Framingham.

### 1.1.2. Funciones de las Unidades de Lípidos:

Las funciones de las distintas Unidades de Lípidos implicadas en el proyecto se encontraban recogidas dentro del protocolo diseñado y todas debían de seguir los mismos criterios en la recogida de datos con el fin de homogeneizar toda la información. Las funciones recogidas dentro del protocolo para cada una de las Unidades de Lípidos fueron:

- Citación y contacto con los casos índice y familiares de 1º y 2º grado del caso índice
- Programación de las visitas con los participantes en el estudio
- Información a los participantes
- Obtención del consentimiento informado
- Realización de una entrevista médica estructurada y recogida de encuesta dietética
- Realización de un examen clínico estandarizado
- Extracción de muestras de sangre y orina
- Envío de muestras de sangre y orina al laboratorio centralizado
- Grabación de los datos en una base de datos informatizada

## **1.2. Descripción de las visitas**

Para llevar a cabo las exploraciones establecidas en el protocolo se realizaron un máximo de dos visitas, cada una de ellas con unos objetivos previamente definidos. Las Unidades de Lípidos organizaron su calendario de la forma más eficiente, según sus posibilidades. El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

- Se programó, por teléfono, una cita para la primera visita y se asignó al paciente un número de identificación (dado por el Centro de Coordinación al responsable de la Unidad de Lípidos)
- Se hizo un recordatorio mediante comunicación telefónica con información del proyecto que incluía las instrucciones de la primera visita, pidiéndole al sujeto que llevara:
  1. Muestras de toda su medicación habitual tanto prescritas como automedicación, vitaminas y suplementos dietéticos
  2. Nombre, dirección completa y teléfono de su médico de familia
  3. Se le advirtió que vistiera ropa confortable
  4. Se les dieron instrucciones para ir en ayunas y con muestra de orina recogida en la mañana de la cita
- Las visitas se realizaron en un tiempo máximo de un mes
- En ambas visitas era necesario que el sujeto estuviera en ayunas de al menos 12 horas aunque se le permitió tomar la medicación prescrita por su médico. Si el

individuo fumaba, debía evitarlo durante la mañana del estudio. Se les recomendó que no realizaran ningún otro ejercicio intenso los dos días previos a la cita

- El personal del estudio se aseguró antes de que llegara el paciente, que los formularios, etiquetas, tubos de muestras de sangre y orina estaban preparadas e identificadas
- Cuando el participante llegó se le agradeció su cooperación y se le explicó nuevamente en que consistía el estudio. El individuo podía recibir información sobre su estado de salud si lo deseaba
- Se le informó sobre el objetivo del estudio y en que consistirían las exploraciones ese día
- El participante debía leer y firmar entonces el consentimiento informado con consentimiento específico para el ADN y material genético.

#### 1.2.1. Funciones durante la primera visita:

Durante la primera visita se cumplió el siguiente protocolo:

- Explicación del estudio y firma del consentimiento informado
- Entrevista clínica estructurada mediante cuestionario
- Exploración física que incluía:
  - Antropometría. Se anotó el peso (Kg) y se midió la talla (cm), la cintura (cm), la cadera (cm) y pliegue tricípital
  - Determinación de la tensión arterial en brazo con aparato de medida OMROM 705 (IntelliSense Blood Pressure Monitor, Model: HEM705C, by Omron), tanto la presión arterial sistólica (PAS) como la presión arterial diastólica (PAD) se tomaron en dos veces sucesivas (mmHg) separadas 5 minutos
  - Toma de Presión Sistólica en tobillo con aparato de medida OMROM 705 en dos ocasiones sucesivas (mmHg) separadas 5 minutos
  - Toma de frecuencia cardíaca (FC) y tipo de ritmo cardíaco en dos ocasiones sucesivas (lat/m)
  - Búsqueda de soplos cardíacos y vasculares (carotídeos, femorales, etc.)
  - Exploración de pulsos periféricos



- Exploración de arco corneal
- Exploración de xantomas tendinosos (aquíleos, extensores de la mano, codos, rodillas, palmares)
- Electrocardiograma (ECG). Si no era posible la realización del ECG en esta primera visita, se citaría al paciente para la realización del estudio en la 2ª visita. Era válido un ECG realizado los 6 meses anteriores
- Se debían extraer muestras sanguíneas para realizar hemograma y perfil bioquímico
- Radiografía de tórax (válida una radiografía obtenida en el último año)

### 1.2.2. Funciones durante la segunda visita:

- Esta visita se realizó como complementaria de la primera visita, si no se había logrado realizar todo lo previsto en la primera.

Se consideró hipertenso a todo sujeto con una media de los valores de dos tomas de presión arterial sistólica y/o diastólica en sedestación, mayores o iguales a 140/90 mmHg, respectivamente, y/o cifras inferiores de presión arterial pero en tratamiento activo con fármacos antihipertensivos (criterio JNC-VI) <sup>268</sup>.

Se siguieron los criterios de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) <sup>269</sup>, por el que se consideraba diabético a aquellos sujetos que tienen:

1. Síntomas de diabetes asociados al hallazgo de una glucemia  $\geq 200$  mg/dL en una determinación llevada a cabo a cualquier hora del día independientemente de la hora de la última comida. Los síntomas de diabetes incluyen poliuria, polidipsia y pérdida no explicada de peso ó
2. Glucemia en ayunas  $\geq 126$  mg/dL (ayuno de 8 horas o más) ó
3. Glucemia  $\geq 200$  mg/dL a las 2 horas de la prueba de sobrecarga oral con 75 g de glucosa disueltos.

Para la definición de obesidad se siguieron los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), según la cual se considera obeso a toda persona con un IMC  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup> y sobrepeso a toda persona con un IMC entre 25-29.9 Kg/m<sup>2</sup>.

## 2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

### 2.1. Proceso de selección de los participantes

Los pacientes de nuestro estudio fueron seleccionados de la cohorte que la Fundación Española de HFh tiene en nuestro país <sup>270</sup>.

Dentro de cada familia recogida de la cohorte, existe un caso índice que es el que ha transmitido la enfermedad a sus descendientes. Por tanto, la cohorte está compuesta por pacientes con HFh (casos índice) y familiares con y sin HFh, según hayan heredado o no la enfermedad. De los 1260 sujetos registrados en la cohorte, existen 303 casos índice (pacientes con HFh) y 957 familiares entre afectados o no de HFh. Entre casos índice y familiares que han heredado la enfermedad, un total de 795 pacientes tienen un diagnóstico de certeza de HFh por presentar una mutación en el gen del RLDL. El diagnóstico genético de certeza se suele realizar a pacientes con un diagnóstico clínico  $\geq 6$  dentro del *score* de los criterios MEDPED para diagnóstico clínico de HFh.

Para el estudio fueron seleccionados sólo sujetos con un diagnóstico de certeza de HFh. Con el fin de homogeneizar la muestra y tras eliminar los sujetos con datos perdidos en el proceso de genotipado y la eliminación de aquellos con datos faltantes en alguna de las variables principales estudiadas (CT, c-LDL, c-HDL y TG), la muestra quedó comprendida en 586 sujetos.

## **2.2. Criterios de inclusión**

Para nuestro estudio, se aplicaron los siguientes criterios de inclusión:

1. Familiares de primer grado naturales (padres, hermanos, hijos) y segundo grado naturales (abuelos, sobrinos, primos, tíos) de los casos afectos de HFh con una edad mayor a 15 años
2. Diagnóstico genético de HFh (mutación en el gen del RLDL) y perteneciente a la cohorte de seguimiento de HFh
3. Sin antecedentes de otras enfermedades del metabolismo lipídico
4. Firma del consentimiento informado genérico de participación en la cohorte de HF.

## **2.3. Criterios de exclusión**

Se siguieron los siguientes criterios de exclusión:

1. Diagnóstico clínico de HFh según los criterios MEDPED de la OMS de 1992
2. Historia clínica o de laboratorio incompleta dentro de la base de HFh
3. Imposibilidad física o mental para acudir a las citas programadas con el médico
4. Personas institucionalizadas en centros
5. Incapacidad para dar el consentimiento informado

## **2.4. Cálculo del tamaño muestral**

El cálculo del tamaño muestral se realizó en base a las siguientes asunciones:

- Variable principal del estudio: concentraciones plasmáticas de c-HDL
- Diferencia mínima esperada: 4 mg/dl ( $H_0 = 50$  mg/dL;  $H_1 = 46$  mg/dL)
- Desviación estándar: 10
- Riesgo alfa: 0.05
- Potencia ( $1-\beta$ ): 0.90
- Pérdidas estimadas: 5%

En base a estas premisas se precisaban al menos 58 pacientes, en cada uno de los grupos estudiados.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y la Fundación Jiménez Díaz (Madrid).

### 3. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio de corte transversal en el seno de la cohorte española de Hipercolesterolemia Familiar. La muestra seleccionada estaba formada por 586 pacientes con un diagnóstico de certeza de HFh (por presentar mutación en el gen del RLDL), a los que se les realizó un análisis del polimorfismo Y54C en el gen del *ABCG8* con el fin de estudiar el efecto de este SNP sobre las concentraciones de c-HDL, CT, c-LDL, TG, ApoA-I, ApoB y Lp (a), así como su influencia sobre parámetros de estrés oxidativo como LDL-ox y LPO.

Tras el análisis del genotipo Y54C los sujetos se dividieron en tres grupos: homocigotos para el alelo de menor frecuencia (GG), homocigotos para el alelo de mayor frecuencia (AA) o heterocigotos (AG). Según los resultados encontrados, modelo dominante o recesivo, los individuos fueron agrupados en dos grupos para corroborar los resultados obtenidos en el análisis de las tres isoformas del SNP.

Sobre la misma muestra de pacientes y con el fin de analizar la influencia de otras variaciones genéticas en la misma zona de los genes *ABCG5/G8*, se estudiaron otros 8 polimorfismos adyacentes al polimorfismo Y54C. De entre los nuevos polimorfismos seleccionados, 4 se encontraban en el gen *ABCG5* (i7892A>G, rs4131229; i18429C>T, rs4148189; i11836G>A, rs4289236; Q604EC>G, rs6720173) y otros 4 en el gen *ABCG8* (5U145T>G, rs3806471; i14222T>C, rs6709904; T400KG>T, rs4148217; D19HG>C, rs11887534). Siguiendo la pauta marcada con el SNP Y54C, según las tendencias en los resultados encontradas en el primer análisis de

las 3 isoformas de cada uno de los SNPs, los individuos serían estudiados posteriormente en dos grupos, con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos tras el primer análisis.

## **4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS Y BIOQUÍMICAS**

### **4.1. Extracción y almacenamiento de las muestras de sangre**

El proceso llevado a cabo para la extracción y almacenamiento de las muestras de sangre fue el siguiente:

- Las muestras sanguíneas se recogieron en la primera visita
- Las muestras se debían de extraer después de un periodo de ayuno de al menos 12 horas
- Durante la extracción el participante permanecería en una posición estándar (sedestación)
- Para evitar la hemoconcentración, una vez insertada la aguja, se retiró el compresor y se esperó unos 10 segundos antes de la extracción de la muestra
- Para evitar la hemólisis, se retiró la aguja de la jeringa antes de pasar la sangre de la jeringa a los tubos de recogida. Asimismo los tubos tenían anticoagulante
- Se recogieron 4 tubos de sangre, 1 tubo con EDTA (10 mL) para la obtención de ADN; 2 tubos de 10 mL con gelbond para la obtención de suero y la determinación de análisis de bioquímica y perfil lipídico, y un tubo con citrato (10 mL) para la obtención de plasma
- Todas las muestras debían tener las etiquetas de identificación con el mismo código
- También se extrajeron muestras para realizar hemograma (hematocrito, hemoglobina, leucocitos, plaquetas, recuento linfocitos, recuento de neutrófilos y velocidad de sedimentación) y perfil bioquímico (glucosa, CT, c-HDL, c-LDL, TG, creatinina, ácido úrico, AST, ALT, GGT, fosfatasa alcalina, Lp (a), LPO, LDL-ox, CPK, TSH y T4), todo ello en el propio hospital de cada unidad.

Tanto el hemograma como el perfil bioquímico se consideraron válidos si se habían obtenido alguno en los 6 últimos meses anteriores. Para TSH y T4 se consideró válido un valor en el último año.

## 4.2. Determinaciones bioquímicas básicas

Inmediatamente después de la extracción sanguínea, se procedió a la separación del plasma mediante ultracentrifugación a 3.000 revoluciones por minuto (10 minutos, 1.500 g, 4°C). Posteriormente, las muestras de plasma fueron alicuotadas, refrigeradas y congeladas a -30°C.

Las determinaciones de las concentraciones lipídicas en suero se realizaron en un autoanalizador ISE-4-DDPPEEPP Modular Analytics (F. Hoffman-La Roche®, Basilea, Suiza) por técnicas espectrofotométricas (métodos enzimáticos colorimétricos): método de oxidación-peroxidación para CT y TG <sup>271, 272</sup>. El c-HDL fue determinado después de la precipitación con ácido fosfowolfrámico <sup>273</sup>; el c-LDL, se calculó mediante la fórmula de Fiedewald ( $c\text{-LDL} = CT - c\text{-HDL} - (TG/5)$ ) <sup>274</sup>. Cuando los TG eran menores de 300 mg/dL, las concentraciones de VLDL-c fueron calculadas por la fórmula TG/5. Si la concentración de TG era mayor a 300 mg/dl; las concentraciones de c-VLDL fueron calculadas por ultracentrifugación. ApoA-I, ApoB, y Lp (a), se determinaron mediante técnicas de inmunturbidimetría (Boehringer, Mannheim, Germany) <sup>275</sup>.

Para las determinaciones de AST/ALT se usó un autoanalizador Hitachi PA Hitachi P-800 (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) por métodos enzimáticos colorimétricos (Byosistem, Barcelona, Spain; coeficiente de variación interensayo <6% y 2% respectivamente). Las determinaciones hormonales de TSH y T4 libre fueron medidas mediante un método de inmunoensayo enzimático de micropartículas (Abott Diagnostics, Matsudo-shi, Japan; CV 2,5%-6%).

### 4.3. Cuantificación de LDL oxidada y lipoperóxidos

Para la determinación de las concentraciones de LDL-ox, se procedió a la extracción de sangre venosa y se anticoaguló con K3EDTA (2 mg/mL), conservándola en hielo.

La concentración circulante de LDL-ox se cuantificó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando un anticuerpo monoclonal murino (mAB-4E6-) comercializado (Oxidized LDL ELISA, Mecordia, Upsala, Sweden; límite de detección < 1 mU/L; coeficiente de variación intraensayo en nuestro laboratorio: 5,5 - 6,2%).

El anticuerpo monoclonal está específicamente dirigido frente a un epítipo de la ApoB-100 de la superficie de la molécula de c-LDL que se produce al sustituir los aldehídos de la ApoB-100 por, al menos, 60 residuos de lisina. Los aldehídos son liberados por las células endoteliales sometidas a estrés oxidativo por peroxidación lipídica o por las plaquetas activadas que también pueden producir modificaciones oxidativas de la ApoB-100 en ausencia de lipoperoxidación.

La especificidad de la prueba es excelente. Los valores de C50 (concentración necesaria para obtener una inhibición del 50% de la fijación del anticuerpo en la ELISA) son 25 mg/dL de LDL nativa obtenida mediante ultracentrifugación del plasma de voluntarios sanos y 0,025 mg/dL de LDL-ox con un mínimo de 60 aldehídos sustituidos por lisina por ApoB-100 obtenida mediante oxidación inducida por cobre iónico de la misma LDL-c. De este modo, una concentración plasmática de LDL-c de 160 mg/dL puede contribuir a la obtención de una concentración de LDL-ox <0,2 mg/dL<sup>276</sup>.

Para la cuantificación de los lipoperóxidos (LPO) en plasma se usó un kit de determinación colorimétrico (LPO-CC. Kamiya Biomedical Company). Las mediciones de las muestras se realizaron por duplicado. En primer lugar, a 10 µL de muestra, estándar (50nmol/mL de Cumene Hydroperoxide) o blanco (PBS) se le añadió 100 µL del reactivo 1 (Enzyme Reagent: Lyophilized Enzyme Reagent (Ascórbico oxidasa y

Lipoprotein lipasa) + Buffer Solution). Una vez mezclados e incubados durante 5 minutos a 30°C, se les añadió 200 µL de reactivo 2 (Chromogen Reagent: Lyophilized Chromogen Reagent (Cromógeno MCDP) + Buffer Solution (Buffer y hemoglobina). A continuación se mezcló y se incubó 10 minutos a 30°C. Por último, se pasó a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 675 nm en un fluorímetro (SPECTRA Fluor. Tecan).

## **5. ANÁLISIS GENÉTICO**

### **5.1. Aislamiento del ADN**

El ADN fue aislado de las muestras de sangre periférica y purificado usando el *kit Puregene® DNA Purification* (Gentra Systems, Valencia, CA, USA), siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial.

El ADN original fue diluido a una concentración del 2 ng/µL y alicuotado en platos de 96 pocillos. Unos pocos pocillos dentro de cada plate fueron alicuotados con agua pura para que sirvieran como controles. Otra estrategia empleada para un mayor control fue que algunas muestras fueron replicadas con otro número de indentificación en diferentes pocillos. Todos los platos de 96 pocillos con el ADN fueron almacenados a -18 °C.

### **5.2. Genotipaje de los polimorfismos en los genes *ABCG5/G8***

#### **5.2.1. Genotipaje del SNP Y54C en el gen *ABCG8***

El polimorfismo Y54C del gen del transportador *ABCG8* se encuentra en el exon 2 de dicho gen, dentro del cromosoma 2.

La determinación de la variante genética Y54C en el gen del transportador *ABCG8*, se realizó mediante análisis de los fragmentos de restricción del ADN



amplificado por PCR. El cambio de nucleótido del polimorfismo es una **A** por una **G** (ambas bases son purinas) y a este tipo de mutaciones se les llama transición.

Para el genotipaje se empleó un equipo Stratagene MX3005, la mezcla para el ensayo que incluye la sonda Taqman® (20X) y los primers de la casa comercial Applied Biosystems (SNP Genotyping Assays, Foster City, CA, USA) y el kit para amplificación: MBL-HOT Start (5U/μL). Las sondas usadas para la detección de esta mutación-transición fueron las siguientes:

1. ACCCTGGAGGTCAGAGACCTCAACT**[A]**CCAGGTAGAGGCACGCC  
TGGGTTC A
2. ACCCTGGAGGTCAGAGACCTCAACT**[G]**CCAGGTAGAGGCACGCC  
TGGGTTC A

El nucleótido marcado en rojo es el que puede variar. El cambio de aminoácido es una tirosina (tyr) cuyo símbolo es **Y** por una cisteína (cys) cuyo símbolo es **C** en la posición **54** a partir del aminoácido de inicio que es la metionina (met). El cambio ocurrido en esta mutación sería: **TAC** que corresponde al aminoácido tyr por **TGC** que corresponde al aminoácido cys.

El ADN genómico se amplificó en un equipo de PCR a tiempo real utilizando las sondas Taqman® que llevan incorporadas dos fluoróforos (HEX comprobado y FAM) uno para cada alelo del gen (el mutado y el normal). De esta forma se identificaron los sujetos homocigotos para el alelo más común (marcados con un fluoróforo), homocigotos para el alelo menos común (donde se encuentra la mutación, sería el sitio polimórfico (marcados con el otro fluoróforo)) y heterocigotos (que llevan el alelo normal y el mutado (marcados con los dos fluoróforos)). El ensayo se optimizó para 5μL de volumen final (Vf) de reacción en cada pocillo de la placa. La mezcla utilizada en la PCR está representada en la **tabla 3**.

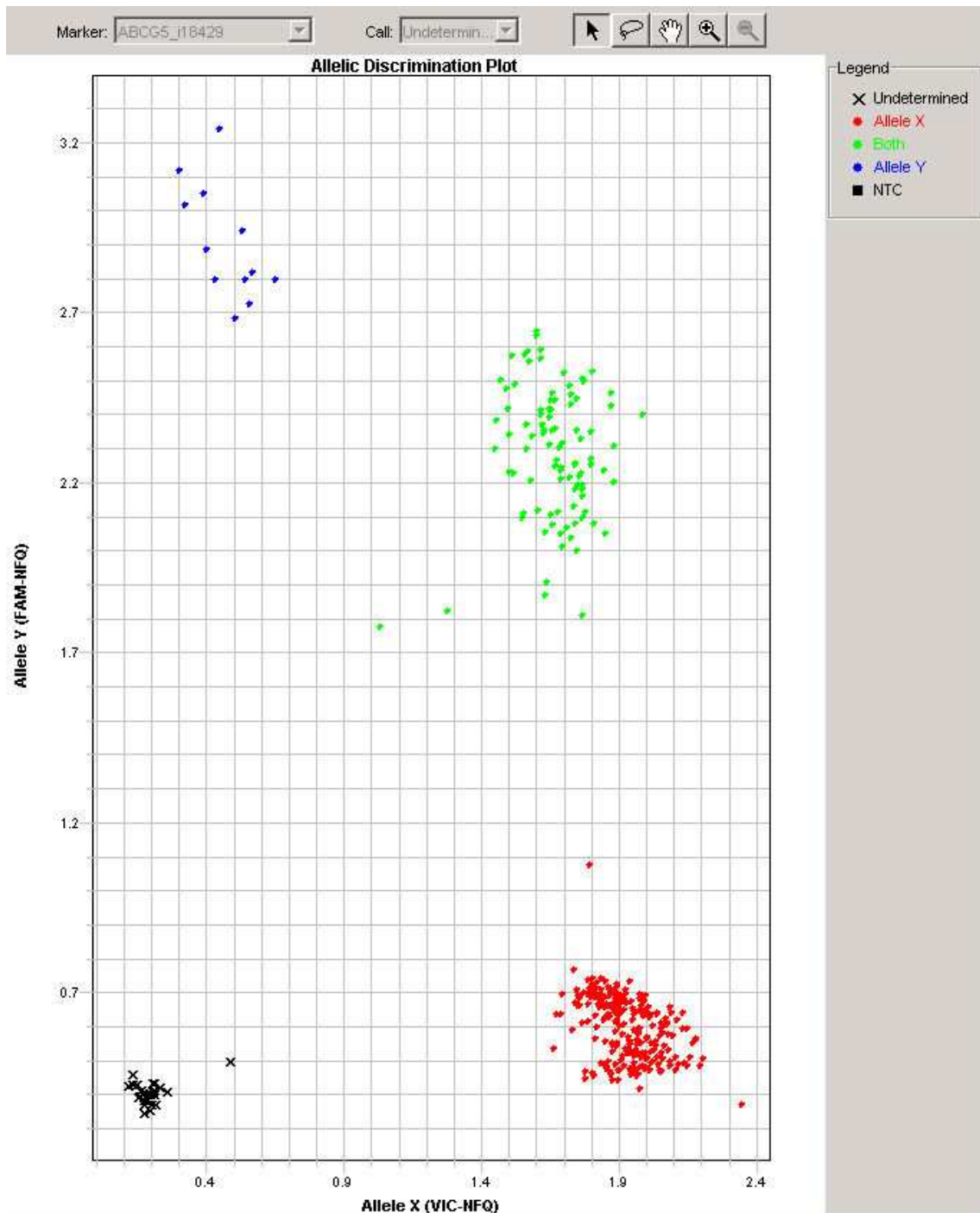
**Tabla 3.** Mezcla utilizada en la PCR

<b>Cloruro de Magnesio 25mM</b>	0.6µL/pocillo	3mM en el Vf
<b>Buffer de reacción 10X</b>	0.5µL/pocillo	1X en el Vf
<b>dNTPs 10mM total</b>	0.4µL/pocillo	800µM total en el Vf
<b>Polimerasa HOT-Start 5U/µL</b>	0.1µL/pocillo	0.5 Unidades por pocillo
<b>ADN genómico</b>	-----	150 ng por pocillo
<b>Mezcla sonda y primers 20X</b>	0.25µL/pocillo	1X en el Vf
<b>Agua</b>	3.15µL/pocillo	para llegar a 5µL de Vf

Las sondas Taqman® estuvieron guardadas en el congelador, protegidas de la luz, hasta que fueron utilizadas. El sistema *TECAN robotic* fue utilizado para distribuir la mezcla en cada uno de los pocillos de los platos de 384 pocillos. El sistema *RapidPlate robotic* se utilizó para añadir las muestras de ADN desde los platos de 96 pocillos a los nuevos platos de 384. El sistema *GeneAmp®PCR 9700 thermal cycler* fue usado para la amplificación. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

1. 5 minutos a 95 °C para la desnaturalización del ADN
2. 30 segundos a 95 °C para la desnaturalización del ADN
3. 1 minuto a 60°C para la unión de los primers al ADN
4. 30 segundos a 72 °C para la extensión de la polimerasa
5. Los pasos 2, 3 y 4 se repiten 40 veces
6. el equipo conserva la placa a 25 °C

En la **figura 9** se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos mediante la validación por la técnica Taqman del polimorfismo Y54C. En la figura, los puntos rojos representan a los individuos homocigotos para el alelo de menor frecuencia; los verdes a los individuos heterocigotos; y los azules a los homocigotos para el alelo de mayor frecuencia.



**Figura 9** Ejemplo del resultado del análisis por Taqman del polimorfismo Y54C

### 5.2.2. Genotipaje de otros SNPs en los genes *ABCG5/G8*

Con el fin de completar el estudio y conocimiento de las funciones de los transportadores *ABCG5/G8*, otros 8 SNPs fueron estudiados en dichos genes, dentro de la misma población de HFh.

Entre estos polimorfismos fueron seleccionados 4 en el gen *ABCG5* (i7892A>G, rs4131229; i18429C>T, rs4148189; i11836G>A, rs4289236; Q604EC>G, rs6720173) y otros 4 SNPs en el gen *ABCG8* (5U145T>G, rs3806471; i14222T>C, rs6709904; T400KG>T, rs4148217; D19HG>C, rs11887534).

Estos SNPs fueron seleccionados mediante análisis bioinformáticos sobre la base previa de trabajos publicados en los que se conocía el rol biológico de estos SNPs y su posible relación con lípidos plasmáticos o con factores de riesgo cardiovascular (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/buildhistory.cgi>). Dado que el SNP rs3806471 fue mapeado en el extremo 5'-UTR de *ABCG8* pero también se encontraba, alrededor de 216 pb del comienzo de *ABCG5* este SNP fue analizado por MAPPER<sup>277</sup>, el cual identificó un alelo específico con el factor de transcripción FXR (NR1H4).

El procedimiento empleado en el genotipaje fue el mismo descrito para el SNP Y54C (apartado 5.2.1.). En la **tabla 4** quedan recogidos los nombres e identificaciones de los nuevos SNPs seleccionados, así como las identificaciones de los *assays* y sondas utilizadas.

**Tabla 4.** Descripción de los nuevos SNPs en los genes ABCG5/G8 y sondas utilizadas

Nombre común	ID dbSNP	Posición	Sondas e ID assay
ABCG5_i11836G>A	rs4289236	intron 5	C__26135659_10
ABCG5_i18429G>A	rs4148189	intron 10	C__30437456_10
ABCG5_i7892T>C	rs4131229	intron 4	C__27530462_10
ABCG5_Gln604GluC>G	rs6720173	exon 13	VIC: CCTTCACTCAAGGAATT FAM: CTTCACTGAAGGAATT
ABCG8_5U145A>C	rs3806471	exon 1	C_26135644_10
ABCG8_Asp19HisG>C	rs11887534	exon 1	C_26135643_10
ABCG8_i14222A>G	rs6709904	intron 6	VIC: TTGTTTCCTACTGAGTCTG FAM: TTCCTACCGAGTCTG
ABCG8_Thr400LysC>A	rs4148217	exon 8	VIC: ATCAGCGTCTTAAACTG FAM: AGCGTCGTAAACTG

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron codificados, introducidos y analizados en el programa SPSS® versión 15.0 para Windows. Aquellos datos que no seguían una distribución normal fueron transformados logarítmicamente. En todas las pruebas estadísticas se consideraron como significativos los valores de *P* inferiores a 0,05. Se utilizaron los siguientes parámetros estadísticos:

- Para contrastar la normalidad de la distribución de las variables se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov
- Para el análisis descriptivo se empleó: para variables cualitativas: frecuencias y porcentajes; para variables cuantitativas: media aritmética  $\pm$  desviación típica y media aritmética  $\pm$  error estándar
- Para contrastar muestras independientes se aplicó la prueba “t” de student y el test de ANOVA según el análisis incluya a dos o más variables, respectivamente. Cuando no se cumplían los criterios de normalidad se utilizó la prueba “U” de

Mann-Whitney (comparación de 2 grupos independientes) o la prueba de Kruskal-Wallis (comparación de más de 2 grupos independientes)

- Para contrastar los resultados ajustándolos por variables de confusión se empleó el modelo Univariante ajustado por las distintas covariables que pudieran influir en la variable de estudio
- Para determinar si los genotipos se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg se empleó el test Chi-cuadrado
- Para la comparación de proporciones dentro de grupos independientes se empleó el test Chi-cuadrado a través de tablas de contingencia, en función del número de grupos:
  - + Dos grupos: se emplearon tablas 2x2 (comparar dos grupos en los que la variable medida es cualitativa con 2 categorías)
  - + Más de 2 grupos o pruebas de Independencia: se emplearon tablas 2xK (comparar más de 2 grupos en los que la variable medida era cualitativa con dos categorías) y tablas HxK (cuando teníamos dos variables cualitativas con más de dos categorías medidas en los mismos individuos).

Los resultados de la expresión de triglicéridos, lipoproteína A y lipoperóxidos fueron sometidos a una transformación logarítmica con el fin de normalizarlos.

## **7. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Para la revisión bibliográfica se usó el sistema MEDLARS (Medical Literature Analysis and Retrieval System) a través de su servicio de información informatizado PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), utilizándose varias entradas o encabezamientos MeSH (Medical Subjects Headings) del Index Medicus. Se empleó a su vez un proveedor de información electrónica *Ovid Technologies* al que se accede a través del Ovid Web Gateway (<http://gateway.ovid.com>).

## VI. RESULTADOS

### 1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES

Como previamente se ha descrito, el estudio comprendió finalmente un total de 586 pacientes (296 hombres y 290 mujeres). En este grupo se encontraban 199 casos índice y 387 familiares relacionados (34% y 66% respectivamente), todos con un diagnóstico genético de certeza de HFh. Entre esta población había registrados 78 casos de enfermedad cardiovascular (56 hombres y 22 mujeres), 13 casos de diabetes mellitus (DM) (6 hombres y 7 mujeres) y 72 casos de HTA (22 hombres y 50 mujeres). Las características basales de los participantes se encuentran recogidas en la **tabla 5**.

Los hombres, eran menores que las mujeres (41 vs 45 años). Como era de esperar, presentaban mayor IMC y perímetro de cintura que las mujeres. Sin embargo, estas presentaban mayores concentraciones de CT, c-HDL, ApoA-I, c-LDL y menores niveles de TG y c-VLDL que los hombres. También en las mujeres había mayor número de casos de HTA aunque menos casos de ECV, **tabla 5**.

Casi el 80% de la población estaba recibiendo tratamiento hipolipemiante en el momento de su inclusión en la cohorte (444 casos de 553; en 33 casos los datos estaban recogidos como valores perdidos). Dentro de la farmacoterapia, las estatinas fueron los agentes hipolipemiantes más utilizados con un 82% bien en monoterapia o como tratamiento combinado con otros fármacos hipolipemiantes.

**Tabla 5.** Características basales de los participantes

	<b>GLOBAL</b>	<b>HOMBRES</b>	<b>MUJERES</b>	<b>P</b>
<b>n</b>	<b>586</b>	<b>296</b>	<b>290</b>	
<b>Edad (años)</b>	43,2 ± 16,3	41,4 ± 16,2	45,1 ± 16,2	<b>0,005</b>
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	26,1 ± 4,6	26,5 ± 4,0	25,6 ± 5,1	<b>0,030</b>
<b>P. cintura (cm)</b>	85,1 ± 14,6	90,1 ± 12,9	79,9 ± 14,4	<b>0,000</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	269 ± 70,1	259,5 ± 68,3	278,6 ± 70,8	<b>0,001</b>
<b>TG (mg/dL)</b>	4,5 ± 0,4	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,4	<b>0,000</b>
<b>c-HDL (mg/dL)</b>	46,9 ± 13,5	41,8 ± 11,6	52,0 ± 13,4	<b>0,000</b>
<b>c-LDL (mg/dL)</b>	200,6 ± 67,6	194,1 ± 65,2	207,2 ± 69,4	<b>0,019</b>
<b>c-VLDL (mg/dL)</b>	20,3 ± 9,6	21,6 ± 10,5	19,0 ± 8,5	<b>0,001</b>
<b>ApoA-I (mg/dL)</b>	148,9 ± 27,8	139,7 ± 25,2	158,3 ± 27,1	<b>0,000</b>
<b>ApoB (mg/dL)</b>	130,8 ± 39,5	129,8 ± 40,8	131,7 ± 38,3	0,553
<b>Lp (a) (mg/dL)</b>	3,09 ± 0,93	3,09 ± 0,92	3,09 ± 0,94	0,942
<b>LPO (nmol/mL)</b>	1,79 ± 0,7	1,81 ± 0,7	1,76 ± 0,8	0,451
<b>LDL-ox (mU/L)</b>	11,6 ± 0,5	11,6 ± 0,5	11,7 ± 0,5	0,124
<b>PAS (mmHg)</b>	124,6 ± 18,4	125,6 ± 16,5	123,6 ± 20,1	0,192
<b>PAD (mmHg)</b>	73,4 ± 10,3	72,9 ± 10,1	73,8 ± 10,6	0,297
<b>PAM (mmHg)</b>	91,0 ± 11,6	90,9 ± 10,6	91,0 ± 12,5	0,936
<b>ECV n (%)</b>	78 (13,3)	56 (18,9)	22 (7,6)	<b>0,000</b>
<b>Diabetes n (%)</b>	13 (2,2)	6 (2,0)	7 (2,4)	0,485
<b>HTA N (%)</b>	72 (12,3)	22 (7,4)	50 (17,4)	<b>0,000</b>
<b>Fumador n (%)</b>	152 (25,9)	82 (27,7)	70 (24,1)	0,187
<b>Fármacos n (%)</b>	444 (79,9)	227 (80,8)	217 (78,9)	0,359

*IMC: índice de masa corporal. P. cintura: perímetro cintura. TG: triglicéridos. c-HDL: colesterol vehiculado por la lipoproteína de alta densidad. c-LDL: colesterol vehiculado por la lipoproteína de baja densidad. c-VLDL: colesterol vehiculado por la lipoproteína de muy baja densidad. ApoA-I: apolipoproteína A-I. ApoB: apolipoproteína B. Lp (a): logaritmo de lipoproteína A. LPO: lipoperóxidos. LDL-ox: lipoproteína de baja densidad oxidada. PAS: presión arterial sistólica. PAD: presión arterial diastólica. PAM: presión arterial media = (Sistólica-Diastólica)/3 + Diastólica. P: significación estadística de la prueba t student para 2 muestras independientes (hombres y mujeres). ECV: enfermedad cardiovascular. HTA: hipertensión. Fármacos: tratamiento hipolipemiante. Los valores están expresados en media ± desviación estándar (DE).*



## 2. DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS EN LOS GENES *AGCG5/G8*

Cuando se estudia la distribución y frecuencia de un polimorfismo dentro de una población, es importante conocer dicha frecuencia y distribución en otras poblaciones en los que este polimorfismo haya sido estudiado debido a que pueden cambiar dependiendo del origen étnico de dichas poblaciones.

### 2.1. Distribución y frecuencia del SNP Y54C en el gen *ABCG8*

Dentro de la población de HFh estudiada se determinó la frecuencia alélica y distribución de los genotipos (GG, AG, AA) para el polimorfismo Y54C (rs4148211) en el gen *ABCG8*, **tabla 6**. Los resultados muestran que en la población de estudio, tanto la distribución de los genotipos como la frecuencia del alelo de menor frecuencia G, fue muy similar a la de otros estudios realizados en otras poblaciones europeas. Sin embargo, podemos comprobar como la frecuencia de este polimorfismo se invierte completamente en las poblaciones asiáticas respecto a nuestra población y a la europea. En dicha población, el alelo de menor frecuencia es el alelo A, **tabla 7**.

**Tabla 6.** *Distribución del polimorfismo Y54C del gen del ABCG8 en la población de HFh*

Y54C	GG	AG	AA
%	11,4 %	42,0 %	46,6 %
<i>n</i>	<b>67</b>	<b>246</b>	<b>273</b>

*GG: homocigoto para el alelo G. AG: heterocigoto. AA: homocigoto para el alelo A.*

**Tabla 7.** Frecuencia alélica del polimorfismo Y54C en nuestra población de HFh y su frecuencia en otras poblaciones estudiadas

<b>POBLACIONES</b>	<b>alelo A</b>	<b>alelo G</b>
<b>Cohorte española HFh</b>	<b>0,676</b>	<b>0,324</b>
<b>Europea</b>	0,625	0,375
<b>Asia (China-Beijing)</b>	0,144	0,856
<b>Asia (Japón-Tokio)</b>	0,239	0,761
<b>África Subsahariana</b>	0,892	0,108
<b>América (raza negra)</b>	0,656	0,344

Los genotipos observados fueron comparados con los genotipos esperados siguiendo el principio de Hardy-Weinberg, en función de la frecuencia de cada alelo. Los valores  $X^2$  fueron calculados comparando las frecuencias del genotipo observado y del esperado usando la fórmula  $\frac{(\text{valor observado} - \text{valor esperado})^2}{\text{valor esperado}}$ . El valor de P fue obtenido desde el valor de  $X^2$ . En la **tabla 8** se describe el proceso realizado para confirmar el equilibrio de Hardy-Weinberg en la distribución alélica de nuestra población.

**Tabla 8.** Equilibrio Hardy-Weinberg.

<b>GENOTIPOS</b>	<b>HW-Observada</b>	<b>HW-Esperada</b>	<b>H-W (P)</b>
<b>Homocigoto Ref.</b>	67	61,6	
<b>Heterocigoto</b>	246	256,8	
<b>Homocigoto Var.</b>	273	267,6	
<b><math>X^2</math> valor P</b>			<b>0,308</b>

*HW-Esperada: Hardy-Weinberg esperada. HW-Observada: Hardy-Weinberg observada.  $X^2$ : Ji-cuadrado. Valor P: significación estadística ( $P < 0,05$ ). Homocigoto Ref.: homocigoto de referencia. Homocigoto Var.: homocigoto variante.*

## 2.2. Frecuencia de otros polimorfismos estudiados en los genes *ABCG5/G8*

Se determinó la frecuencia de otros SNPs estudiados en la misma población de HFh. Los genotipos observados fueron comparados con los genotipos esperados siguiendo el principio de Hardy-Weinberg (H-W), en función de la frecuencia de cada alelo, demostrándose que todos los SNPs se encontraban en equilibrio H-W. En la **tabla 9** se encuentran representados todos los SNPs estudiados con su frecuencia y valor de la *P* para la ecuación de H-W. En dicha tabla se puede observar que la frecuencia del alelo minoritario, fue muy similar a la de otros estudios realizados en otras poblaciones europeas.

**Tabla 9.** Frecuencia alélica y distribución de otros polimorfismos estudiados en nuestra población de HFh.

NOMBRE	SNP	ALELOS	FRECUENCIA (HFh)	FRECUENCIA (Europa)	H-W (P)
<b>ABCG5_i7892</b>	rs4131229	G/A	G (0,37)	G (0,37)	0,162
<b>ABCG5_i18429</b>	rs4148189	C/T	T (0,10)	T (0,09)	0,339
<b>ABCG5_i11836</b>	rs4289236	G/A	A (0,19)	A (0,19)	0,657
<b>ABCG5_Q604E</b>	rs6720173	G/C	G (0,18)	G (0,17)	0,214
<b>ABCG8_5U145</b>	rs3806471	G/T	G (0,30)	G (0,29)	0,160
<b>ABCG8_i14222</b>	rs6709904	C/T	C (0,10)	C (0,13)	0,920
<b>ABCG8_T400K</b>	rs4148217	G/T	T (0,24)	T (0,25)	0,820
<b>ABCG8_D19H</b>	rs11887534	G/C	C (0,05)	C (0,08)	0,749

*H-W: Hardy-Weinberg SNP: polimorfismo. P: significación estadística para la ecuación de equilibrio H-W (P<0,05).*

### 3. DISTRIBUCIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA E EN LA POBLACIÓN A ESTUDIO

Previamente al análisis estadístico, se analizó y estudió el genotipo de la apolipoproteína E (ApoE) en la población para descartar que tuviese alguna influencia sobre los valores de lípidos plasmáticos. Se constituyeron tres grupos, de acuerdo a su genotipo:

- Grupo ApoE 2 formado por los individuos portadores de los genotipos  $\epsilon 2/\epsilon 2 + \epsilon 2/\epsilon 3$  (al menos un alelo  $\epsilon 2$ )

- Grupo ApoE 3 integrado por el genotipo  $\epsilon 3/\epsilon 3$  (ambos alelos normales)

- Grupo ApoE 4 formado por los individuos portadores de los genotipos  $\epsilon 3/\epsilon 4 + \epsilon 4/\epsilon 4$  (al menos un alelo  $\epsilon 4$ )

- No se encontraron sujetos con el genotipo  $\epsilon 2/\epsilon 4$  por lo que no fue necesario la realización de un nuevo grupo.

Se realizó un test de Chi-cuadrado para verificar si las frecuencias de los genotipos observadas guardaban concordancia con las esperadas por la hipótesis de Hardy-Weinberg, comprobando que todas las frecuencias se encontraban en equilibrio, **tabla 10**. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas tras el análisis estadístico, en cuanto a la distribución de la ApoE entre los 3 grupos del gen del transportador *ABCG8*. De esta manera, la distribución de genotipos del polimorfismo Y54C se realizó por igual en cada uno de los subgrupos para la ApoE (grupos 2, 3 y 4), **figura 10**. En las **tablas 11 y 12** se recogen los datos de la distribución del SNP.

**Tabla 10. Equilibrio Hardy-Weinberg**

GRUPOS	n	X <sup>2</sup>
Grupo ApoE 2	41	0,175575
Grupo ApoE 3	409	0,196151
Grupo ApoE 4	101	0,397659

Los grupos están formados por: grupo 2  $\epsilon_2/\epsilon_2 + \epsilon_2/\epsilon_3$ , grupo 3  $\epsilon_3/\epsilon_3$  y grupo 4  $\epsilon_3/\epsilon_4 + \epsilon_4/\epsilon_4$ .  
X<sup>2</sup>: valor de Chi-cuadrado.

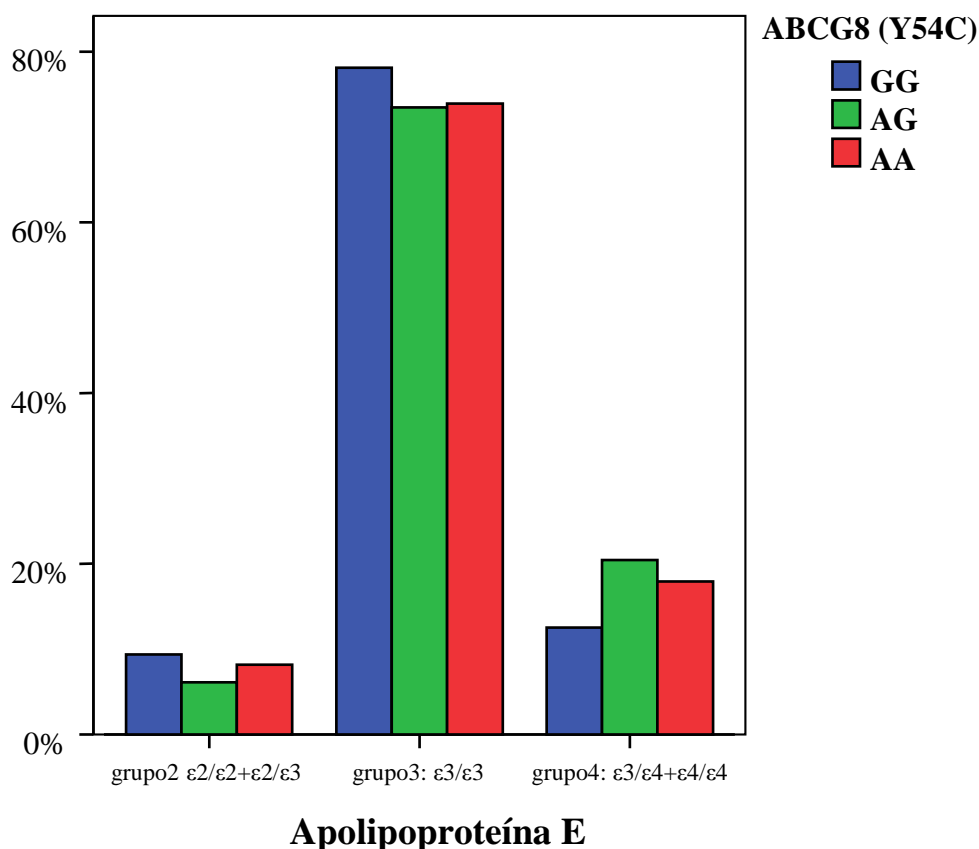
**Tabla 11. Número de individuos genotipados para ApoE del total de sujetos de la población**

	CASOS					
	Válido		Pérdidas		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>apoE grupos * ABCG8</i>	551	94 %	35	6 %	586	100 %

**Tabla 12. Frecuencia de los grupos ApoE respecto a los genotipos de ABCG8 (Y54C)**

		Genotipo ABCG8 (Y54C)			Total	
		GG	AG	AA		
ApoE	Grupo 2	<i>n</i>	6	14	21	41
		<i>% (Y54C)</i>	9,4 %	6,1 %	8,2 %	7.4 %
	Grupo 3	<i>n</i>	50	169	190	409
		<i>% (Y54C)</i>	78,1 %	73,5 %	73,9 %	74.2 %
	Grupo 4	<i>n</i>	8	47	46	101
		<i>% (Y54C)</i>	12,5 %	20,4 %	17,9 %	18.3 %
<b>Total</b>		<i>n</i>	64	230	257	551
		<i>% (Y54C)</i>	100 %	100 %	100 %	100 %

Los grupos están formados por: grupo 2  $\epsilon_2/\epsilon_2 + \epsilon_2/\epsilon_3$ , grupo 3  $\epsilon_3/\epsilon_3$  y grupo 4  $\epsilon_3/\epsilon_4 + \epsilon_4/\epsilon_4$ .



**Figura 10.** Representación de la distribución del SNP en los 3 grupos de ApoE. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas dentro de los grupos ( $P > 0,05$ )

#### 4. EFECTO DEL POLIMORFISMO Y54C EN EL GEN ABCG8 SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS

El objetivo principal del estudio era analizar si la presencia del polimorfismo Y54C en el gen del transportador ABCG8 y otros SNPs seleccionados en los genes ABCG5/G8 (i7892A>G, i18429C>T, Gln604GluC>G, i11836G>A / 5U145T>G, Asp19HisG>C, i14222T>C, Thr400LysG>T), modulan las concentraciones de c-HDL y otros lípidos plasmáticos.

Por otro lado, no sólo se estudiaron asociaciones sino que se trataba de estudiar las posibles interacciones entre este SNP y diferentes variables de riesgo como sexo, tabaco, obesidad, presencia de arco corneal y/o xantomas. De esta manera, se analizaron en un primer momento las asociaciones entre este SNP y las concentraciones de lípidos plasmáticos y posteriormente se estudió si esas asociaciones estaban influenciadas por posibles variables de riesgo en pacientes con HFh.

#### **4.1. Asociación entre el polimorfismo Y54C y las concentraciones de lípidos plasmáticos**

Para estudiar el efecto de este SNP sobre los valores de lípidos plasmáticos y estrés oxidativo se hizo un análisis del polimorfismo Y54C en función de sus tres genotipos GG, AG, AA (los datos están representados en el apartado 4.1.1.). Posteriormente, se agruparon los sujetos en 2 grupos, según la tendencia encontrada en el análisis anterior (modelo dominante o recesivo), con el fin de estudiar las verdaderas diferencias entre alelos (alelo A y alelo G) respecto al efecto que ejercen sobre los lípidos plasmáticos (los datos están representados en el apartado 4.1.2.).

##### **4.1.1. Análisis por genotipos del polimorfismo Y54C en el gen ABCG8**

En un primer momento, se empleó un análisis estadístico general, sin ajustar por posibles factores de confusión, para toda la población que permitió observar el comportamiento de las distintas isoformas del polimorfismo Y54C (GG, AG, AA) sobre las distintas concentraciones de lípidos plasmáticos (los datos están representados en el apartado a). Posteriormente debido a las diferencias en las características basales encontradas entre sexos (**tabla 5**) y a la posible existencia de variables de confusión, se procedió a un análisis estadístico ajustado con el fin de homogeneizar los resultados obtenidos anteriormente para la población general. Las covariables empleadas para el

ajuste final fueron: sexo, edad, IMC, ejercicio físico, relación familiar, presencia de ECV, diabetes, HTA, tratamiento hipolipemiante y tabaco (los datos están representados en el apartado b).

#### a) Análisis inicial general

Los sujetos fueron agrupados en 3 grupos en función del genotipo presentado: homocigotos para el alelo G (GG), heterocigotos (AG) y homocigotos para el alelo A (AA). Se realizó un primer análisis por genotipos de los 3 grupos del SNP en el que se observó que existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos respecto a los parámetros de c-HDL ( $P=0,034$ ) y ApoA-I ( $P=0,039$ ), **tabla 13**.

**Tabla 13.** Asociación entre Y54C en el gen de ABCG8 y concentraciones de lípidos plasmáticos. Comparación de más de 2 grupos: Análisis de Varianza Simple

	<b>GG</b> (n=67)	<b>AG</b> (n=246)	<b>AA</b> (n=273)	<b>P</b>	<b>P*</b>
<b>Edad (años)</b>	42,2 ± 17,2	43,4 ± 15,8	44,2 ± 16,9	0,705	-----
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	25,2 ± 4,2	27,3 ± 11,5	26,6 ± 7,9	0,315	-----
<b>CT (mg/dL)</b>	278,4 ± 83,6	270,2 ± 72,9	268,5 ± 62,1	0,622	0,800
<b>TG (mg/dL)</b>	<b>4,41 ± 0,4</b>	4,56 ± 0,4	4,55 ± 0,4	<b>0,059</b>	<b>0,080</b>
<b>c-LDL (mg/dL)</b>	208,8 ± 80	203,1 ± 71,1	198,5 ± 59,9	0,531	0,624
<b>c-HDL (mg/dL)</b>	<b>50,7 ± 12,9</b>	45,7 ± 13,2	47,9 ± 14,3	<b>0,034</b>	<b>0,014</b>
<b>c-VLDL (mg/dL)</b>	18,4 ± 9,5	21 ± 10,2	20,3 ± 9,2	0,201	0,278
<b>ApoA-I (mg/dL)</b>	<b>156,3 ± 29,4</b>	145,9 ± 28,1	149,8 ± 28,9	<b>0,039</b>	<b>0,016</b>
<b>ApoB (mg/dL)</b>	131,2 ± 39,9	132,4 ± 43,1	129,7 ± 34,7	0,766	0,818
<b>Lp (a) (mg/dL)</b>	3,20 ± 1,0	3,01 ± 0,9	3,14 ± 0,9	0,165	0,173
<b>LPO (nmol/mL)</b>	1,9 ± 0,6	1,8 ± 0,6	1,7 ± 0,8	0,092	0,269
<b>LDL-ox (mU/L)</b>	11,6 ± 0,6	11,7 ± 0,5	11,6 ± 0,5	0,279	0,411
<b>Tratamiento (%)</b>	73,8	78,6	82,4	0,421	-----



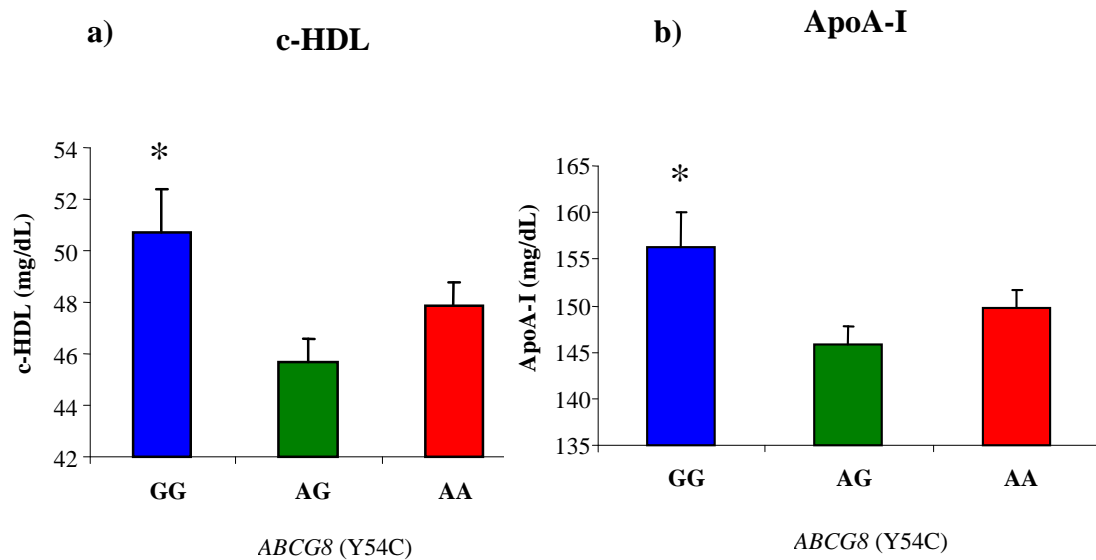
Valores expresados en media  $\pm$  DE. IMC: índice de masa corporal. CT: colesterol total. TG: triglicéridos. c-LDL: colesterol vehiculizado por la lipoproteína de baja densidad. c-HDL: colesterol vehiculizado por la lipoproteína de alta densidad. c-VLDL: colesterol vehiculizado por la lipoproteína de muy baja densidad. ApoA-I: apolipoproteína A-I. ApoB: apolipoproteína B. Lp (a): lipoproteína A. LPO: lipoperóxidos. LDL-ox: lipoproteína de baja densidad oxidada. P: significación estadística ( $P < 0,05$ ). P\*: P ajustada por variables de confusión

Para elegir la prueba *post hoc* (Tukey, Hochberg's GT2 o Games Howell) adecuada para determinar las diferencias entre los grupos, se hizo primero el test de la homogeneidad de las varianzas de Levene del que se obtuvo que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las varianzas de los grupos para los parámetros c-HDL y ApoA-I. Una vez que asumimos que las varianzas eran iguales y los tamaños de muestra eran distintos se eligió la prueba Hochberg's GT2 para el valor de P en el *post hoc*.

Tras este análisis *post hoc* se observaron los siguientes resultados:

- c-HDL ( $P=0,034$ ): los pacientes homocigotos para el genotipo C54 (GG) presentaron concentraciones significativamente superiores de c-HDL ( $P=0,042$ ) que los pacientes portadores del genotipo Y54C (AG) (**Figura 11a**)
- ApoA-I ( $P=0,039$ ): los pacientes homocigotos para el genotipo C54 (GG) presentaron concentraciones significativamente superiores de ApoA-I ( $P=0,042$ ) que los pacientes portadores del genotipo Y54C (AG) (**Figura 11b**)
- TG ( $P=0,059$ ): se mantuvo la tendencia observada según la cual los sujetos homocigotos GG presentaban unas concentraciones de triglicéridos inferiores respecto a las otras 2 isoformas del polimorfismo (AG y AA), aunque no se llegaron a encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $P=0,062$  y  $P=0,083$  respectivamente)

- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de parámetros lipídicos analizados ni en las variables que representan estrés oxidativo para este SNP.



**Figura 11.** Representación de la asociación entre Y54C en el gen de ABCG8 y concentraciones plasmáticas de c-HDL (11a) y ApoA-I (11b). ANOVA de un factor: comparaciones múltiples post hoc. Test de Hochberg: GG vs AG, \* $P < 0,05$ .

## b) Análisis estadístico ajustado por variables de confusión

Tras los resultados encontrados para la población general se procedió a un análisis estadístico ajustado con el fin de homogeneizar los resultados obtenidos y corroborar las diferencias estadísticamente significativas encontradas anteriormente. Las covariables empleadas fueron: sexo, edad, IMC, ejercicio físico, relación familiar, presencia de ECV, diabetes, HTA, tratamiento hipolipemiante y tabaco.

Tras el ajuste pudimos observar que se mantenían las diferencias estadísticamente significativas entre grupos para las concentraciones de c-HDL ( $P=0,014$ ) y ApoA-I ( $P=0,016$ ) encontradas en el análisis anterior de la población general y persistía la tendencia observada anteriormente para los TG ( $P=0,080$ ), según la cual, los individuos homocigotos para el alelo de menor frecuencia G presentaban mayores concentraciones de c-HDL, ApoA-I y menores concentraciones de TG, **tabla 13**.

#### **4.1.2. Análisis por grupos de alelos del SNP Y54C en el gen ABCG8**

Con el fin de estudiar las diferencias entre alelos (alelo A y alelo G), respecto al efecto que ejercen sobre los lípidos plasmáticos, se agruparon los sujetos en 2 grupos según la tendencia encontrada en los análisis anteriores (modelo dominante o recesivo).

Al observarse un modelo recesivo en el que los sujetos homocigotos para el alelo de menor frecuencia ejercían el principal efecto, los sujetos quedaron agrupados como: homocigotos para el alelo de menor frecuencia (GG) y un segundo grupo en los que se incluyeron los sujetos portadores del alelo A (AG-AA). Siguiendo la tendencia marcada en los análisis estadísticos anteriores, se realizó un ajuste de los valores de lípidos plasmáticos por posibles variables que pudieran influir en sus concentraciones finales como sexo, edad, IMC, ejercicio físico, relación familiar, presencia de ECV, diabetes, HTA, tratamiento hipolipemiente y tabaco.

Se realizó un análisis estadístico de los 2 grupos, cuyo resultado queda expresado en la **tabla 14**. Tras este análisis se obtuvieron los siguientes resultados:

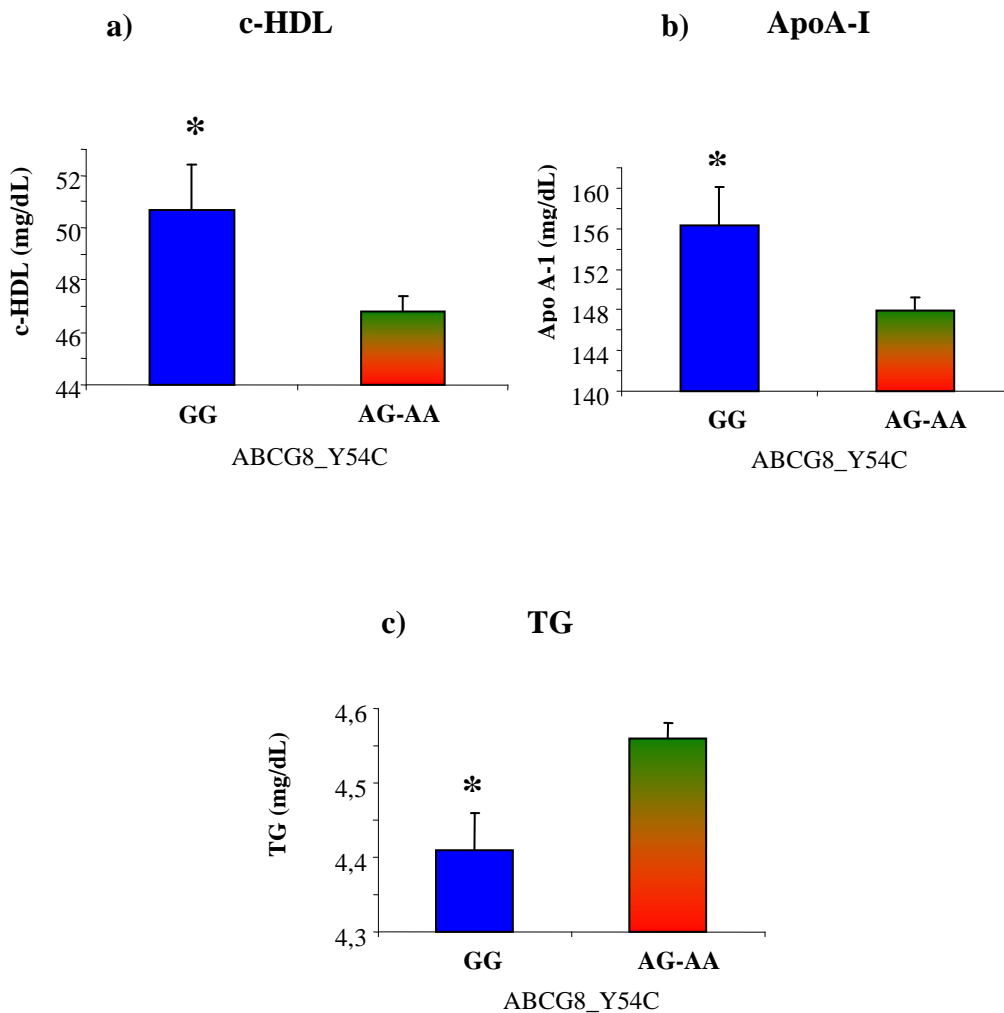
- c-HDL: los individuos portadores del alelo A (AG-AA) presentaron menores concentraciones de c-HDL ( $P=0,043$ ) comparados con los pacientes homocigotos para el alelo G (GG) (**Figura 12a**)

- ApoA-I: la presencia de al menos una variante Y54 (AG-AA) se asoció con menores concentraciones de ApoA-I ( $P=0,037$ ) comparados con los pacientes homocigotos para el alelo G (GG) (**Figura 12b**)
- TG: la presencia de al menos una variante Y54 (AG-A/A) se asoció fuertemente con mayores concentraciones de TG ( $P=0,018$ ) en comparación con los pacientes homocigotos para el alelo G (GG) (**Figura 12c**)
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de parámetros analizados.

**Tabla 14.** Asociación entre Y54C en el gen de ABCG8 y concentraciones de lípidos plasmáticos. Comparación de 2 grupos (GG vs AG-AA): prueba “t” de Student

	<b>GG</b>	<b>AG-AA</b>	<b>P</b>	<b>P*</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	278,4 ± 83,6	269,3 ± 67,4	0,347	0,796
<b>TG (mg/dL)</b>	<b>4,41 ± 0,4</b>	<b>4,56 ± 0,4</b>	<b>0,018</b>	<b>0,028</b>
<b>c-LDL (mg/dL)</b>	208,8 ± 80	200,7 ± 65,5	0,388	0,840
<b>c-HDL (mg/dL)</b>	<b>50,7 ± 12,9</b>	<b>46,8 ± 13,8</b>	<b>0,043</b>	<b>0,063</b>
<b>c-VLDL (mg/dL)</b>	18,4 ± 9,5	20,6 ± 9,7	0,104	0,146
<b>ApoA-I (mg/dL)</b>	<b>156,3 ± 29,4</b>	<b>147,9 ± 28,6</b>	<b>0,037</b>	<b>0,083</b>
<b>ApoB (mg/dL)</b>	131,2 ± 39,9	131 ± 38,9	0,966	0,661
<b>Lp (a) (mg/dL)</b>	3,20 ± 1,0	3,08 ± 0,9	0,315	0,078
<b>LPO (nmol/mL)</b>	1,9 ± 0,6	1,7 ± 0,7	0,213	0,562
<b>LDL-ox (mU/L)</b>	11,6 ± 0,6	11,6 ± 0,5	0,712	0,771

Valores expresados en media  $\pm$  DE. CT: colesterol total. TG: triglicéridos. c-LDL: colesterol vehiculado por la lipoproteína de baja densidad. c-HDL: colesterol vehiculado por la lipoproteína de alta densidad. c-VLDL: colesterol vehiculado por la lipoproteína de muy baja densidad. ApoA-I: apolipoproteína A-I. ApoB: apolipoproteína B. Lp (a): lipoproteína A. LPO: lipoperóxidos. LDL-ox: LDL oxidada.  
*P*: significación estadística ( $P < 0,05$ ). *P*\*: *P* ajustada por variables de confusión



**Figura 12.** Representación de la asociación entre Y54C en el ABCG8 y concentraciones plasmáticas de c-HDL (12a), ApoA-I (12b) y TG (12c). Prueba “t” para dos muestras independientes. \* $P < 0,05$ .

## **4.2. Interacciones del polimorfismo Y54C con variables de riesgo en pacientes con HFh**

Además de las asociaciones del SNP con parámetros lipídicos, se estudiaron las interacciones de este SNP con otras variables de riesgo en HF, como fueron: sexo, obesidad, tabaco y presencia de xantomas y/o arco corneal, que pudieran afectar al efecto encontrado de este SNP sobre los parámetros lipídicos. Por tanto, para ver la influencia que estas variables de riesgo ejercen sobre la presencia de este polimorfismo, los sujetos fueron agrupados en 2 categorías para cada uno de las variables. De esta manera, para el género, los sujetos fueron divididos en hombre mujer; para ver el efecto que el tabaco ejerce sobre este SNP los sujetos fueron divididos en fumadores y no fumadores; respecto a la obesidad, fueron agrupados según existiera o no presencia de la misma; finalmente, los sujetos fueron divididos también en 2 grupos para estudiar el efecto de la presencia o no de depósitos extravasculares de colesterol (xantomas y arco corneal).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el SNP estudiado y las distintas variables de riesgo. Por lo tanto, no se ha demostrado que exista ningún tipo de interacción, ni que la presencia de estas variables de riesgo modifique el efecto que este polimorfismo ejerce sobre las concentraciones de c-HDL y TG.

## **5. EFECTO DE OTROS SNPs EN LOS GENES *ABCG5/G8* SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS**

Siguiendo el mismo esquema desarrollado para el estudio del SNP Y54C en el gen *ABCG8* y a raíz de los resultados encontrados para dicho polimorfismo, se estudió la presencia que otros SNPs seleccionados en los genes *ABCG5/G8*, ejercen las concentraciones de c-HDL y otros lípidos plasmáticos. A su vez, se estudió las posibles interacciones entre estos SNPs y variables de riesgo en pacientes con HFh.

### **5.1. Asociación con las concentraciones de lípidos plasmáticos**

Con el fin de completar el estudio y conocimiento de las funciones de los transportadores *ABCG5/G8*, otros 8 SNPs fueron estudiados en dichos genes. Entre estos polimorfismos fueron seleccionados 4 en el gen *ABCG5* (i7892A>G, rs4131229; i18429C>T, rs4148189; i11836G>A, rs4289236; Q604EC>G, rs6720173) y otros 4 SNPs en el gen *ABCG8* (5U145T>G, rs3806471; i14222T>C, rs6709904; T400KG>T, rs4148217; D19HG>C, rs11887534).

Para estudiar el efecto de estos SNPs sobre los valores de lípidos plasmáticos se hizo un análisis de cada uno de ellos en función de sus 3 genotipos: homocigotos para el alelo de mayor frecuencia, heterocigotos y homocigotos para el alelo de menor frecuencia (los datos están representados en el apartado 5.1.1.). Posteriormente, se agruparon los sujetos en 2 grupos, según la tendencia encontrada en el análisis anterior (modelo dominante o recesivo), con el fin de estudiar las verdaderas diferencias entre alelos (los datos están representados en el apartado 5.1.2.).

Todos los análisis estadísticos presentados se encuentran ajustados por las siguientes covariables: sexo, edad, IMC, ejercicio físico, relación familiar, presencia de ECV, diabetes, HTA, tratamiento hipolipemiante y tabaco.

### **5.1.1. Análisis por genotipos**

Los sujetos fueron agrupados en 3 grupos en función del genotipo presentado: homocigotos para el alelo de mayor frecuencia, heterocigotos y homocigotos para el alelo de menor frecuencia. Este primer análisis estadístico se realizó para determinar el efecto que ejercen cada una de las isoformas de los SNPs estudiados con el fin de agrupar posteriormente por grupos de alelos y determinar que modelo, recesivo o dominante, siguen los mismos. En este primer análisis por genotipos se observó que existían diferencias entre los grupos de los siguientes SNPs, **tablas 15 y 16**:

- ABCG5\_i11836G>A: en este SNP se observó que existían diferencias entre los distintos grupos respecto a las concentraciones de c-HDL ( $P=0,050$ ), según la cual los pacientes homocigotos para el alelo de mayor frecuencia (GG) presentaban menores concentraciones respecto a los otros 2 grupos portadores de la mutación (AG y AA), **tabla 15**
- ABCG5\_Q604EC>G: en este SNP se observó que existía una tendencia en cuanto a las concentraciones de TG ( $P=0,105$ ) y c-VLDL ( $P=0,073$ ) según la cual los pacientes homocigotos para el alelo de mayor frecuencia C (CC) presentaron unas concentraciones mayores que los pacientes pertenecientes a cualquiera de los otros 2 grupos que incluían la mutación (CG y GG), **tabla 15**
- Los SNPs i14222T>C y D19HG>C localizados en el gen *ABCG8* no pudieron ser analizados en 3 grupos debido a la baja frecuencia entre la población de individuos homocigotos para la mutación (5 y 1 sujeto respectivamente), **tabla 16**.



**Tabla 15.** Asociación de 4 SNPs en el gen ABCG5 y las concentraciones de lípidos plasmáticos. Comparación de 3 grupos: análisis univariante ajustado

<b>G5_i7892</b>	<b>GG</b> (n=70)	<b>AG</b> (n=203)	<b>AA</b> (n=192)	<b>P</b>
<b>CT</b>	272,3 ± 8,2	272,9 ± 4,8	266,3 ± 4,9	0,616
<b>TG</b>	4,51 ± 0,04	4,54 ± 0,02	4,55 ± 0,02	0,723
<b>c-LDL</b>	204,2 ± 8,0	205,8 ± 4,7	197,9 ± 4,8	0,498
<b>c-HDL</b>	47,8 ± 1,4	46,2 ± 0,8	46,0 ± 0,8	0,561
<b>c-VLDL</b>	19,8 ± 1,0	20,3 ± 0,5	20,3 ± 0,6	0,919
<b>G5_i18429</b>	<b>CC</b> (n=344)	<b>CT</b> (n=111)	<b>TT</b> (n=10)	<b>P</b>
<b>CT</b>	267,7 ± 3,7	276,5 ± 6,5	280,5 ± 21,8	0,454
<b>TG</b>	4,55 ± 0,02	4,51 ± 0,03	4,41 ± 0,1	0,359
<b>c-LDL</b>	199,6 ± 3,6	210,0 ± 6,3	213,0 ± 21,3	0,324
<b>c-HDL</b>	46,8 ± 0,6	45,1 ± 1,1	43,5 ± 3,7	0,314
<b>c-VLDL</b>	20,5 ± 0,4	19,7 ± 0,8	16,6 ± 2,6	0,277
<b>G5_i11836</b>	<b>GG</b> (n=292)	<b>AG</b> (n=152)	<b>AA</b> (n=21)	<b>P</b>
<b>CT</b>	267,3 ± 4,0	277,0 ± 5,6	258,1 ± 15,1	0,279
<b>TG</b>	4,55 ± 0,02	4,53 ± 0,03	4,52 ± 0,08	0,805
<b>c-LDL</b>	200,3 ± 3,9	207,9 ± 5,4	189,7 ± 14,7	0,367
<b>c-HDL</b>	45,3 ± 0,6	48,2 ± 0,9	47,6 ± 2,6	<b>0,050</b>
<b>c-VLDL</b>	20,4 ± 0,4	19,9 ± 0,6	20,0 ± 1,8	0,820
<b>G5_Q604E</b>	<b>GG</b> (n=15)	<b>CG</b> (n=118)	<b>CC</b> (n=332)	<b>P</b>
<b>CT</b>	271,9 ± 17,8	267,6 ± 6,3	270,9 ± 3,7	0,900
<b>TG</b>	4,45 ± 0,1	4,48 ± 0,03	4,56 ± 0,02	<b>0,105</b>
<b>c-LDL</b>	208,8 ± 17,4	202,1 ± 6,2	202,1 ± 3,6	0,932
<b>c-HDL</b>	40,1 ± 3,0	45,9 ± 1,1	46,8 ± 0,6	0,196
<b>c-VLDL</b>	17,8 ± 2,1	19,0 ± 0,7	20,8 ± 0,4	<b>0,073</b>

Valores expresados en media ± error estándar. Valores de P ajustados por edad, IMC, actividad física, diabetes, HTA, ECV, tabaco, tratamiento hipolipemiante y relación familiar.

**Tabla 16.** Asociación de 4 SNPs en el gen ABCG8 y las concentraciones de lípidos plasmáticos. Comparación de 3 grupos: análisis univariante ajustado

<b>G8_5U145</b>	<b>GG</b> (n=47)	<b>GT</b> (n=178)	<b>TT</b> (n=240)	<b>P</b>
<b>CT</b>	270,0 ± 10,0	268,7 ± 5,1	271,1 ± 4,4	0,942
<b>TG</b>	4,44 ± 0,05	4,53 ± 0,02	4,57 ± 0,02	0,082
<b>c-LDL</b>	202,9 ± 9,8	202,2 ± 5,0	202,3 ± 4,3	0,998
<b>c-HDL</b>	48,2 ± 1,7	46,0 ± 0,8	46,3 ± 0,7	0,527
<b>c-VLDL</b>	18,7 ± 1,2	20,0 ± 0,6	20,6 ± 0,5	0,343

<b>G8_i14222</b>	<b>CC</b> (n=5)	<b>CT</b> (n=82)	<b>TT</b> (n=378)	<b>P</b>
------------------	--------------------	---------------------	----------------------	----------

<b>G8_T400K</b>	<b>GG</b> (n=268)	<b>TG</b> (n=168)	<b>TT</b> (n=29)	<b>P</b>
<b>CT</b>	270,1 ± 4,2	270,8 ± 5,3	265,3 ± 12,8	0,924
<b>TG</b>	4,52 ± 0,02	4,54 ± 0,03	4,66 ± 0,07	0,209
<b>c-LDL</b>	203,1 ± 4,1	202,7 ± 5,2	193,4 ± 12,5	0,762
<b>c-HDL</b>	46,7 ± 0,7	45,8 ± 0,9	46,6 ± 2,2	0,732
<b>c-VLDL</b>	20,1 ± 0,5	20,0 ± 0,6	22,7 ± 1,5	0,263

<b>G8_D19H</b>	<b>GG</b> (n=417)	<b>CG</b> (n=47)	<b>CC</b> (n=1)	<b>---</b>
----------------	----------------------	---------------------	--------------------	------------

Valores expresados en media ± error estándar. Valores de P ajustados por edad, IMC, actividad física, diabetes, HTA, ECV, tabaco, tratamiento hipolipemiante y relación familiar.

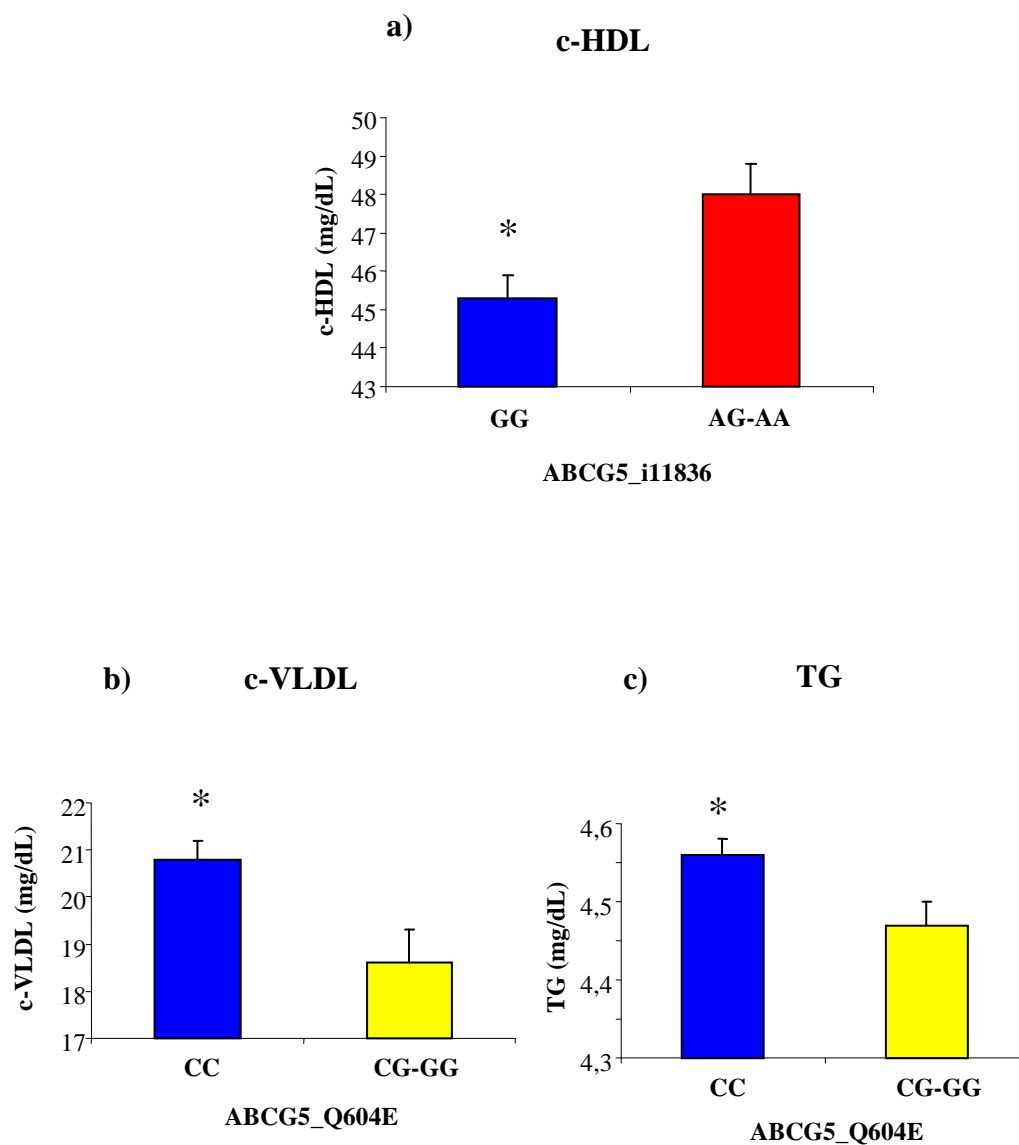
### **5.1.2. Análisis por grupos de alelos**

Con el fin de estudiar las diferencias entre alelos, respecto al efecto que ejercen sobre los lípidos plasmáticos, se agruparon los sujetos en 2 grupos según la tendencia encontrada en los análisis anteriores.

Todos los SNPs estudiados fueron agrupados por frecuencia alelica en 2 grupos siguiendo un modelo dominante de enfermedad, ya que el análisis previamente realizado no sugería un comportamiento recesivo de ninguno de los SNPs estudiados. Según esto, los individuos quedaron agrupados en homocigotos para el alelo de mayor frecuencia respecto a portadores de la mutación dentro de cada uno de los SNPs.

En este análisis se corroboraron las tendencias observadas en el anterior análisis. De esta manera, se observó que existían diferencias entre los grupos de los siguientes SNPs:

- ABCG5\_i11836G>A: en este SNP se observó que los pacientes homocigotos para el alelo de mayor frecuencia (GG) presentaban concentraciones significativamente menores de c-HDL ( $P=0,023$ ) que los pacientes portadores de la mutación (AG-AA), **figura 13a**
- ABCG5\_Q604EC>G: para este SNP se observó que existían importantes diferencias estadísticamente significativas entre grupos para las concentraciones de TG ( $P=0,017$ ) y c-VLDL ( $P=0,011$ ), según la cual los pacientes homocigotos para el alelo de mayor frecuencia C (CC) presentaron unas concentraciones superiores que los pacientes portadores de la mutación (CG-GG), **figuras 13b y 13c**
- ABCG8\_D19HG>C: en este SNP no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Sin embargo, se observó una tendencia en la misma dirección que la observada para el anterior SNP, según la cual los pacientes portadores de la mutación (CG-CC) presentaban menores concentraciones de c-VLDL ( $P=0,089$ ) y TG ( $P=0,089$ ) que los pacientes homocigotos para el alelo de mayor frecuencia (GG).



**Figura 13.** Asociación entre 2 SNPs en el gen ABCG5 y las concentraciones de lípidos plasmáticos. **a)** ABCG5\_i11836 (c-HDL). **b)** ABCG5\_Q604E (c-VLDL). **c)** ABC G5\_Q604E (TG). Análisis univariante ajustado. \* $P < 0,05$ .

## 5.2. Interacciones con variables de riesgo en pacientes con HFh

Siguiendo el esquema del estudio realizado sobre el SNP Y54C en el gen *ABCG8*, además de estudiar las asociaciones de estos nuevos SNPs con parámetros lipídicos, se estudió la interacción de los mismos con otras variables de riesgo en HF, como fueron: sexo, obesidad, tabaco y presencia de xantomas y/o arco corneal. Todos los resultados presentados han sido ajustados por edad, índice de masa corporal, actividad física, diabetes, HTA, enfermedad cardiovascular, tratamiento hipolipemiante y relación familiar.

Los resultados mostraron una interacción estadísticamente significativa entre tabaco y algunos de los polimorfismos estudiados (**tablas 17 y 18**), según la cual la presencia del tabaco modula el efecto que estos polimorfismos ejercen sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos.

Los resultados encontrados fueron los siguientes:

- *ABCG5* i7892A>G: el efecto de este SNP sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos se encontró fuertemente condicionado por la presencia del hábito tabáquico. Se observó una interesante interacción gen-tabaco respecto a las concentraciones de c-HDL, c-VLDL, TG y en el ratio CT/c-HDL, **tabla 17**. En el análisis de cada grupo por separado (fumadores y no fumadores) se observó que los pacientes fumadores y portadores del alelo mutado (AG-GG) presentaban menores concentraciones de c-HDL ( $P=0,042$ ) y mayor ratio CT/c-HDL ( $P=0,006$ ) que los pacientes homocigotos para el alelo A (AA), mientras que en pacientes no fumadores no se encontraron estas diferencias ( $P=0,853$  y  $P=0,448$  respectivamente), **figuras 14a y 14b**. En pacientes fumadores también se observó una tendencia con respecto a las concentraciones de c-VLDL ( $P=0,090$ ) y TG ( $P=0,067$ ) según la cual los pacientes portadores de la mutación (AG-GG) presentaron mayores concentraciones de ambos parámetros comparados con pacientes homocigotos para el alelo A (AA).

- ABCG5 i18429C>T: para este SNP se observó una interacción gen-tabaco en las concentraciones de CT, TG y en el ratio CT/c-HDL, **tabla 17**. En el análisis por subgrupos se observó que los pacientes fumadores y portadores del alelo mutado (CT-TT) presentaban mayores concentraciones de CT ( $P=0,040$ ) que los pacientes homocigotos para el alelo C (C/C), mientras que en pacientes no fumadores no se encontraron estas diferencias ( $P=0,210$ ), **figura 14c**. Por otro lado, y con respecto a las concentraciones de TG se observó que los pacientes no fumadores y portadores del alelo mutado (CT-TT) presentaban menores concentraciones de los mismos en comparación con los homocigotos para el alelo C (CC) ( $P=0,012$ ), mientras que en fumadores el sentido era el opuesto aunque sin alcanzar significación estadística ( $P=0,537$ ), **figura 14d**.
- ABCG5 i11836G>A: en este polimorfismo se encontraron importantes interacciones significativas entre dicho SNP y tabaco para las concentraciones de c-VLDL, TG y para el ratio CT/c-HDL, **tabla 17**. Los pacientes fumadores y portadores del alelo mutado (AG-AA) presentaron mayores concentraciones de TG ( $P=0,035$ ) que los pacientes homocigotos para el alelo de mayor frecuencia G (GG), mientras que este efecto no fue observado en pacientes no fumadores ( $P=0,629$ ), **figura 14e**.
- ABCG8 5U145T>G: en el análisis por subgrupos de este SNP se observó que los pacientes fumadores y portadores del alelo mutado (GT-GG) presentaron mayores concentraciones de c-VLDL-c ( $P=0,044$ ) que los pacientes homocigotos para el alelo normal T (TT), mientras que este efecto no fue observado en pacientes no fumadores ( $P=0,796$ ), **figura 14f**.
- ABCG5 Q604EC>G: en cuanto a este SNP, en pacientes no fumadores se observó que los portadores del alelo mutado (CG-GG) presentaban menores concentraciones de TG ( $P=0,032$ ) en comparación con los homocigotos para el alelo normal C (CC), mientras que en fumadores el sentido era el opuesto aunque sin alcanzar significación estadística ( $P=0,642$ ), **figura 14g**.

En resumen, es interesante hacer notar aquí, que en todas las interacciones encontradas y con cada uno de los SNPs, ser portador del polimorfismo ejerce un efecto deletéreo sobre los distintos parámetros lipídicos, principalmente TG, siempre y cuando se encuentre en presencia del tabaco. Sin embargo, si el tabaco no está presente, ser portador de alguno de estos polimorfismos se asocia con altas concentraciones de c-HDL y bajos niveles de TG.

**Tabla 17.** Interacción entre 4 SNPs en el gen ABCG5 y TABACO respecto a las concentraciones de lípidos plasmáticos

	NO FUMADORES		FUMADORES		P*
<b>G5_i7892</b>	<b>AA (n=139)</b>	<b>AG-GG (n=198)</b>	<b>AA (n=53)</b>	<b>AG-GG (n=75)</b>	
CT	266,3 ± 5,9	266,4 ± 4,8	266,2 ± 9,5	289,5 ± 8,0	0,112
TG	4,55 ± 0,03	<b>4,47 ± 0,02</b>	4,56 ± 0,05	<b>4,68 ± 0,04</b>	<b>0,013</b>
c-LDL	197,4 ± 5,7	198,5 ± 4,7	199,1 ± 9,3	223,9 ± 7,8	0,095
c-HDL	46,6 ± 1,0	<b>48,6 ± 0,8</b>	44,6 ± 1,6	<b>41,2 ± 1,3</b>	<b>0,030</b>
c-VLDL	20,1 ± 0,7	<b>18,9 ± 0,5</b>	20,8 ± 1,1	<b>23,6 ± 0,9</b>	<b>0,022</b>
CT/c-HDL	6,23 ± 0,2	<b>5,87 ± 0,1</b>	6,46 ± 0,3	<b>7,96 ± 0,3</b>	<b>0,002</b>
<b>G5_i18429</b>	<b>CC (n=259)</b>	<b>CT-TT (n=78)</b>	<b>CC (n=85)</b>	<b>CT-TT (n=43)</b>	
CT	266,9 ± 4,2	<b>264,1 ± 7,8</b>	270,2 ± 7,5	<b>299,5 ± 10,6</b>	<b>0,042</b>
TG	4,53 ± 0,02	<b>4,41 ± 0,04</b>	4,61 ± 0,04	<b>4,67 ± 0,06</b>	<b>0,047</b>
c-LDL	198,0 ± 4,1	198,1 ± 7,6	204,6 ± 7,3	232,0 ± 10,3	0,077
c-HDL	47,9 ± 0,7	47,3 ± 1,3	43,5 ± 1,2	40,8 ± 1,8	0,472
c-VLDL	19,9 ± 0,5	17,6 ± 0,9	22,4 ± 0,9	22,8 ± 1,3	0,173
CT/c-HDL	6,03 ± 0,1	<b>5,95 ± 0,3</b>	6,93 ± 0,3	<b>8,19 ± 0,4</b>	<b>0,038</b>
<b>G5_i11836</b>	<b>G/G (N=208)</b>	<b>AG-AA (n=129)</b>	<b>GG (n=84)</b>	<b>AG-AA (n=44)</b>	
CT	264,2 ± 4,8	269,8 ± 6,0	275,1 ± 7,6	289,3 ± 10,4	0,574
TG	4,53 ± 0,02	<b>4,47 ± 0,03</b>	4,59 ± 0,04	<b>4,70 ± 0,05</b>	<b>0,039</b>
c-LDL	196,4 ± 4,7	200,7 ± 5,9	209,9 ± 7,4	220,9 ± 10,2	0,646
c-HDL	46,3 ± 0,8	50,1 ± 1,0	42,9 ± 1,3	42,3 ± 1,7	0,092
c-VLDL	20,0 ± 0,5	<b>18,4 ± 0,7</b>	21,4 ± 0,9	<b>24,3 ± 1,2</b>	<b>0,014</b>
CT/c-HDL	6,17 ± 0,1	<b>5,77 ± 0,2</b>	6,96 ± 0,3	<b>8,05 ± 0,4</b>	<b>0,016</b>

<b>G5_Q604E</b>	<b>CC (n=248)</b>	<b>CG-GG (n=89)</b>	<b>CC (n=84)</b>	<b>CG-GG (n=44)</b>	
<b>CT</b>	268,4 ± 4,3	260,4 ± 7,3	278,2 ± 7,6	283,4 ± 10,5	0,400
<b>TG</b>	4,55 ± 0,02	<b>4,39 ± 0,04</b>	4,62 ± 0,04	<b>4,65 ± 0,05</b>	<b>0,038</b>
<b>c-LDL</b>	199,0 ± 4,2	195,1 ± 7,2	211,3 ± 7,4	218,2 ± 10,2	0,477
<b>c-HDL</b>	48,0 ± 0,7	47,2 ± 1,2	43,3 ± 1,3	41,3 ± 1,8	0,637
<b>c-VLDL</b>	20,1 ± 0,5	17,3 ± 0,8	22,8 ± 0,9	22,0 ± 1,2	0,265
<b>CT/c-HDL</b>	6,08 ± 0,1	5,80 ± 0,3	7,23 ± 0,3	7,59 ± 0,4	0,304

Valores expresados en media ± error estándar. Valores de P ajustados por edad, IMC, actividad física, diabetes, HTA, ECV, tratamiento hipolipemiante y relación familiar. P\* para la interacción

**Tabla 18.** Interacción entre 4 SNPs en el gen ABCG8 y TABACO respecto a las concentraciones de lípidos plasmáticos

	<b>NO FUMADORES</b>		<b>FUMADORES</b>		<b>P*</b>
<b>G8_5U145</b>	<b>TT (n=168)</b>	<b>GT-GG (n=169)</b>	<b>TT (n=72)</b>	<b>GT-GG (n=56)</b>	
<b>CT</b>	269,4 ± 5,3	263,4 ± 5,3	275,1 ± 8,2	285,9 ± 9,2	0,247
<b>TG</b>	4,56 ± 0,03	<b>4,45 ± 0,03</b>	4,60 ± 0,04	<b>4,67 ± 0,05</b>	<b>0,033</b>
<b>c-LDL</b>	199,8 ± 5,2	196,4 ± 5,1	208,0 ± 8,0	220,8 ± 9,0	0,254
<b>c-HDL</b>	47,6 ± 0,9	48,0 ± 0,9	43,3 ± 1,4	41,6 ± 1,5	0,393
<b>c-VLDL</b>	20,3 ± 0,6	<b>18,5 ± 0,6</b>	21,4 ± 0,9	<b>23,8 ± 1,1</b>	<b>0,020</b>
<b>CT/c-HDL</b>	6,16 ± 0,2	5,87 ± 0,2	7,24 ± 0,3	7,47 ± 0,3	0,371
<b>G8_i14222</b>	<b>TT (n=282)</b>	<b>TC-CC (n=55)</b>	<b>TT (n=96)</b>	<b>TC-CC (n=32)</b>	
<b>CT</b>	266.4 ± 4.1	265.9 ± 9.3	279.1 ± 7.0	282.2 ± 12.2	0.837
<b>TG</b>	4.52 ± 0.02	4.43 ± 0.05	4.61 ± 0.04	4.68 ± 0.07	0.127
<b>c-LDL</b>	197.7 ± 4.0	199.8 ± 9.1	212.6 ± 6.9	217.0 ± 12.0	0.894
<b>c-HDL</b>	47.8 ± 0.7	47.9 ± 1.5	43.3 ± 1.2	40.2 ± 2.1	0.281
<b>c-VLDL</b>	19.6 ± 0.5	18.1 ± 1.1	22.5 ± 0.8	22.5 ± 1.5	0.482
<b>CT/c-HDL</b>	6.02 ± 0.1	5.94 ± 0.3	7.21 ± 0.2	7.77 ± 0.5	0.364



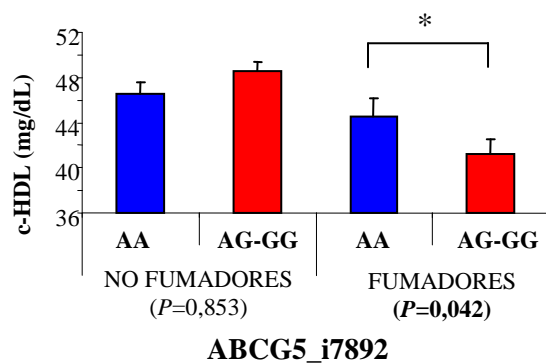
<b>G8_T400K</b>	<b>GG (n=193)</b>	<b>TG-TT (n=144)</b>	<b>GG (n=75)</b>	<b>TG-TT (n=53)</b>	
<b>CT</b>	267,9 ± 4,9	264,1 ± 5,8	276,3 ± 8,0	285,3 ± 9,6	0,383
<b>TG</b>	4,48 ± 0,02	4,54 ± 0,03	4,63 ± 0,04	4,63 ± 0,05	0,501
<b>c-LDL</b>	200,1 ± 4,8	195,1 ± 5,7	211,0 ± 7,8	217,8 ± 9,4	0,409
<b>c-HDL</b>	48,1 ± 0,8	47,3 ± 1,0	42,9 ± 1,3	42,2 ± 1,6	0,934
<b>c-VLDL</b>	19,1 ± 0,6	19,7 ± 0,7	22,6 ± 0,9	22,2 ± 1,1	0,584
<b>CT/c-HDL</b>	6,00 ± 0,2	6,03 ± 0,2	7,01 ± 0,3	7,83 ± 0,3	0,183

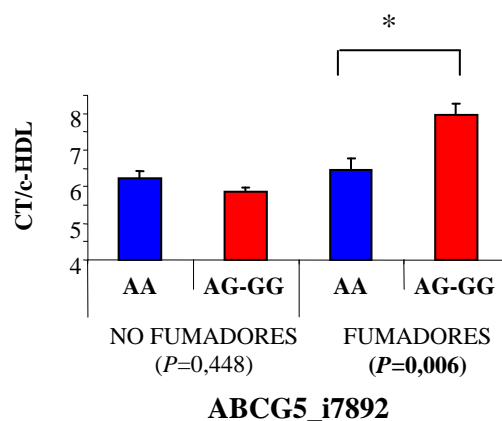
<b>G8_D19H</b>	<b>GG (n=307)</b>	<b>CG-CC (n=30)</b>	<b>GG (n=110)</b>	<b>CG-CC (n=18)</b>	
<b>CT</b>	267,6 ± 3,9	253,7 ± 12,6	282,9 ± 6,6	260,6 ± 16,4	0,702
<b>TG</b>	4,52 ± 0,02	4,36 ± 0,07	4,63 ± 0,03	4,63 ± 0,09	0,195
<b>c-LDL</b>	198,9 ± 3,8	190,2 ± 12,3	216,8 ± 6,4	192,9 ± 16,0	0,477
<b>c-HDL</b>	47,9 ± 0,6	46,5 ± 2,1	42,6 ± 1,1	42,9 ± 2,8	0,647
<b>c-VLDL</b>	19,6 ± 0,4	17,1 ± 1,5	22,7 ± 0,8	20,9 ± 2,0	0,807
<b>CT/c-HDL</b>	6,04 ± 0,1	5,69 ± 0,5	7,38 ± 0,2	7,17 ± 0,6	0,868

Valores expresados en media ± error estándar. Valores de P ajustados por edad, IMC, actividad física, diabetes, HTA, ECV, tratamiento hipolipemiante y relación familiar. P\* para la interacción

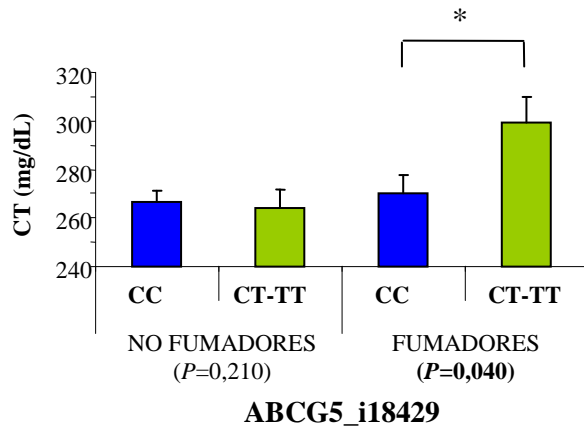
a) P para interacción=0,030



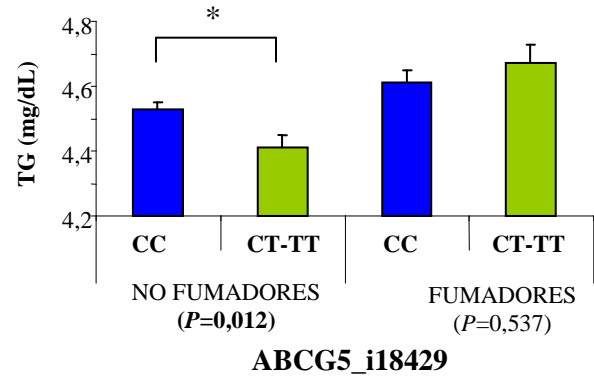
b) P para interacción=0,002



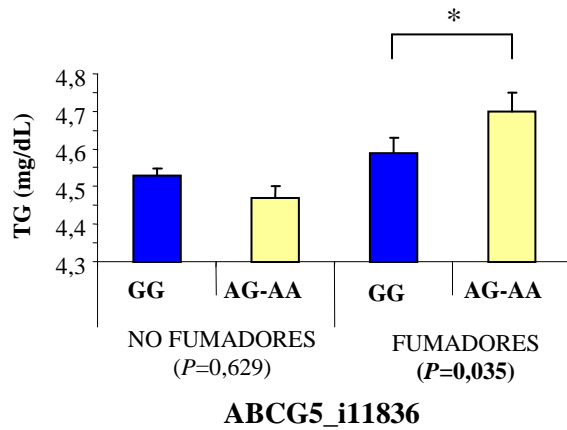
c)  $P$  para interacción=0,040



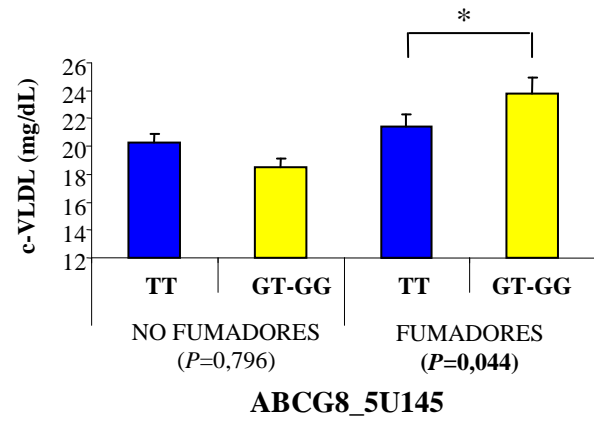
d)  $P$  para interacción=0,047



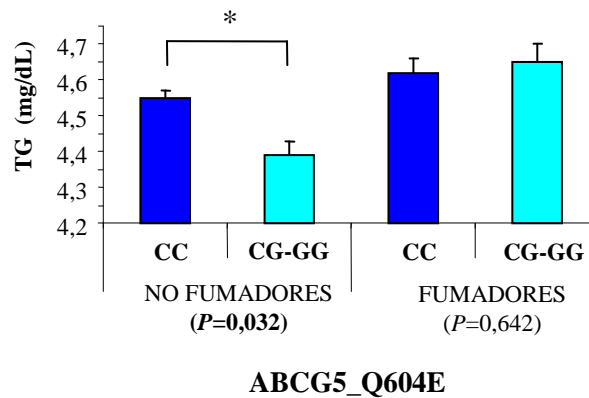
e)  $P$  para interacción=0,039



f)  $P$  para interacción=0,020



g)  $P$  para interacción=0,038



**Figura 14.** Representación gráfica de la interacción entre polimorfismos en los genes *ABCG5/G8* con *TABACO* y su influencia sobre los parámetros lipídicos. **a)** *ABCG5\_i7892* (*c-HDL*). **b)** *ABCG5\_i7892* (*CT/c-HDL*). **c)** *ABCG5\_i18429* (*CT*). **d)** *ABCG5\_i18429* (*TG*). **e)** *ABCG5\_i11836* (*TG*). **f)** *ABCG8\_5U145* (*c-VLDL*). **g)** *ABCG5\_Q604E* (*TG*)

No se encontraron interacciones estadísticamente significativas entre estos nuevos SNPs estudiados en los genes *ABCG5/8* y las variables sexo, obesidad, presencia de xantomas o de arco corneal.

## VII. DISCUSIÓN

Este estudio prueba una nueva evidencia que soporta que variaciones polimórficas en los genes *ABCG5/G8* modulan las concentraciones finales de lípidos plasmáticos en pacientes con HFh. Por otro lado, este trabajo confirma que el efecto que dichas variaciones genéticas ejercen sobre el metabolismo lipídico es influenciado por la presencia del hábito tabáquico.

La mayoría del conocimiento del que disponemos en la actualidad acerca del papel que los genes *ABCG5/G8* ejercen sobre el metabolismo lipídico procede de modelos animales. En ratones, la deficiencia de *ABCG5/G8* ha sido asociada con una reducción en la secreción biliar de colesterol y un aumento en la absorción de esteroides vegetales<sup>208</sup>, mientras que la sobreexpresión de aquellos genes promueve la secreción biliar de colesterol y reduce la absorción del mismo, además de incrementar la excreción fecal de esteroides vegetales<sup>209</sup>. En este sentido, es conocido que las proteínas cotransportadoras *ABCG5/G8* juegan un papel esencial en el transporte hepatobiliar de colesterol, a través de su influencia sobre la vía del transporte reverso del colesterol (TRC)<sup>66, 204, 205, 278</sup>. Mutaciones en los genes que codifican a estas dos importantes proteínas condicionarán un dramático incremento en la absorción de colesterol y esteroides vegetales, como ha sido ampliamente demostrado en pacientes con sitosterolemia. Por lo tanto, la presencia de determinadas variantes polimórficas en los genes *ABCG5/G8*, que suponen un cambio de nucleótido, conllevarán a modificaciones en la cadena de aminoácidos y como consecuencia de ello muy posiblemente darán lugar a modificaciones tanto en la estructura como en la función que estos transportadores desarrollan.

En este sentido, pequeños estudios en humanos han investigado la relación existente entre la presencia de determinados SNPs en los genes *ABCG5/G8* y las concentraciones de lípidos plasmáticos<sup>252, 257-260</sup>. De esta manera, se ha demostrado asociación significativa entre tres SNPs (Gln604Glu, Thr400Lys y Tyr54Cys) en los genes *ABCG5/G8* y las concentraciones finales de CT y c-LDL<sup>252, 259, 260</sup>. A su vez, se ha encontrado asociación entre el polimorfismo Gln604Glu en el gen *ABCG5* y los niveles de c-HDL<sup>257</sup>, así como entre el SNP Thr400Lys en el gen *ABCG8* y las

concentraciones finales de TG <sup>258</sup>. Sin embargo, y a pesar de la importancia contrastada que los transportadores *ABCG5/G8* tienen en la cinética del colesterol en humanos, pocos estudios han investigado el papel que la presencia de variantes genéticas en estos locus podría tener sobre las concentraciones finales de lípidos plasmáticos en pacientes con HF. Por lo tanto, nosotros llevamos a cabo este estudio sobre la base de que que variaciones polimórficas en los genes *ABCG5/G8* podrían tener influencia sobre las concentraciones de c-HDL y otros lípidos plasmáticos. Esto podría dar una respuesta a la alta variabilidad interindividual y al alto riesgo de enfermedad cardiovascular que presentan los pacientes con HFh. Así, nuestros resultados demuestran una novedosa y significativa asociación entre los SNPs i11836G>A e Y54C, en los genes *ABCG5* y *ABCG8* respectivamente, y las concentraciones de c-HDL. Según ésto, los individuos portadores del alelo A para i11836G>A y los sujetos homocigotos GG para Y54C presentaron mayores concentraciones c-HDL. A su vez, los sujetos portadores del SNP Gln604GluC>G y los homocigotos GG para Y54C, presentaron menores concentraciones de TG. Este patrón de asociaciones no había sido previamente descrito. Estos hallazgos soportan la importancia funcional que estos tres SNPs en los genes *ABCG5/G8* ejercen sobre el metabolismo lipídico.

Hasta la fecha, no muchos estudios han examinado la asociación existente entre la presencia de polimorfismos en los genes *ABCG5/G8* y las concentraciones de lípidos plasmáticos en pacientes con hipercolesterolemia severa. En este contexto, Koeijvoets y colaboradores <sup>263</sup> estudiaron el efecto que ejercía la presencia de dos SNPs (D19H y T400K) en el gen *ABCG8*, sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos y sobre el desarrollo de ECV en 2012 pacientes con HFh. En este estudio, aunque ellos no encontraron asociaciones estadísticamente significativas con lípidos plasmáticos, demostraron que aquellas variantes polimórficas en el gen *ABCG8* pueden afectar al riesgo de desarrollar ECV. Del mismo modo, Miwa y colaboradores <sup>262</sup> no encontraron asociación significativa entre la presencia de tres SNPs (Q604E, Y54C y T400K) en los genes *ABCG5/G8* y las concentraciones de lípidos plasmáticos en 100 pacientes japoneses con hipercolesterolemia primaria.

Consistente con ambos estudios, nuestros resultados no demostraron asociación estadísticamente significativa entre los SNPs D19H y T400K y las concentraciones de lípidos plasmáticos. Sin embargo, y en contraste con el estudio de Miwa y

colaboradores, nuestros datos demuestran que existe una asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos Q604E e Y54C y las concentraciones finales de TG, según la cual, los individuos portadores del primer SNP y homocigotos GG para el segundo, presentaban menores concentraciones de TG. A su vez, ser homocigoto GG para el SNP Y54C se encontraba asociado con mayores niveles de c-HDL en plasma. Sin embargo, es importante destacar que ambos estudios presentan enormes diferencias como pueden ser el número de individuos, la raza y las características propias inherentes a cada población.

Adicionalmente, Santosa y colaboradores<sup>254</sup> estudiaron la asociación que existía entre las concentraciones de lípidos plasmáticos y la presencia de cuatro SNPs (Q604E, i7892, i18429 y M216) en el gen *ABCG5* y otros cuatro SNPs (Y54C, D19H, i14222 y T400K) en el gen *ABCG8*, en 35 mujeres jóvenes con hipercolesterolemia, tras un periodo de seguimiento en el que se valoró además la pérdida de peso al final del mismo. Ellos encontraron que los SNPs Y54C y Q604E estaban asociados con una respuesta del metabolismo del colesterol a la pérdida de peso. Más específicamente, los sujetos homocigotos para el alelo menor del SNP Q604E presentaron una mayor reducción en la absorción de colesterol y un mayor incremento en la síntesis del mismo, en comparación con individuos heterocigotos u homocigotos para el alelo común. En cuanto al SNP Y54C, los individuos heterocigotos presentaron una menor reducción en la síntesis de CT, tras el periodo de seguimiento para la pérdida de peso, y a su vez, los sujetos portadores del alelo menor presentaron una menor síntesis de CT al final de dicho periodo, que los sujetos homocigotos para el alelo común. En el presente estudio, los mismos SNPs fueron estudiados, pero sobre nuestra población no se encontró asociación con las niveles de CT. Por el contrario, nuestro análisis demostró que los individuos homocigotos GG para el SNP Y54C presentaban mayores concentraciones de c-HDL, así como, una interesante asociación entre este último polimorfismo y el SNP Q604E y los niveles de TG, según la cual ser portador de ambos polimorfismos se asociaba con una menor concentración. Obviamente, es importante considerar que existen grandes diferencias entre ambos estudios en cuanto al diseño de los mismos, tamaño de la muestra y las características de los sujetos incluidos en cada uno de los estudios.

Estas novedosas asociaciones, en las que determinadas variantes polimórficas ejercen una especial influencia en las concentraciones de c-HDL y TG, suponen una fuerte evidencia que apoya el importante papel que los cotransportadores ABCG5/G8 ejercen sobre la regulación del metabolismo lipídico y al mismo tiempo realza la importancia que estos genes ejercen en las últimas etapas del transporte reverso de colesterol (TRC) <sup>264</sup>. En el presente estudio, la presencia de los SNPs 11836G>A e Y54C se asoció con las concentraciones de c-HDL. Ser portador del alelo menor para el primer SNP o bien ser homocigoto para el alelo menor en el segundo, está asociado con una mayor concentración de c-HDL. El mecanismo por el cual estos SNPs podrían modular las concentraciones de c-HDL permanece incierto. Sin embargo, es conocido que dentro del metabolismo lipídico, el TRC es la vía metabólica protectora de la aterogénesis, ya que se encarga de conducir el colesterol remanente desde los distintos tejidos, incluida la pared arterial, hacia el hígado para su posterior reutilización o eliminación a través de la bilis, evitando su acumulación a nivel tisular <sup>103-105</sup>. La eficiencia de esta importante vía metabólica anti-aterogénica puede evaluarse en el laboratorio mediante dos parámetros que cuantifican indirectamente a las HDL: por un lado la Apo AI que es su proteína mayoritaria, y por su contenido de c-HDL en plasma. Por otro lado, recientemente, varios estudios en animales de experimentación han demostrado que la activación del TRC por parte del LXR, requiere de la presencia de los transportadores ABCG5/G8, **figura 8** <sup>226, 227, 230, 265</sup>. Por lo tanto, la presencia de estas variantes polimórficas podría promover la activación del LXR, lo que conduciría hacia un incremento en los niveles de c-HDL a través de la activación del camino del TRC por parte del LXR. Un buen ejemplo que avala esta teoría lo constituyen los resultados encontrados para el SNP Y54C. Los individuos homocigotos GG para este SNP presentaron una mayor concentración de c-HDL. Pero a su vez, estos sujetos presentaban una mayor concentración de ApoA-I, que como ha quedado reflejado anteriormente constituye la proteína mayoritaria de estas moléculas, lo que da una idea de la importancia que esta variante polimórfica puede ejercer sobre el TRC.

Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la activación del LXR, así como la inactivación del FXR, induce hipertrigliceridemia en animales de experimentación <sup>235, 240, 279</sup>. Según ésto, podemos comprobar como la presencia de estos receptores nucleares puede influir no sólo en las concentraciones de c-HDL sino que también se encuentran involucrados en el metabolismo de los TG. La estrecha relación

existente entre los transportadores ABCG5/G8 y los receptores nucleares LXR/FXR<sup>226, 227, 230, 265</sup>, a través de la vía común del TRC (**figura 8**), sin duda hace que sean las concentraciones de c-HDL y TG las que principalmente se modifiquen ante la presencia de variantes polimórficas en los genes ABCG5/G8, como de hecho ocurre en nuestro estudio. En este sentido, los resultados del presente trabajo demuestran no solo asociación con c-HDL, sino que se presenta también otra novedosa asociación entre los SNPs Gln604GluC>G e Y54C y los niveles de TG, según la cual, la presencia de ambos polimorfismos fue asociada a menores concentraciones.

El mecanismo por el que la presencia de estos polimorfismos se asocia con las concentraciones de TG, permanece incierto. Sin embargo, dado que se ha demostrado en animales de experimentación que tanto la activación de LXR como la inactivación de FXR ocasionan hipertrigliceridemia, la asociación de estos 2 SNPs con los niveles de TG se podría explicar a través de la influencia que su presencia ejerce en esta vía de regulación. De este modo, la presencia de estos polimorfismos podría producir una inactivación de LXR o bien una activación de FXR lo que conduciría a una disminución en las concentraciones de TG, como ha sido demostrado en ratones. Siguiendo como ejemplo con el SNP Y54C, los individuos homocigotos GG para este SNP no sólo presentaron mayores concentraciones de c-HDL y ApoA-I, sino que también se asociaron con menores concentraciones de TG. Esto refuerza, la importancia funcional de este SNP puesto que es conocido que los TG constituyen un importante factor de riesgo aterogénico, ya que entre otros mecanismos producen alteraciones a distintos niveles en las etapas del transporte reverso del colesterol, haciéndolo menos eficiente. Este efecto se traduce en los parámetros de laboratorio, fundamentalmente, en una disminución del c-HDL y, en menor grado, en una disminución en la concentración de ApoA-I. Para el caso de este SNP, Y54C, al asociarse con bajos niveles de TG, puede que éstos no esten ejerciendo su influencia negativa sobre el TRC, lo que se traduce en elevadas concentraciones de c-HDL y ApoA-I.

En definitiva, estas novedosas asociaciones podrían suponer una importante evidencia que soportara la hipótesis de que la expresión de los genes *ABCG5/G8* se encuentra regulada por varios receptores nucleares, tales como LXR y FXR, como ya se ha demostrado en animales de experimentación<sup>227, 280</sup>. Este hecho podría ser consistente con lo expuesto previamente en la parte de Material y Métodos, según la cual uno de los



SNP estudiados (5U145A>C) en el gen *ABCG8*, presenta un alelo específico con FXR (NR1H4), lo que podría explicar la estrecha relación entre ambos. A su vez, demuestra la importancia que determinadas variantes polimórficas en los genes *ABCG5/G8* ejercen sobre el metabolismo lipídico, especialmente sobre las concentraciones de c-HDL y TG.

Otra interesante observación desde nuestro estudio fue que la presencia de determinadas polimorfismos en los genes *ABCG5/G8* modula el efecto que el tabaco ejerce sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos en pacientes con HFh. Interesantemente, nuestros resultados demuestran que los portadores de los alelos minoritarios G, T, A y G de los polimorfismos i7892A>G, i18429C>T, i11836G>A y 5U145T>G presentaron, respectivamente, menores concentraciones de c-HDL, mayores niveles de CT, TG y c-VLDL, pero solamente si dichos portadores se encontraban dentro del grupo de fumadores. Por el contrario, tal efecto no fue observado en no fumadores. Es importante hacer notar aquí que los portadores de los mencionados SNPs estaban relacionados con lipoproteínas aterogénicas, pero sólo en presencia del tabaco puesto que este efecto deletéreo no se demostró en pacientes no fumadores.

Por el contrario, los individuos no fumadores y portadores de los alelos minoritarios T y G de los polimorfismos i18429C>T y Gln604GluC>G se encontraban asociados con unas concentraciones menores de TG. Sin embargo, este efecto protector no fue observado entre el grupo de fumadores. En estos 2 SNPs podemos comprobar, a diferencia de lo anteriormente expuesto, como ser portador de dichas variantes polimórficas se encuentra asociado con un mejor perfil de TG, perfil que se transforma hacia el polo opuesto en presencia del tabaco. Estos hallazgos, muestran un claro ejemplo de cómo las interacciones genes-ambiente, en este caso con el tabaco, pueden llegar a modificar el fenotipo clínico de un paciente. Hasta lo que conocemos, este es el primer estudio en demostrar estas interacciones genes-ambiente en pacientes con HFh.

En línea con estas observaciones, nosotros previamente habíamos demostrado que la presencia de determinadas variaciones polimórficas modulan los efectos del tabaco sobre las concentraciones de c-HDL <sup>264</sup>. El estudio se llevo a cabo sobre 845 adultos, no hipercolesterolémicos, pertenecientes a una población de Puerto Rico. En concreto, nuestros resultados demostraron que los individuos portadores del alelo minoritario para los SNPs Gln604GluC>G, Asp19HisG>C e i14222A>G en los genes *ABCG5/G8*

presentaron menor concentración de c-HDL, pero sólo si ellos eran fumadores. También, los individuos fumadores y homocigotos para el alelo común del SNP Thr400LysC>A en el gen *ABCG8* fueron asociados con menores concentraciones de c-HDL. Este trabajo, al igual que el presente estudio, demostraba que las interacciones genes-ambiente pueden afectar al fenotipo clínico de la persona, de ahí que esto mismo se convirtió en uno de los objetivos de nuestro estudio. El presente trabajo demuestra que existen otras novedosas interacciones entre estos SNPs en los genes *ABCG5/G8* y el tabaco en el que se encuentran implicados otros parámetros lipídicos, no sólo el c-HDL. No obstante, es importante mencionar aquí que las características especiales de nuestra población hacen que sea muy difícil la comparación con otras poblaciones de sujetos sanos sin hipercolesterolemia.

Dentro de nuestro estudio, es importante destacar que cinco de las interacciones estadísticamente significativas entre SNPs y tabaco, cuatro en el gen *ABCG5* (i7892A>G, i18429C>T, i11836G>A y Gln604GluC>G) y una en el gen *ABCG8* (5U145T>G), estaban relacionadas con las concentraciones finales de TG. Esto mismo, refuerza los hallazgos anteriormente expuestos en el que la principal asociación de estos SNPs se produjo con las concentraciones de TG. El mecanismo fisiopatológico que explicaría tales interacciones permanece incierto. Sin embargo, es conocido que el tabaco incrementa las concentraciones de CT y TG, y disminuye las concentraciones de c-HDL. Al mismo tiempo, se ha demostrado que la interacción genes-tabaco modifica los efectos que este último ejerce sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos<sup>109, 281-283</sup>. Por otro lado, también ha sido demostrado en animales de experimentación que la interacción entre FXR y LXR regula la expresión hepática de transportadores *ABCG5/G8*<sup>280</sup>. Por lo tanto, desde nuestros resultados nosotros podríamos especular que el tabaco produce una disminución en la expresión hepática de los genes *ABCG5/G8*, a través de la inactivación del sistema LXR/FXR. Esto conduciría a un detrimento en el papel que estos transportadores *ABCG5/G8* ejercen sobre el TRC, lo que se traduciría en importantes cambios en las concentraciones de c-HDL y TG.

En general, nuestro estudio presenta algunas fortalezas, que le dan consistencia a los resultados. Por un lado, el hecho de que incluya a pacientes que presentan elevadas concentraciones de colesterol en plasma. Esto resulta interesante puesto que los transportadores *ABCG5* y *ABCG8* son proteínas transmembrana que van a determinar

el balance neto de colesterol en plasma, actuando tanto a nivel intestinal (modulando la absorción), como a nivel hepático (promoviendo la excrección). Por tanto, esta población constituye un buen sustrato para el estudio de la influencia que ejercen determinados SNPs en el balance funcional final de estos transportadores. A su vez, el estudio incluye sólo sujetos que presentan un diagnóstico genético de HF, demostrado por la presencia de una mutación en el RLDL. Esto hace que la muestra represente un grupo homogéneo en el que todos los pacientes presentan un diagnóstico de certeza de enfermedad, lo que evita los falsos positivos que con un diagnóstico clínico de HF podemos encontrar. Además, con el fin de homogeneizar la muestra, los individuos con un defecto localizado en la ApoB fueron eliminados del estudio, al igual que los sujetos con datos faltantes respecto a las variables analizadas.

Por otro lado, los genes *ABCG5* y *ABCG8* que codifican estas proteínas, se encuentran ubicados en la banda 21 del brazo corto del cromosoma 2 (2p21), separados entre ellos por tan sólo 140 pares de bases y su expresión tiene lugar a nivel intestinal y hepático<sup>205</sup>. Por tanto, son 2 genes que se encuentran juntos, que codifican proteínas que pertenecen a la misma familia y que finalmente van a realizar la misma función. Esto tiene especial importancia puesto que a la hora de estudiar la presencia de variantes polimórficas en estos genes, es necesario seleccionar dichos SNPs en ambos genes, puesto que como hemos dicho es imposible su separación, al encontrarse localizados sobre la misma zona y al desarrollar ambos la misma función. En el presente estudio, se tuvo en cuenta esta particularidad y se hizo una cuidadosa selección de SNPs en ambos genes, con el fin de que los resultados finales alcanzaran una consistencia.

Sin embargo, somos conscientes de que nuestro estudio presenta algunas limitaciones. Por una parte, este estudio se encuentra realizado sobre una población muy específica caracterizada por elevadas concentraciones de c-LDL y con alto riesgo cardiovascular. Esto nos lleva a ser cautos en la extrapolación de nuestros resultados y hace difícil la replicación de los mismos en otras poblaciones. Por otro lado, se trata de un estudio transversal, por lo que las variables y parámetros determinados representan una medida puntual en el tiempo. A su vez, dado que los transportadores *ABCG5/G8* han sido relacionado con la absorción intestinal de colesterol y esteroides<sup>249, 259</sup>, medir las concentraciones de esteroides vegetales en plasma podría ser recomendable para comprender mejor los mecanismos fisiológicos de las observaciones realizadas.

Finalmente, la medida del tamaño de las partículas de HDL, así como de otras partículas ricas en triglicéridos, podría ayudar a evaluar más en profundidad la estrecha relación existente entre determinadas variantes polimórficas y las concentraciones de c-HDL y TG.

Obviamente, necesitamos ser cautos antes de extrapolar nuestras conclusiones a otras poblaciones y una replicación de nuestros resultados sería esencial. Sin embargo, nuestros resultados demuestran la importancia que determinadas variantes polimórficas en los genes *ABCG5/G8* ejercen sobre el metabolismo lipídico. Además, el presente estudio abre un campo novedoso y prometedor en el que se demuestra que la presencia de determinados factores de riesgo como el tabaco, pueden interactuar con nuestros genes, lo que conlleva a una modificación en el fenotipo clínico previamente establecido. Estudiar estas interesantes y novedosas interacciones genes-tabaco sería de un enorme interés con el objetivo de entender los mecanismos fisiológicos implicados en ellas, lo que nos podría ayudar a obtener una mejor predicción del riesgo de desarrollar ECV.

En resumen, nuestro estudio demuestra que en pacientes con HFh la presencia de determinadas variaciones polimórficas en los genes *ABCG5* y *ABCG8* modula las concentraciones de lípidos plasmáticos, especialmente c-HDL y TG. Por otro lado, confirma que el efecto que la presencia de estos SNPs ejerce sobre los lípidos plasmáticos, puede verse influenciado por la actuación del tabaco. Por lo tanto, estos resultados podrían explicar la enorme variabilidad interindividual en cuanto al desarrollo de ECV existente entre pacientes con HFh. Al mismo tiempo soporta la idea de que las interacciones genes-ambiente pueden afectar el fenotipo clínico que presenten estos pacientes.

## VIII. CONCLUSIONES

### CONCLUSIÓN PRINCIPAL

La presencia de los polimorfismos i11836G>A en el gen *ABCG5* e Y54C en el gen *ABCG8* influyen sobre las concentraciones finales de c-HDL. El hecho de ser portador del alelo minoritario para el primer SNP o bien ser homocigoto para el alelo minoritario G del segundo, está asociado con una mayor concentración de c-HDL

### CONCLUSIONES SECUNDARIAS

1°. Los polimorfismos Gln604GluC>G en el gen *ABCG5* e Y54C en el gen *ABCG8*, se encuentran relacionados con las concentraciones de TG. Ser portador del alelo minoritario para el primer SNP o bien ser homocigoto para el alelo minoritario G del segundo, está asociado con menores concentraciones de TG. Además, ser homocigoto para el alelo minoritario G del SNP Y54C está asociado con mayores concentraciones de ApoA-I. Las concentraciones de CT, c-LDL, ApoB y Lp (a), no se modificaron por la presencia de las variantes polimórficas analizadas en los genes *ABCG5/G8*

2°. La presencia de los polimorfismos estudiados en los genes *ABCG5/G8* no modulan las concentraciones de LDL oxidada y lipoperóxidos

3°. No se encontraron interacciones entre el polimorfismo Y54C en el gen *ABCG8* y variables de riesgo en HFh (sexo, hábito tabáquico, obesidad, presencia de xantomas y/o arco corneal)

4°. El hábito tabáquico, ejerce una interacción sobre los SNPs i7892A>G, i18429C>T, i11836G>A, 5U145T>G y Gln604GluC>G, modificando las concentraciones de lípidos plasmáticos. De esta manera, ser fumador y portador del alelo minoritario para los SNPs i7892A>G, i18429C>T, i11836G>A en el gen *ABCG5* y 5U145T>G en el gen *ABCG8*, está relacionado con menores concentraciones de c-HDL y mayores niveles de CT, TG y de c-VLDL, respectivamente. Sin embargo, este efecto deletéreo no se observa en los sujetos no fumadores portadores de dichos alelos.

Además, ser portador del alelo minoritario T y G para los SNPs i18429C>T y Gln604GluC>G en el gen *ABCG5* está relacionado con menores concentraciones de TG, solamente en sujetos no fumadores. En fumadores, este efecto protector no se observa.

## **IX. ABREVIATURAS**

AA: homocigoto para el alelo A  
ABC: proteína transportadora de membrana  
ABCA: proteína transportadora de membrana subfamilia A  
ABCG5: proteína transportadora de colesterol dependiente de ATP G5  
ABCG8: proteína transportadora de colesterol dependiente de ATP G8  
ACAT: acilcoenzima A colesterol aciltransferasa  
AD: autonómica dominante  
ADA: asociación americana de diabetes  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
AG: heterocigoto  
AHA: American Heart Association  
ALT: alanino aminotransferasa  
ANOVA: análisis de la varianza  
ApoA-I: apolipoproteína A-I  
ApoA-II: apolipoproteína A-II  
Apo B: apolipoproteína B  
ApoB-100: apolipoproteína 100  
ApoC-I: apolipoproteína C-I  
ApoC-II: apolipoproteína C-II  
ApoE: apolipoproteína E  
ARH: hipercolesterolemia autosómica recesiva  
ARN: ácido ribonucleico  
AST: aspartato aminotransferasa  
ATP: adenosina trifosfato  
BSEP: bomba exportadora de sales biliares  
C: extremo C-terminal  
CE: ésteres de colesterol  
CETP: enzima de transferencia de ésteres de colesterol  
c-HDL: colesterol vehiculizado en lipoproteínas de alta densidad  
c-LDL: colesterol vehiculizado en lipoproteínas de baja densidad  
CPK: creatin fosfokinasa

CT: colesterol total  
c-VLDL: colesterol vehiculizado en lipoproteínas de muy baja densidad  
CYP7A1: colesterol 7 alfa-hidroxilasa  
Cys: cisteína  
DE: desviación estándar  
DGGE: electroforesis en geles con gradiente desnaturizante  
DM: diabetes mellitus  
ECG: electrocardiograma  
ECP: enfermedad coronaria prematura  
ECV: enfermedad cardiovascular  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EGF: factor de crecimiento epidérmico  
ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas  
EROs: especies reactivas de oxígeno  
FA: fosfatasa alcalina  
FC: frecuencia cardiaca  
FXR: receptor nuclear de ácidos biliares (Farnesoid X Receptors)  
GG: homocigoto para el alelo G  
GGT: gamma-glutamyl-transpeptidasa  
H0: hipótesis nula  
H1: hipótesis alternativa  
HAD: hipercolesterolemia autonómica dominante  
HBA1C: hemoglobina glicosilada  
HF: hipercolesterolemia familiar  
HFh: hipercolesterolemia familiar heterocigota  
HFH: hipercolesterolemia familiar homocigoto  
HMG-CoA: hidroximetilglutaril coenzima A  
HTA: hipertensión arterial  
HW: Hardy-Weinberg  
IMC: índice de masa corporal  
ITB: índice tobillo-brazo  
JNC-VI: VI informe del Joint National Committee para el control de HTA  
Kb: kilobase  
LCAT: lisolecitina colesterol aciltransferasa



LDL-ox: lipoproteína de baja densidad oxidada  
Lp (a): lipoproteína A  
LPO: lipoperóxidos  
LXR: receptor nuclear de oxisteroles (Liver X receptor)  
MEDLARS: Medical literature analysis and retrieval system  
MEDPED: programa para el diagnóstico precoz y prevención de muerte prematura.  
MeSH: Medical subjects headings  
MONICA: proyecto MONICA: “Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular disease”  
N: extremo N-terminal  
NBD: dominios de unión  
NPC1L1: proteína de Niemann-pick C1-L1  
NS: no significativo  
OMS: organización mundial de la salud  
PAD: presión arterial diastólica  
PAM: presión arterial media  
PAS: presión arterial sistólica  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PCSK9: proproteína convertasa subtilisina/resina tipo 9  
RLDL: receptor de las lipoproteínas de baja densidad  
RNH: receptores nucleares heterodiméricos  
RXR: receptor retinoide X  
SNP: polimorfismo  
SSCP: polimorfismo de conformación de cadena sencilla  
SR-B1: receptor scavenger B1  
T4: tiroxina  
TA: tensión arterial  
TG: triglicéridos  
TRC: transporte reverso del colesterol  
TSH: hormona estimulante del tiroides  
Tyr: tirosina

## X. REFERENCIAS

1. Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. New York, NY: McGraw-Hill; 2001. p. 2863-2913
2. Ose L. **Muller-Harbitz disease familial hypercholesterolemia**. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2002;122:924-5
3. Burnett JR, Hooper AJ. **Common and Rare Gene Variants Affecting Plasma LDL Cholesterol**. *Clin Biochem Rev*. 2008 Feb;29(1):11-26
4. Abhimanyu Garg and Vinaya Simha. **Update on dyslipidemia**. *J Clin Endocrinol Metab*. 92:1581-1589, 2007
5. Goldstein JL, Brown MS. **The LDL receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia**. *Ann Rev Genet* 1979;13:259-289
6. Health KE, Gahan M, Whittall RA, Humphries SE. **Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolemia: update, new features and mutation analysis**. *Atherosclerosis* 2001;154:243-6
7. Brown MS, Goldstein JL. **A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis**. *Science* 1986;232:34-47
8. Alonso R, Castillo S, Civeira F, Puzo J, de la Cruz JJ, Pocovi M, Mata P. **Hipercolesterolemia familiar heterocigota en España. Estudio descriptivo de 819 casos no relacionados**. *Med Clin (Barc)* 2002;118:487-492

9. Civeira F. International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. **Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 2004;173:55-68
10. Genest J Jr, Lavoie MA. **Homozygous Familial Hypercholesterolemia.** *N Engl J Med* 1999;341:490
11. Bilal MS, Aydemir NA, Cine N, Celebi A, Kaplan M. **Triple coronary bypass in a child with homozygous familial hypercholesterolemia.** *Heart Surg Forum.* 2005;8(5):E351-3
12. Morrisett JD, Vickers KC. **Vascular calcification in homozygote familial hypercholesterolemia.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Apr;28(4):606-7
13. Kubalska J, Chmara M, Limon J, Wierzbicka A, Prokurat S, Szaplyko J, Kowalik A, Mierzevska H, Defesche JC, Pronicka E. **Clinical course of homozygous familial hypercholesterolemia during childhood: report on 4 unrelated patients with homozygous or compound heterozygous mutations in the LDLR gene.** *J Appl Genet.* 2008;49(1):109-13
14. Moorjani S, Roy M, Gagné C, Davignon J, Brun D, Toussaint M, Lambert M, Campeau L, Blaichman S, Lupien P. **Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Québec Province.** *Arteriosclerosis* 1989 Mar-Apr;9(2):211-6
15. Kotze MJ, De Villiers WJ, Steyn K, Kriek JA, Marais AD, Langenhoven E, Herbert JS, Graadt Van Roggen JF, Van der Westhuyzen DR, Coetzee GA. **Phenotypic variation among familial hypercholesterolemics heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations.** *Arterioscler Thromb* 1993 Oct;13(10):1460-8
16. Gylling H, Aalto-Setälä K, Kontula K, Miettinen TA. **Serum low density lipoprotein cholesterol level and cholesterol absorption efficiency are influenced by apolipoprotein B and E polymorphism and by the FH-**

- Helsinki mutation of the low density lipoprotein receptor gene in familial hypercholesterolemia.** *Arterioscler Thromb* 1991 Sep-Oct;11(5):1368-75
17. Scientific Steering Committee (SSC) on behalf of the Simon Broome register Group. **Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolemia.** *BMJ* 1991;303:893-896
18. Scientific Steering Committee (SSC) on behalf of the Simon Broome register Group. **Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolemia: implications for clinical management.** *Atherosclerosis* 1999;142:105-12
19. Slack J. **Risks of ischaemic heart-disease in familial hyperlipoproteinaemic states.** *Lancet* 1969;2:1380-2
20. Hirobe K, Matsuzawa Y, Ishikawa K, Tarui S, Yamamoto A, Nambu S, Fujimoto K. **Coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 1982;44:201-210
21. Koivisto UM, Hämäläinen L, Taskinen MR, Kettunen K, Kontula K. **Prevalence of familial hypercholesterolemia among young north Karelian patients with coronary heart disease: a study based on diagnosis by polymerase chain reaction.** *J Lipid Res* 1993 ;34:269-277
22. Baron H, Fung S, Aydin A, Bähring S, Luft FC, Schuster H. **Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the diagnosis of familial hypercholesterolemia.** *Nat Biotechnol* 1996;14:1279-1282
23. Schuster H. **High risk/high priority: familial hypercholesterolemia--a paradigm for molecular medicine.** *Atherosclerosis* 2002 (Suppl 2):27-32
24. Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, Takeda R. **Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia.** *Circulation* 1989;79:225-232

25. Miettinen TA, Gylling H. **Mortality and cholesterol metabolism in familial hypercholesterolemia.** *Arteriosclerosis* 1988;8:163-167
26. **Familial Hypercholesterolemia. Report of a World Health Organization Study Group. Human genetics programme.** Geneva, 1998
27. Huijgen R, Vissers MN, Defesche JC, Lansberg PJ, Kastelein JJ, Hutten BA. **Familial hypercholesterolemia: current treatment and advances in management.** *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;6:567-581
28. **MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised, placebo-controlled trial.** *Lancet* 2002;360:7-22
29. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, Grasso AW, Schoenhagen P, Hu T, Wolski K, Crowe T, Desai MY, Hazen SL, Kapadia SR, Nissen SE. **Statins, high-density lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis.** *JAMA* 2007 Feb 7;297(5):499-508
30. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, Crowe T, Howard G, Cooper CJ, Brodie B, Grines CL, DeMaria AN; REVERSAL Investigators. **Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2004 Mar 3;291(9):1071-80
31. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM. **Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes.** *N Engl J Med* 2004 Apr 8;350(15):1495-504
32. LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, Shear C, Barter P, Fruchart JC, Gotto AM, Greten H, Kastelein JJ, Shepherd J, Wenger NK. **Treating to New Targets**

- (TNT) Investigators. **Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease.** *N Engl J Med* 2005 Apr 7;352(14):1425-35
33. Smilde TJ, van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. **Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial.** *Lancet* 2001 Feb 24;357(9256):577-81
34. Alonso R, Fernández de Bobadilla J, Méndez I, Lázaro P, Mata N, Mata P. **Cost-effectiveness of managing familial hypercholesterolemia using atorvastatin-based preventive therapy.** *Rev Esp Cardiol* 2008 Apr;61(4):382-93
35. Hollman G, Gullberg M, Ek AC, Eriksson M, Olsson AG. **Quality of life in patients with familial hypercholesterolaemia.** *J Intern Med* 2002 Apr;251(4):331-7
36. Hollman G, Olsson AG, Ek AC. **Familial hypercholesterolaemia and quality of life in family members.** *Prev Med* 2003 May;36(5):569-74
37. Hyttinen L, Kekäläinen P, Vuorio AF, Sintonen H, Strandberg TE. **Health-related quality of life in elderly patients with familial hypercholesterolemia.** *Int J Technol Assess Health Care* 2008;24(2):228-34
38. Freedman DS, Shear CL, Srinivasan SR, Webber LS, Berenson GS. **Tracking of serum lipids and lipoproteins in children over an 8 year period: the Bogalusa heart study.** *Prev Med* 1985; 103: 687-691
39. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) research group. **Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and Young Adults.** *JAMA* 1999; 281:727-735

40. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao WB, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA for the Bogalusa Heart Study. **Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults.** *N Engl J Med* 1998;338:1650-1656
41. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. **Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level.** *J Clin Invest* 1994;93(1):50-5
42. de Jongh S, Lilien MR, Bakker HD, Hutten BA, Kastelein JJ, Stroes ES. **Family history of cardiovascular events and endothelial dysfunction in children with familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 2002;163(1):193-7
43. Wiegman A, de Groot E, Hutten BA, Rodenburg J, Gort J, Bakker HD, Sijbrands EJ, Kastelein JJ. **Arterial intima-media thickness in children heterozygous for familial hypercholesterolemia.** *Lancet* 2004;363(9406):369-70
44. Pauciuolo P, Iannuzzi A, Sartorio R, Irace C, Covetti G, Di Costanzo A, Rubba P. **Increased intima-media thickness of the common carotid artery in hypercholesterolemic children.** *Arterioscler Thromb* 1994;14(7):1075-9
45. Tonstad S, Joakimson O, Stensland-Bugge E, et al. **Risk factors related to intima-media thickness in children with familial hypercholesterolemia and control subjects.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:984-991
46. Järvisalo MJ, Jartti L, Nääntö-Salonen K, Irjala K, Rönkämaa T, Hartiala JJ, Celermajer DS, Raitakari OT. **Increased aortic intima-media thickness: a marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children.** *Circulation* 2001;104(24):2943-7
47. Kolansky DM, Cuchel M, Clark BJ, Paridon S, McCrindle BW, Wiegers SE, Araujo L, Vohra Y, Defesche JC, Wilson JM, Rader DJ. **Longitudinal**

- evaluation and assessment of cardiovascular disease in patients with homozygous familial hypercholesterolemia.** *Am J Cardiol.* 2008 Dec 1;102(11):1438-43
48. Mouratidis B, Vaughan-Neil EF, Gilday DL, Ash JM, Cullen-Dean G, McIntyre S, MacMillan JH, Rose V. **Detection of silent coronary artery disease in adolescents and young adults with familial hypercholesterolemia by single-photon emission computed tomography thallium-201 scanning.** *Am J Cardiol* 1992;70(13):1109-12
49. Nicholls DP. **Familial hypercholesterolaemia in children.** *Br J Cardiol* 2006;13:191-4
50. Stein EA, Illingworth DR, Kwiterovich PO Jr, Liacouras CA, Siimes MA, Jacobson MS, Brewster TG, Hopkins P, Davidson M, Graham K, Arensman F, Knopp RH, DuJovne C, Williams CL, Isaacsohn JL, Jacobsen CA, Laskarzewski PM, Ames S, Gormley GJ. **Efficacy and safety of lovastatin in adolescent males with heterozygous familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial.** *JAMA* 1999;281(2):137-44
51. Wiegman A, Hutten BA, de Groot E, Rodenburg J, Bakker HD, Büller HR, Sijbrands EJ, Kastelein JJ. **Efficacy and safety of statin therapy in children with familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2004;292(3):331-7
52. Avis HJ, Vissers MN, Stein EA, Wijburg FA, Trip MD, Kastelein JJ, Hutten BA. **A systematic review and meta-analysis of statin therapy in children with familial hypercholesterolemia.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(8):1803-10
53. Kavey RE, Allada V, Daniels SR, Hayman LL, McCrindle BW, Newburger JW, Parekh RS, Steinberger J; American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science; American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young; American Heart Association Council on



Epidemiology and Prevention; American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism; American Heart Association Council on High Blood Pressure Research; American Heart Association Council on Cardiovascular Nursing; American Heart Association Council on the Kidney in Heart Disease; Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research. **Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric patients: a scientific statement from the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science; the Councils on Cardiovascular Disease in the Young, Epidemiology and Prevention, Nutrition, Physical Activity and Metabolism, High Blood Pressure Research, Cardiovascular Nursing, and the Kidney in Heart Disease; and the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics.** *Circulation* 2006;114(24):2710-38

54. Emery J, Barlow-Stewart K, Metcalfe SA, Sullivan D. **Genetics and preventive health care.** *Aust Fam Physician.* 2007 Oct;36(10):808-11
55. Bhatnagar D. **Diagnosis and screening for familial hypercholesterolaemia: finding the patients, finding the genes.** *Ann Clin Biochem.* 2006 Nov;43(Pt 6):441-56
56. Marks D, Thorogood M, Neil HA, Humphries SE. **A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 2003;168:1-14
57. Fouchier SW, Rodenburg J, Defesche JC, Kastelein JJ. **Management of hereditary dyslipidemia; the paradigm of autosomal dominant hypercholesterolaemia.** *Eur J Hum Genet.* 2005 Dec;13(12):1247-53
58. Yamashita S, Hbujo H, Arai H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y. **Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events: a cohort study of patients with heterozygous familial**

- hypercholesterolemia in Japan.** *J Atheroscler Thromb.* 2008 Dec;15(6):292-303
59. Pitsavos C, Skoumas I, Tousoulis D, Metalinos G, Masoura C, Chrysohoou C, Papadimitriou L, Giotsas N, Toutouza M, Antoniadis C, Stefanadis C. **The impact of ezetimibe and high-dose of statin treatment on LDL levels in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Int J Cardiol.* 2008 Mar 17; **[Epub ahead of print]**
60. Meuwese MC, Mooij HL, Nieuwdorp M, van Lith B, Marck R, Vink H, Kastelein JJ, Stroes ES. **Partial recovery of the endothelial glycocalyx upon rosuvastatin therapy in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Lipid Res.* 2008 Aug 11; **[Epub ahead of print]**
61. Tsouli SG, Kiortsis DN, Argyropoulou MI, Mikhailidis DP, Elisaf MS. **Pathogenesis, detection and treatment of Achilles tendon xanthomas.** *Eur J Clin Invest.* 2005 Apr;35(4):236-44
62. Kruth HS. **Lipid deposition in human tendon xanthoma.** *Am J Pathol* 1985;121:311-315
63. Moghadasian MH. **Cerebrotendinous xanthomatosis: clinical course, genotypes and metabolic backgrounds.** *Clin Invest Med* 2004;27:42-50
64. Mahley R, Huang Y, Rall S. **Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): questions, quandaries, and paradoxes.** *J Lipid Res.* 1999;40:1933-1949
65. Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, et al. **Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption.** *Nat Genet* 2001;27:79-83

66. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. **Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters.** *Science* 2000;290:1771-1775
67. Kaplan MM, Gershwin ME. **Primary biliary cirrhosis.** *N Engl J Med* 2005;353:1261-1273
68. Yuzawa K, Yamakawa K, Tohno E, Seki M, Akisada M, Yanagi H, et al. **An ultrasonographic method for detection of Achilles tendon xanthomas in familial hipercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 1989;75:211-218
69. Steinmetz A, Schmitt W, Schuler P, Kleinsorge F, Schenider J, Kaffarnik H. **Ultrasonography of Achilles tendons in primary hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 1988;74:231-239
70. Ebeling T, Fain P, Pyorala K. **Ultrasonography in the detection of Achilles tendon xanthomata in heterozygous familial hipercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 1992;97:217-228
71. Koivunen-Niemela T, Alanen A, Viikari J. **Sonography of the Achilles tendon in hypercholesterolemia.** *J Int Med* 1993;234:401-405
72. Bureau NJ, Roederer G. **Sonography of Achilles tendon xanthomas in patients with heterozygous familial hipercholesterolemia.** *Am J Roentgenol* 1998;171:745-749
73. Descamps O, Leysen X, Van Leuven F, Heller F. **The use of Achilles tendon ultrasonography for the diagnosis of familial hipercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 2001;157:514-518
74. Ferrieres J, Lambert J, Lussier-Cacan S, Davignon J. **Coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia patients with the same LDL receptor gene mutation.** *Circulation* 1995;92:290-295

75. Defesche J. **Familial Hypercholesterolemia.** In: **Betteridge J, editor.** *Lipids and Vascular disease.* London: Martin Dunitz, 2000;6:65-76
76. Neil HA, Huxley RR, Hawkins MM, Durrington PN, Betteridge DJ, Humphries SE. **Comparison of the risk of fatal coronary heart disease in treated xanthomatous and non-xanthomatous heterozygous familial hypercholesterolemia: a prospective registry study.** *Atherosclerosis* 2003;170:73-8
77. Fernández A, Sorokin A, Thompson PD. **Corneal arcus as coronary artery disease risk factor.** *Atherosclerosis* 2007, 193(2):235-240
78. Chua BE, Mitchell P, Wang JJ, Rochtchina E. **Corneal arcus and hyperlipidemia: findings from an older population.** *Am J Ophthalmol.* 2004 Feb;137(2):363-5
79. Zech LA Jr, Hoeg JM. **Correlating corneal arcus with atherosclerosis in familial hypercholesterolemia.** *Lipids Health Dis.* 2008 Mar 10;7(1):7
80. Babiak J, Rudel LL. **Lipoproteins and atherosclerosis.** *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1987;1:515-50
81. **Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).** *Lancet* 1994;344:1383-9
82. Sheperd J. **Preventing coronary artery disease in the West of Scotland: implications for primary prevention.** *Am J Cardiol* 1998;82:57T-59T
83. Graham CA, McClean E, Ward AJM, Beattie ED, Martin S, O'Kane M, Young IS, Nicholls DP. **Mutation screening and genotype-phenotype correlation in familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 1999;147:309-316

84. Alrasadi K, Alwaili K, Awan Z, Valenti D, Couture P, Genest J. **Aortic calcifications in familial hypercholesterolemia: potential role of the low-density lipoprotein receptor gene.** *Am Heart J.* 2009 Jan;157(1):170-6
85. Moorjani S, Roy M, Torres A, Bétard C, Gagné C, Lambert M, Brun D, Davignon J, Lupien P. **Mutations of low density lipoprotein receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolemia.** *Lancet* 1993;341:1303-1306
86. Vohl M-C, Gaudet D, Moorjani S, Tremblay G, Perron P, Gagné C, Lesiege D, Bergeron J, Lupien PJ, Després J-P. **Comparison of the effect of two low density lipoprotein receptor class mutations on coronary heart disease among French-Canadian patients heterozygous for familial hypercholesterolemia.** *Eur J Clin Invest* 1997;27:366-373
87. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, Pes G, Postiglione A, Stefanutti C, Blotta I, Pisciotta L, Rolleri M, Langheim S, Ghisellini M, Rabbone I, Calandra S. **Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype.** *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2000;20:E41-E52
88. Koeijvoets KC, Wiegman A, Rodenburg J, Defesche JC, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. **Effect of low-density lipoprotein receptor mutation on lipoproteins and cardiovascular disease risk: a parent-offspring study.** *Atherosclerosis* 2005;180:93-99
89. Umans-Eckenhausen MA, Sijbrands EJ, Kastelein JJ, Defesche JC. **Low-density lipoprotein receptor gene mutations and cardiovascular risk in a large genetic cascade screening population.** *Circulation* 2002;106:3031-3036
90. Souverein OW, Defesche JC, Zwinderman AH, Kastelein JJ, Tanck MW. **Influence of LDL-receptor mutation type on age at first cardiovascular**

- event in patients with familial hypercholesterolemia.** *Eur Heart J* 2007;28:299-304
91. Alonso R, Mata N, Castillo S, Fuentes F, Saenz P, Muñiz O, Galiana J, Figueras R, Diaz JL, Gomez-Enterría P, Mauri M, Piedecausa M, Irigoyen L, Aguado R, Mata P. **Cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: Influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors.** *Atherosclerosis* 2008;200(2):315-21
92. Kajinami K, Mabuchi H, Koizumi J, Takeda R. **Serum apolipoproteins in heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Clin Chim Acta* 1992;211:93-9
93. Gardner CD, Fortmann SP, and Krauss RM. **Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women.** *JAMA* 1996;276:875-881
94. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, and Després JP. **Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Québec Cardiovascular Study.** *Circulation* 1997;95:69-75
95. Koba S, Hirano T, Yoshino G, Sakai K, Sakaue T, Adachi M, and Katagiri T. **Remarkably high prevalence of small dense low-density lipoprotein in Japanese men with coronary artery disease, irrespective of the presence of diabetes.** *Atherosclerosis* 2002;160:249-256
96. Tsuyoshi Nozue, Ichiro Michishita, Yasuki Ito, and Tsutomu Hirano. **Effects of statin on small dense low-density lipoprotein cholesterol and remnant-like particle cholesterol in heterozygous familial hypercholesterolemia.** *J Atheroscl Thromb* 2008;15:146-153
97. Hogue JC, Lamarche B, Gaudet D, Tremblay AJ, Després JP, Gagné C, and Couture P. **Genotype of the mutant LDL receptor allele is associated with**

- LDL particle size heterogeneity in familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 2006;184:163-170
98. Fisher WR, Zech LA, Stacpoole PW. **ApoB metabolism in familial hypercholesterolemia. Inconsistencies with the LDL receptor paradigm.** *Arterioscl Thromb* 1994;14:501-10
99. Barrett PHR, Watts GF. **Shifting the LDL-receptor paradigm in familial hipercolesterolemia: novel insights from recent kinetic studies of apolipoprotein B-100 metabolism.** *Atherosclerosis suppl* 2002;2:1-4
100. Rothblat GH, Phillips MC. **Cholesterol efflux: mechanism and regulation.** *Adv Exp Med Biol* 1986;201:195-204
101. Oram JF, Yokoyama S. **Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids.** *J Lipid Res* 1996;37:2473-2491
102. Fielding CJ, Fielding PE. **Molecular physiology of reverse cholesterol transport.** *J Lipid Res* 1995;36:211-228
103. Von Eckardstein A, Nofer J, Assmann G. **High density lipoproteins and atherosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport.** *Atheroscler Vasc Biol* 2001;21:13-27
104. Toth P. **High-density lipoprotein and cardiovascular risk.** *Circulation* 2004;109:1809-12
105. Idzior-Walus B, Walus M, Foltyn A. **High density lipoproteins and atherosclerosis.** *Przegl Lek* 2004;61:1433-5
106. Miller G, Miller N. **Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease.** *Lancet* 1975;1(7897):16

107. Gordon D, Rifkind B. **High-density lipoprotein-the clinical implications of recent studies.** *N Engl J Med* 1989;321(19):1311
108. Wilson P, Abbott R, Castelli W. **High density lipoprotein cholesterol and mortality: the Framingham heart study.** *Arteriosclerosis* 1988;8(6):737
109. Haffner S, Applebaum-Bowden D, Wahl P, et al. **Epidemiological correlates of high density lipoprotein subfractions, apolipoprotein A-I, A-II, and D, and lecithin cholesterol acyltransferase. Effects of smoking, alcohol, and adiposity.** *Arteriosclerosis* 1985;5(2):169
110. Krauss R. **Regulation of high-density lipoprotein levels.** *Med Clin N Am* 1982;66(2):403
111. Reymer P, Gagne E, Groenemeyer B, et al. **A lipoprotein lipase mutation (Asn291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis.** *Nat Gen* 1995;10(1):28
112. Brown M, Inazu A, Hesler C, et al. **Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in family with increased high density lipoproteins.** *Nature* 1989;342(6248):448
113. Norum R, Lakier J, Goldstein S, et al. **Family deficiency of apolipoprotein A-I and C-III and precocious coronary-artery disease.** *N Engl J Med* 1982;306(25):1513
114. Frenais R, Ouguerram K, Maugeais C, et al. **Apolipoprotein A-I kinetics in heterozygous familial hypercholesterolemia: a stable isotope study.** *J Lipid Res* 1999;40:1506-11
115. Moriguchi EH, Tamachi H, Goto Y. **Hepatic lipase activity and high density lipoproteins in familial hipercholesterolemia: adaptational mechanisms for LDL-receptor deficient state.** *Tokai J Exp Clin Med* 1990;15:401-6



116. Hoogerbrugge-vd LN, de Rooy FW, Jansen H, van Blankenstein M. **Effect of pravastatin on biliary lipid composition and bile acid synthesis in familial hypercholesterolaemia.** *Gut* 1990;31:348-50
117. Tanno N, Oikawa S, Koizumi M, et al. **Biliary lipid composition in heterozygous familial hipercholesterolemia and influence of treatment with probucol.** *Dig Dis Sci* 1994;39:1586-91
118. Barter PJ and Rye KA. **High density lipoproteins and coronary heart disease.** *Atherosclerosis* 1996;121:1-12
119. Hokanson JE and Austin MA. **Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol levels: a meta-analysis of population-based prospective studies.** *J Cardiovasc Risk* 1996;3:213-219
120. Criqui MH, Heiss G, Cohn R, Cowan LD, Suchindran CM, Bangdiwala S, Kritchewsky S, Jacobs DR Jr., O'Grady HK, and Davis CE. **Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease.** *N Engl J Med* 1993;328:1220-1225
121. McNamara JR, Shah PK, Nakajima K, Cupples LA, Wilson PW, Ordovas JM, and Schaefer EJ. **Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study.** *Atherosclerosis* 2001;154:229-236
122. Masuoka H, Kamei S, Ozaki M, Kawasaki A, Shintani U, Ito M, and Nakano T. **Predictive value of remnant-like particle cholesterol as an indicator of coronary artery stenosis in patients with normal serum triglyceride levels.** *Intern Med* 2000;39:540-546
123. Masuoka H, Kamei S, Wagayama H, Ozaki M, Kawasaki A, Tanaka T, Kitamura M, Katoh S, Shintani U, Misaki M, Sugawa M, Ito M, and Nakano T.

- Association of remnant-like particle cholesterol with coronary artery disease in patients with normal total cholesterol levels.** *Am Heart J* 2000;139:305-310
124. Watts GF. **Postprandial lipaemia in familial hypercholesterolaemia: clinical and metabolic significance.** *Atherosclerosis* 2000;148:426-428
125. Hirano T, Ito Y, Koba S, Toyoda M, Ikejiri A, Saegusa H, Yamazaki J, AND Yoshino G. **Clinical significance of small dense low-density lipoprotein cholesterol levels determined by the simple precipitation method.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:558-563
126. Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, Blanche PJ, Holl LG, Sacks FM, and Hennekens CH. **A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction.** *JAMA* 1996;276:882-888
127. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Pilatis ND, Iraklianos S, Hoursalas IS, Liberi S, Pavlidis AN, Dritsas A, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. **Heterozygote men with familial hypercholesterolaemia may have an abnormal triglyceride response post-prandially. Evidence for another predictor of vascular risk in familial hypercholesterolaemia.** *Int J Clin Pract* 2005;59(3):311-7
128. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Pilatis ND, Giannopoulou M, Hoursalas IS, Pavlidis AN, Adamopoulou E, Valaora AI, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. **The influence of natural menopause on postprandial lipemia in heterozygotes for familial hypercholesterolemia.** *J Womens Health (Larchmt)* 2004;13(10):1119-26
129. Hogue JC, Lamarche B, Gaudet D, Larivière M, Tremblay AJ, Bergeron J, Lemieux I, Després JP, Gagné C, and Couture P. **Relationship between cholesteryl ester transfer protein and LDL heterogeneity in familial hypercholesterolemia.** *J Lipid Res* 2004;45:1077-1083

130. Craig W, Neveux M, Palomaki G, Cleveland M, Haddow J. **Lipoprotein(a) as a risk factor for ischemic heart disease: metaanalysis of prospective studies.** *Clin Chem* 1998;44:2301-2306
131. Danesh J, Collins Rory, Peto Richard. **Lipoprotein(a) and coronary heart disease meta-analysis of prospective studies.** *Circulation* 2000;102:1082-1085
132. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Jenner JL, Mc Namara JR, Ordovas JM, Davis CE, et al. **Lipoprotein (a) levels and risk of coronary heart disease in men. The lipid research clinics coronary primary prevention trial.** *JAMA* 1994;271:999-1003
133. Bostom A, Gagnon D, Cupples A, Wilson P, Jenner J, Ordovas J, et al. **Prospective investigation of elevated lipoprotein (a) detected by electrophoresis and cardiovascular disease in omen. The Framingham Heart Study.** *Circulation* 1994;90:1688-1699
134. Lingenhel A, Kraft HG, Kotze M, Peeters AV, Kronenberg F, Kruse R, Utermann G. **Concentrations of the atherogenic Lp(a) are elevated in FH.** *Eur J Hum Genet* 1998 Jan;6(1):50-60
135. Seed M, Hoppichler F, Reaveley D, et al. **Relation of serum lipoprotein(a) concentration and apolipoprotein(a) phenotype to coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia.** *N Engl J Med* 1990;322:1494-9
136. Carmena R, Lussier-Cacan S, Roy M, Minnich A, Lingenhel A, Kronenberg F, Davignon J. **Lp(a) levels and atherosclerotic vascular disease in a sample of patients with familial hypercholesterolemia sharing the same gene defect.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Jan;16(1):129-36

137. Real JT, Romero G, Priego MA, Chaves FJ, Ascaso JF, Carmena R. **Familial hypercholesterolemia and plasma Lp(a) levels: 2 cardiovascular risk factors.** *An Med Interna* 1999 Feb;16(2):69-72
138. Dirisamer A, Widhalm H, Aldover-Macasaet E, Molzer S, Widhalm K. **Elevated Lp(a) with a small apo(a) isoform in children: risk factor for the development of premature coronary artery disease.** *Acta Paediatr.* 2008 Aug 5. [Epub ahead of print]
139. Witzum JL. **The oxidation hypothesis of atherosclerosis.** *Lancet* 1994; 344: 793-795
140. Ross R, Fuster V. **La patogenia de la aterosclerosis. En: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editores. Aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica S. A.; 1997. 489-508**
141. Berliner J, Heinecke J. **The role of oxidized lipoproteins in the atherogenesis.** *Free Radic Biol Med.* 1996;20:700-27
142. Gens Y-J, Kodama T, Hansson G. **Differential expressions of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation.** *Arterioscler Thromb* 1994;14:798-806
143. Masakata Sata and Kenneth Walsh. **Oxidized LDL activates Fas-mediated Endothelial Cell Apoptosis.** *J Clin Invest* 1998. 102: 1682-9
144. Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM. **Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1-gene expression in human vascular endothelial cells.** *J Clin Invest* 1995; 95 (3): 1262-1270
145. Vega de Céniga M. **Participación de las lipoproteínas de baja densidad oxidada en el desarrollo de placa aterosclerótica.** *Angiología* 2006;58:51-6

146. Miranova M, Virilla G, López-Virella MF. **Isolation and characterization of human antioxidized LDL autoantibodies.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:222-229
147. Vonde Vijer LP, Kardinaal AF, van Duyvenvoorde W, et al. **LDL oxidation and extent of coronary atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:93-99
148. Tsimikas S, Witztum JL. **Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk.** *Circulation* 2001;103:1930-2
149. Holvoet P, Collen D, Van de Werf F. **Malondialdehyde-modified LDL as a marker of acute coronary syndromes.** *JAMA* 1999;281:1718-21
150. Sotirios Tsimikas, M.D., Emmanouil S. Brilakis, M.D., Elizabeth R. Miller, B.S., Joseph. McConnell, Ph. D., Ryan J. Lennon, M.S., Kenneth S. Kornman, Ph.D., Joseph L. Witztum, M.D., and PeterB. Berger, M.D. **Oxidized Phospholipids, Lp(a) Lipoprotein, and Coronary Artery Disease.** *N Engl J Med* 2005;353:46-57
151. Van Tits L, De Graaf J, Hak-Lemmers H, Bredie S, Demacker P, Holvoet P, Stalenhoef A. **Increased levels of low-density lipoprotein oxidation in patients with familial hypercholesterolemia and in end-stage renal disease patients on hemodialysis.** *Lab Invest.* 2003 Jan;83(1):13-21
152. Tsouli SG, Kiortsis DN, Lourida ES, Xydis V, Tsironis LD, Argyropoulou MI, Elisaf M, Tselepis AD. **Autoantibody titers against OxLDL are correlated with Achilles tendon thickness in patients with familial hypercholesterolemia.** *J Lipid Res.* 2006 Oct;47(10):2208-14
153. Napoli C, Postiglione A, Triggiani M, Corso G, Palumbo G, Carbone V, Ruocco A, Ambrosio G, Montefusco S, Malorni A, Condorelli M, Chiariello M. **Oxidative structural modifications of low density lipoprotein in**

- homozygous familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis* 1995  
Dec;118(2):259-73
154. Williams R, Hunt S, Schumacher C, et al. **Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics.** *Am J Cardiol* 1993;72:171-176
155. WHO. **Human Genetic Program. Familial Hypercholesterolemia, report of a WHO consultation. WHO/HGN/FH/CONS/98.7** París, October 1997
156. Marks D, Wonderling D, Thorogood M, Lambert H, Humphries E, Neil AW. **Cost effectiveness analysis of different approaches of screening for familial hypercholesterolemia.** *BMJ* 2002;324:1303-1308
157. Hill JS, Hayden MR, Frohlich J, Pritchard PH. **Genetic and environmental factors affecting the incidence of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Arterioscler Thromb* 1991 Mar-Apr;11(2):290-7
158. Thompson GR, Seed M, Niththyananthan S, McCarthy S, Thorogood M. **Genotypic and phenotypic variation in familial hypercholesterolemia.** *Arteriosclerosis* 1989 Jan-Feb;9(1 Suppl):I75-80
159. Sijbrands EJ, Westendorp RG, Defesche JC, de Meier PH, Smelt AH, Kastelein JJ. **Mortality over two centuries in large pedigree with familial hypercholesterolaemia: family tree mortality study.** *BMJ* 2001 Apr 28;322(7293):1019-23
160. Jansen AC, van Aalst-Cohen ES, Tanck MW, Cheng S, Fontecha MR, Li J, Defesche JC, Kastelein JJ. **Genetic determinants of cardiovascular disease risk in familial hypercholesterolemia.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Jul;25(7):1475-81

161. Pimstone SN, Sun XM, du Souich C, Frohlich JJ, Hayden MR, Soutar AK. **Phenotypic variation in heterozygous familial hypercholesterolemia: a comparison of Chinese patients with the same or similar mutations in the LDL receptor gene in China or Canada.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 Feb;18(2):309-15
162. Jansen AC, van Aalst-Cohen ES, Tanck MW, Trip MD, Lansberg PJ, Liem AH, van Lennep HW, Sijbrands EJ, Kastelein JJ. **The contribution of classical risk factors to cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: data in 2400 patients.** *J Intern Med* 2004 Dec;256(6):482-90
163. **Executive Summary of The 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).** *JAMA* 2001;285:2486-2497
164. Villéger L, Abifadel M, Allard D, Rabès JP, Thiart R, Kotze MJ, Bérout C, Junien C, Boileau C, Varret M. **The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database.** *Hum Mutat* 2002 Aug;20(2):81-7
165. Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jiménez E, López M, Tejedor MT, Artieda M, Alonso R, Mata P, Simón L, Martínez A, Pocoví M; Spanish FH Group. **Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia.** *Clin Chem* 2005 Jul;51(7):1137-44
166. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. **Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review.** *Am J Epidemiol* 2004 Sep 1;160(5):407-20

167. Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, Verhagen A, Rivera CR, Mulvihill SJ, Malloy MJ, Kane JP. **Human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype.** *J Clin Invest* 2002 Jul;110(1):109-17
168. Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM, Friedl W, Davignon J, McCarthy BJ. **Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia.** *J Lipid Res* 1990 Aug;31(8):1337-49
169. Myant NB. **Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia.** *Atherosclerosis* 1993 Dec;104(1-2):1-18
170. Varret M, Rabès JP, Saint-Jore B, Cenarro A, Marinoni JC, Civeira F, Devillers M, Krempf M, Coulon M, Thiart R, Kotze MJ, Schmidt H, Buzzi JC, Kostner GM, Bertolini S, Pocovi M, Rosa A, Farnier M, Martinez M, Junien C, Boileau C. **A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32.** *Am J Hum Genet* 1999 May;64(5):1378-87
171. Hunt SC, Hopkins PN, Bulka K, McDermott MT, Thorne TL, Wardell BB, Bowen BR, Ballinger DG, Skolnick MH, Samuels ME. **Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Apr;20(4):1089-93
172. Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. **Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia.** *Nat Genet* 2003 Jun;34(2):154-6



173. Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, Calandra S, Bertolini S, Cossu F, Grishin N, Barnes R, Cohen JC, Hobbs HH. **Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein.** *Science* 2001 May 18;292(5520):1394-8
174. Südhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. **The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins.** *Science* 1985 May 17;228(4701):815-22
175. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW. **The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA.** *Cell* 1984 Nov;39(1):27-38
176. Arias-Moreno X, Velazquez-Campoy A, Rodríguez JC, Pocoví M, Sancho J. **Mechanism of low density lipoprotein (LDL) release in the endosome: implications of the stability and Ca<sup>2+</sup> affinity of the fifth binding module of the LDL receptor.** *J Biol Chem* 2008 Aug 15;283(33):22670-9
177. Koeijvoets KC, Rodenburg J, Hutten BA, Wiegman A, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. **Low-density lipoprotein receptor genotype and response to pravastatin in children with familial hypercholesterolemia: substudy of an intima-media thickness trial.** *Circulation* 2005 Nov 15;112(20):3168-73
178. Gaudet D, Vohl MC, Couture P, Moorjani S, Tremblay G, Perron P, Gagné C, Després JP. **Contribution of receptor negative versus receptor defective mutations in the LDL-receptor gene to angiographically assessed coronary artery disease among young (25-49 years) versus middle-aged (50-64 years) men.** *Atherosclerosis* 1999 Mar;143(1):153-61
179. Damgaard D, Larsen ML, Nissen PH, Jensen JM, Jensen HK, Soerensen VR, Jensen LG, Faergeman O. **The relationship of molecular genetic to clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia in a Danish population.** *Atherosclerosis* 2005 May;180(1):155-60

180. Umans-Eckenhausen MA, Defesche JC, Sijbrands EJ, Scheerder RL, Kastelein JJ. **Review of first 5 years of screening for familial hypercholesterolaemia in the Netherlands.** *Lancet* 2001 Jan 20;357(9251):165-8
181. Graham CA, McIlhatton BP, Kirk CW, Beattie ED, Lyttle K, Hart P, Neely RD, Young IS, Nicholls DP. **Genetic screening protocol for familial hypercholesterolemia which includes splicing defects gives an improved mutation detection rate.** *Atherosclerosis* 2005 Oct;182(2):331-40
182. Leren TP. **Cascade genetic screening for familial hypercholesterolemia.** *Clin Genet* 2004 Dec;66(6):483-7
183. van Aalst-Cohen ES, Jansen AC, Tanck MW, Defesche JC, Trip MD, Lansberg PJ, Stalenhoef AF, Kastelein JJ. **Diagnosing familial hypercholesterolaemia: the relevance of genetic testing.** *Eur Heart J* 2006 Sep;27(18):2240-6
184. Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. **Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands.** *Hum Mutat* 2005 Dec;26(6):550-6
185. Civeira F, Ros E, Jarauta E, Plana N, Zambon D, Puzo J, Martinez de Esteban JP, Ferrando J, Zabala S, Almagro F, Gimeno JA, Masana L, Pocovi M. **Comparison of genetic versus clinical diagnosis in familial hypercholesterolemia.** *Am J Cardiol* 2008 Nov 1;102(9):1187-93
186. Blesa S, Garcia-Garcia AB, Martinez-Hervas S, Mansego ML, Gonzalez-Albert V, Ascaso JF, Carmena R, Real JT, Chaves FJ. **Analysis of sequence variations in the LDL receptor gene in Spain: general gene screening or search for specific alterations?.** *Clin Chem* 2006 Jun;52(6):1021-5

187. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. **Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans.** *J Lipid Res* 1993 Oct;34(10):1637-59
188. Ros E. **Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk.** *Atherosclerosis* 2000 Aug;151(2):357-79
189. Sudhop T, von Bergmann K. **Cholesterol absorption inhibitors for the treatment of hypercholesterolaemia.** *Drugs* 2002;62(16):2333-47
190. Turley SD, Dietschy JM. **Sterol absorption by the small intestine.** *Curr Opin Lipidol* 2003 Jun;14(3):233-40
191. Hui DY, Howles PN. **Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine.** *Semin Cell Dev Biol* 2005 Apr;16(2):183-92
192. Lammert F, Wang DQ. **New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption.** *Gastroenterology* 2005 Aug;129(2):718-34
193. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. **Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses.** *Prog Lipid Res* 2002 Nov;41(6):457-500
194. Thurnhofer H, Hauser H. **Uptake of cholesterol by small intestinal brush border membrane is protein-mediated.** *Biochemistry* 1990 Feb 27;29(8):2142-8
195. Compassi S, Werder M, Boffelli D, Weber FE, Hauser H, Schulthess G. **Cholesteryl ester absorption by small intestinal brush border membrane is protein-mediated.** *Biochemistry* 1995 Dec 19;34(50):16473-82
196. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesäniemi YA. **Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in**

- volunteers of a randomly selected male population.** *Am J Epidemiol* 1990 Jan;131(1):20-31
197. Schmitz G, Langmann T, Heimerl S. **Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism.** *J Lipid Res* 2001 Oct;42(10):1513-20
198. Hubacek JA, Berge KE, Cohen JC, Hobbs HH. **Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia.** *Hum Mutat* 2001 Oct;18(4):359-60
199. Heimer S, Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Dean M, Beil FU, von Bergmann K, Schmitz G. **Mutations in the human ATP-binding cassette transporters ABCG5 and ABCG8 in sitosterolemia.** *Hum Mutat* 2002 Aug;20(2):151
200. Stefková J, Poledne R, Hubáček JA. **ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases.** *Physiol Res* 2004;53(3):235-43
201. Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH. **Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface.** *J Clin Invest* 2002 Sep;110(5):659-69
202. Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH. **ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion.** *J Biol Chem* 2003 Nov 28;278(48):48275-82
203. Graf GA, Cohen JC, Hobbs HH. **Missense mutations in ABCG5 and ABCG8 disrupt heterodimerization and trafficking.** *J Biol Chem* 2004 Jun 4;279(23):24881-8

204. Oram JF, Vaughan AM. **ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease.** *Circ Res* 2006 Nov 10;99(10):1031-43
205. Lu K, Lee MH, Yu H, Zhou Y, Sandell SA, Salen G, Patel SB. **Molecular cloning, genomic organization, genetic variations, and characterization of murine sterolin genes Abcg5 and Abcg8.** *J Lipid Res* 2002 Apr;43(4):565-78
206. Wang DQ. **New concepts of mechanisms of intestinal cholesterol absorption.** *Ann Hepatol* 2003 Jul-Sep;2(3):113-21
207. Wilund KR, Yu L, Xu F, Hobbs HH, Cohen JC. **High-level expression of ABCG5 and ABCG8 attenuates diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Ldlr<sup>-/-</sup> mice.** *J Lipid Res* 2004 Aug;45(8):1429-36
208. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. **Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Dec 10;99(25):16237-42
209. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. **Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol.** *J Clin Invest* 2002 Sep;110(5):671-80
210. Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Hobbs HH, Cohen JC. **Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice.** *J Lipid Res* 2004 Feb;45(2):301-7
211. Yu L, Gupta S, Xu F, Liverman AD, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Repa JJ, Hobbs HH, Cohen JC. **Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion.** *J Biol Chem* 2005 Mar 11;280(10):8742-7

212. Langheim S, Yu L, von Bergmann K, Lütjohann D, Xu F, Hobbs HH, Cohen JC. **ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile.** *J Lipid Res* 2005 Aug;46(8):1732-8
213. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, et al. **Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease.** *Cell* 1993 Nov 5;75(3):451-62
214. Miettinen TA, Klett EL, Gylling H, Isoniemi H, Patel SB. **Liver transplantation in a patient with sitosterolemia and cirrhosis.** *Gastroenterology* 2006 Feb;130(2):542-7
215. Repa JJ, Dietschy JM, Turley SD. **Inhibition of cholesterol absorption by SCH 58053 in the mouse is not mediated via changes in the expression of mRNA for ABCA1, ABCG5, or ABCG8 in the enterocyte.** *J Lipid Res* 2002 Nov;43(11):1864-74
216. Tachibana S, Hirano M, Hirata T, Matsuo M, Ikeda I, Ueda K, Sato R. **Cholesterol and plant sterol efflux from cultured intestinal epithelial cells is mediated by ATP-binding cassette transporters.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2007 Aug;71(8):1886-95
217. Dawson PA, Rudel LL. **Intestinal cholesterol absorption.** *Curr Opin Lipidol* 1999 Aug;10(4):315-20
218. Kramer W, Girbig F, Corsiero D, Burger K, Fahrenholz F, Jung C, Müller G. **Intestinal cholesterol absorption: identification of different binding proteins for cholesterol and cholesterol absorption inhibitors in the enterocyte brush border membrane.** *Biochim Biophys Acta* 2003 Jul 4;1633(1):13-26

219. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. **Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption.** *Science* 2004 Feb 20;303(5661):1201-4
220. Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW. **Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis.** *J Biol Chem* 2004 Aug 6;279(32):33586-92
221. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. **Nuclear receptors and the control of metabolism.** *Annu Rev Physiol* 2003;65:261-311
222. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. **An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha.** *Nature* 1996 Oct 24;383(6602):728-31
223. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. **Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway.** *J Biol Chem* 1997 Feb 7;272(6):3137-40
224. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. **Identification of a nuclear receptor for bile acids.** *Science* 1999 May 21;284(5418):1362-5
225. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. **Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR.** *Mol Cell* 1999 May;3(5):543-53
226. Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. **Pharmacological activation of liver X**

- receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo.** *Circulation* 2006  
Jan 3;113(1):90-7
227. Calpe-Berdiel L, Rotllan N, Fiévet C, Roig R, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC. **Liver X receptor-mediated activation of reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo requires ABCG5/G8.** *J Lipid Res* 2008 Sep;49(9):1904-11
228. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. **The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:459-81
229. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. **Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha.** *Cell* 1998 May 29;93(5):693-704
230. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. **Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta.** *J Biol Chem* 2002 May 24;277(21):18793-800
231. Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. **Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism.** *J Biol Chem* 2001 Oct 12;276(41):37735-8
232. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. **Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers.** *Science* 2000 Sep 1;289(5484):1524-9
233. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. **ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Jun 29;101(26):9774-9



234. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. **LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jan 16;98(2):507-12
235. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. **Role of LXRs in control of lipogenesis.** *Genes Dev* 2000 Nov 15;14(22):2831-8
236. Luo Y, Tall AR. **Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element.** *J Clin Invest* 2000 Feb;105(4):513-20
237. Cao G, Liang Y, Broderick CL, Oldham BA, Beyer TP, Schmidt RJ, Zhang Y, Staybrook KR, Suen C, Otto KA, Miller AR, Dai J, Foxworthy P, Gao H, Ryan TP, Jiang XC, Burris TP, Eacho PI, Etgen GJ. **Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis.** *J Biol Chem* 2003 Jan 10;278(2):1131-6
238. Steffensen KR, Gustafsson JA. **Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR).** *Diabetes* 2004 Feb;53 Suppl 1:S36-42
239. Horton JD, Shimomura I. **Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis.** *Curr Opin Lipidol* 1999 Apr;10(2):143-50
240. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. **Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta.** *Genes Dev* 2000 Nov 15;14(22):2819-30
241. Salen G, Shefer S, Nguyen L, Ness GC, Tint GS, Shore V. **Sitosterolemia.** *J Lipid Res* 1992 Jul;33(7):945-55

242. Salen G, Patel S, Batta AK. **Sitosterolemia.** *Cardiovasc Drug Rev* 2002;20(4):255-70
243. Belamarich PF, Deckelbaum RJ, Starc TJ, Dobrin BE, Tint GS, Salen G. **Response to diet and cholestyramine in a patient with sitosterolemia.** *Pediatrics* 1990 Dec;86(6):977-81
244. Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE Jr. **Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry.** *J Lipid Res* 1999 Feb;40(2):302-8
245. McNamara DJ, Kolb R, Parker TS, Batwin H, Samuel P, Brown CD, Ahrens EH Jr. **Heterogeneity of cholesterol homeostasis in man. Response to changes in dietary fat quality and cholesterol quantity.** *J Clin Invest* 1987 Jun;79(6):1729-39
246. Jones PJ, Pappu AS, Hatcher L, Li ZC, Illingworth DR, Connor WE. **Dietary cholesterol feeding suppresses human cholesterol synthesis measured by deuterium incorporation and urinary mevalonic acid levels.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996 Oct;16(10):1222-8
247. Hopkins PN. **Effects of dietary cholesterol on serum cholesterol: a meta-analysis and review.** *Am J Clin Nutr* 1992 Jun;55(6):1060-70
248. Ye SQ, Kwiterovich PO Jr. **Influence of genetic polymorphisms on responsiveness to dietary fat and cholesterol.** *Am J Clin Nutr* 2000 Nov;72(5 Suppl):1275S-1284S
249. Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, Cohen JC. **Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8.** *J Lipid Res* 2002 Mar;43(3):486-94

250. Bloks VW, Bakker-Van Waarde WM, Verkade HJ, Kema IP, Wolters H, Vink E, Groen AK, Kuipers F. **Down-regulation of hepatic and intestinal Abcg5 and Abcg8 expression associated with altered sterol fluxes in rats with streptozotocin-induced diabetes.** *Diabetologia* 2004 Jan;47(1):104-12
251. Lally S, Tan CY, Owens D, Tomkin GH. **Messenger RNA levels of genes involved in dysregulation of postprandial lipoproteins in type 2 diabetes: the role of Niemann-Pick C1-like 1, ATP-binding cassette, transporters G5 and G8, and of microsomal triglyceride transfer protein.** *Diabetologia* 2006 May;49(5):1008-16
252. Hubáček JA, Berge KE, Stefková J, Pitha J, Skodová Z, Lánská V, Poledne R. **Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels.** *Physiol Res* 2004;53(4):395-401
253. Viturro E, de Oya M, Lasunción MA, Gorgojo L, Moreno JM, Benavente M, Cano B, Garces C. **Cholesterol and saturated fat intake determine the effect of polymorphisms at ABCG5/ABCG8 genes on lipid levels in children.** *Genet Med* 2006 Sep;8(9):594-9
254. Santosa S, Demonty I, Lichtenstein AH, Ordovas JM, Jones PJ. **Single nucleotide polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 are associated with changes in cholesterol metabolism during weight loss.** *J Lipid Res* 2007 Dec;48(12):2607-13
255. Kajinami K, Brousseau ME, Ordovas JM, Schaefer EJ. **Interactions between common genetic polymorphisms in ABCG5/G8 and CYP7A1 on LDL cholesterol-lowering response to atorvastatin.** *Atherosclerosis* 2004 Aug;175(2):287-93
256. Kajinami K, Brousseau ME, Nartsupha C, Ordovas JM, Schaefer EJ. **ATP binding cassette transporter G5 and G8 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin.** *J Lipid Res* 2004 Apr;45(4):653-6

257. Acalovschi M, Ciocan A, Mostean O, Tirziu S, Chiorean E, Keppeler H, Schirin-Sokhan R, Lammert F. **Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphisms? A preliminary study in siblings with gallstones.** *Eur J Intern Med* 2006 Nov;17(7):490-4
258. Wang Y, Jiang ZY, Fei J, Xin L, Cai Q, Jiang ZH, Zhu ZG, Han TQ, Zhang SD. **ATP binding cassette G8 T400K polymorphism may affect the risk of gallstone disease among Chinese males.** *Clin Chim Acta* 2007 Sep;384(1-2):80-5
259. Plat J, Bragt MC, Mensink RP. **Common sequence variations in ABCG8 are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers.** *J Lipid Res* 2005 Jan;46(1):68-75
260. Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamäki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, Rauramaa R, Miettinen TA. **Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity.** *J Lipid Res* 2004 Sep;45(9):1660-5
261. Weggemans RM, Zock PL, Tai ES, Ordovas JM, Molhuizen HO, Katan MB. **ATP binding cassette G5 C1950G polymorphism may affect blood cholesterol concentrations in humans.** *Clin Genet* 2002 Sep;62(3):226-9
262. Miwa K, Inazu A, Kobayashi J, Higashikata T, Nohara A, Kawashiri M, Katsuda S, Takata M, Koizumi J, Mabuchi H. **ATP-binding cassette transporter G8 M429V polymorphism as a novel genetic marker of higher cholesterol absorption in hypercholesterolaemic Japanese subjects.** *Clin Sci* 2005 Aug;109(2):183-8
263. Koeijvoets KC, van der Net JB, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Mensink RP, Kastelein JJ, Sijbrands EJ, Plat J. **ABCG8 gene polymorphisms, plasma cholesterol concentrations, and risk of cardiovascular disease in**

- familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2008 Sep 27. [Epub ahead of print]**
264. Junyent M, Tucker KL, Smith CE, Garcia-Rios A, Mattei J, Lai CQ, Parnell LD, Ordovas JM. **The effects of ABCG5/G8 polymorphisms on plasma HDL cholesterol concentrations depend on smoking habit in the Boston Puerto Rican health study. *J Lipid Res* 2008 Nov 12. [Epub ahead of print]**
265. Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. **Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003 May 2;278(18):15565-70**
266. Keil U, Liese AD, Hense HW, et al. **Classical risk factors and their impact on incident non-fatal and fatal myocardial infarction and all-cause mortality in southern Germany. Results from the MONICA Augsburg Cohort Study 1984–1992. *Eur Heart J* 1998;19:1197–1207**
267. Tunstall-Pedoe H. **WHO MONICA Project Principal Investigators. The World Health Organization MONICA project (monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. *J Clin Epidemiol* 1988;34:105–14**
268. Sixth report of Joint National Committee on Prevention. **Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VI). *Arch Intern Med* 1997;157:2413-46**
269. **American Diabetes Association Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of mellitus. *Diabetes Care* 1997; 4: 534-536**
270. Mata P, Alonso R, Castillo S, Pocovi M. **MEDPED and the Spanish familial hipercholesterolemia foundation. *Atherosclerosis* 2002;2(3):9-11**

271. Allain CC, Poon LS, Chang CS, Richmond W, Fu PC. **Enzymatic determination of total serum cholesterol.** *Clin Chem* 1974;20:470-5
272. Bucolo G, David H. **Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes.** *Clin Chem* 1973;19:476-82
273. Assmann G, Schierwer H, Schmitz G, Hägele E. **Quantification of high density lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid-MgCl<sub>2</sub>.** *Clin Chem* 1983;29:2026-30
274. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. **Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of a preparative ultracentrifuge.** *Clin Chem* 1972;18:499-502
275. Riepponen P, Marniemi J, Rautaoja T. **Immunoturbidimetric determination of apolipoproteins A-I and B in serum.** *Scand J Clin Lab Invest* 1987;47:739-44
276. Paniagua JA, Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Vida JM, Fuentes F, Fernandez de la Puebla RA and Perez-Jimenez F. **Oxidized-LDL levels are changed during short-term serum glucose variations and lowered with statin treatment in early Type 2 diabetes: a study of endothelial function and microalbuminuria.** *Diabet Med* 2005;22:1647-56
277. Marinescu VD, Kohane IS, and Riva A. **MAPPER: a search engine for the computational identification of putative transcription factor binding sites in multiple genomes.** *BMC Bioinformatics* 2005;6:79
278. Klett EL, Lee MH, Adams DB, Chavin KD, Patel SB. **Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine.** *BMC Gastroenterol* 2004;4:21

279. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. **Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis.** *Cell* 2000;102:731-44
280. Wang J, Einarsson C, Murphy C, Parini P, Björkhem I, Gafvels M, and Eggertsen G. **Studies on LXR-and FXR-mediated effects on cholesterol homeostasis in normal and cholic acid-depleted mice.** *J Lipid Res* 2006;47:421-430
281. Pérez-Martínez P, Gómez P, Paz E, Marín C, Gavián Moral E, López-Miranda J, Ordovas JM, Fernandez de la Puebla RA, Pérez-Jiménez F. **Interaction between smoking and the SstI polymorphism of the apo C-III gene determines plasma lipid response to diet.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2001;11(4):237-43
282. Zak I, Niemiec P, Balcerzyk A, Krauze J. **Combined "pro-atherosclerotic" variants of the ACE and APOE genes increase the risk of the coronary artery disease associated with the presence of cigarette smoking.** *Acta Cardiol.* 2008;63(6):741-7
283. Zak I, Sarecka-Hujar B, Krauze J. **Cigarette smoking, carrier state of A or G allele of 46A>G and 79C>G polymorphisms of beta2-adrenergic receptor gene, and the risk of coronary artery disease.** *Kardiol Pol.* 2008;66(4):380-6