

Memoria de Investigación

Relación entre los niveles de PCSK9 y las distintas mutaciones presentes en individuos con Hipercolesterolemia Familiar Heterocigota.

Relationship between PCSK9 levels and the different genetic mutations present in individuals with Heterozygous Familial Hypercholesterolemia.

Alumno: Alberto Díaz Cáceres

Línea de Investigación: Biomodulación nutricional y medicina de precisión.

Curso: 2021/2022

Tutores de Investigación: Francisco José Fuentes Jiménez, Oriol Alberto Rangel Zúñiga.

Palabras clave: Variantes genéticas, hipercolesterolemia familiar, PCSK9.



Máster en Nutrición Humana

Memoria de investigación titulada: "**Relación entre los niveles de PCSK9 y las distintas mutaciones presentes en individuos con Hipercolesterolemia Familiar Heterocigota.**" (*Relationship between PCSK9 levels and the different genetic mutations present in individuals with Heterozygous Familial Hypercholesterolemia.*) realizada por Alberto Díaz Cáceres.

Córdoba, 2 de Septiembre 2022.

Fdo. El alumno: Alberto Díaz Cáceres. Fdo. Tutor de Investigación: Francisco José Fuentes Jiménez, Oriol Alberto Rangel Zúñiga.



Abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
AF	Antecedentes Familiares	HTA	Hipertensión arterial
ApoB	Apolipoproteína B	LDL	Lipoproteína de baja densidad
ApoE	Apolipoproteína E	LDLR	Receptor de LDL
ANOVA	Análisis de la varianza	Lp(a)	Lipoproteína a
CI	Consentimiento informado	mg	Miligramo
CV	Cardiovascular	nm	Nanómetros
dL	Decilitro	p	Valor estadístico p
DM	Diabetes Mellitus	PCSK9	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9
ECV	Enfermedad cardiovascular		
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	SD	Desviación estándar
HF	Hipercolesterolemia Familiar	TC	Tomografía Computarizada
IMIBIC	Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba	TSH	Tirotropina
HDL	Lipoproteína de alta densidad	x	Media aritmética

Contenido

Abreviaturas	3
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción	7
Justificación	8
Objetivos.....	8
Material y métodos.....	9
Diseño:.....	9
Participantes:.....	9
Recogida de datos:.....	10
Análisis estadístico:.....	10
Resultados y Discusión.....	11
Discusión	18
Conclusiones	21
Posibles carencias del estudio	21
Propuestas	21
Bibliografía	22

Resumen

Antecedentes

La Hipercolesterolemia Familiar Heterocigota (HF) es un trastorno genético común a nivel mundial. Se produce por mutaciones en los genes LDLR, ApoB, ApoE y PCSK9. La importancia de la HF como problema de salud radica en la elevada incidencia de enfermedad coronaria prematura, por lo que es necesaria la búsqueda de biomarcadores que nos permitan individualizar el riesgo cardiovascular (CV) de estos pacientes.

Objetivos

Estudiar la relación entre los niveles de PCSK9 y las distintas mutaciones presentes en los individuos con HF, para identificar herramientas individualizadas enfocadas en disminuir el riesgo CV en pacientes con HF.

Métodos

Se trata de un estudio descriptivo transversal sobre una cohorte prospectiva de 403 pacientes con HF (cohorte SAFEHEART). Incluyó pacientes >18 años con HF y sus familiares, con datos antropométricos, bioquímicos y clínicos, así como su diagnóstico genético. Se determinaron los niveles de PCSK9 mediante ELISA. Posteriormente se analizó la relación entre los niveles de PCSK9 y las distintas mutaciones presentes en los pacientes con HF, así como la correlación con parámetros bioquímicos y lipídicos.

Resultados

Los individuos con mutación en el gen LDLR mostraron niveles de PCSK9 superiores a aquellos que no la portaban. Los pacientes con mutación en el gen ApoB mostraron niveles menores de PCSK9 que aquellos que no la portaban. Además, los niveles de PCSK9 se relacionaron de forma positiva con los niveles en LDL, colesterol total, glucemia y niveles séricos de ApoB.

Conclusión

El conocimiento de la relación entre las distintas mutaciones genéticas y el comportamiento de moléculas asociadas al desarrollo de enfermedad CV (PCSK9) permitiría predecir el riesgo CV de manera individualizada en pacientes con HF y optimizar su tratamiento farmacológico para disminuirlo.

Palabras clave: Variantes genéticas, hipercolesterolemia familiar, PCSK9.

Abstract

Background

Heterozygous Familial Hypercholesterolemia (HF) is a common genetic disorder worldwide. It is caused by mutations in the LDLR, ApoB, ApoE and PCSK9 genes. The importance of HF as a health problem lies in the high incidence of premature coronary disease. It is necessary to search biomarkers that allow us to individualize the cardiovascular (CV) risk of these patients.

Main objective

To study the relationship between PCSK9 levels and the different genetic mutations present in individuals with HF, in order to individualize their CV risk.

Methodology

This is a transversal descriptive study of a prospective cohort of 403 patients with HF (SAFEHEART cohort). It included patients >18 years of age with HF and their families. It also included anthropometric, biochemical and clinical data, as well as their genetic diagnosis. PCSK9 levels were determined by ELISA. Subsequently, the relationship between PCSK9 levels and the different mutations present in patients with HF was analyzed, as well as the correlation with biochemical and lipid parameters.

Results

Individuals with mutation in the LDLR gene showed higher levels of PCSK9 than those who did not carry it. Patients with mutation in the ApoB gene showed lower levels of PCSK9 than those who did not carry it. In addition, PCSK9 levels were positively correlated to LDL, total cholesterol, blood glucose, and serum ApoB levels.

Conclusion

Knowledge of the relationship between the different genetic mutations and the behavior of molecules associated with the development of CV disease (PCSK9) would be useful to determine CV risk individually in patients with HF, allowing us to optimize their pharmacological treatment.

Key words: Genetic variants, familial hypercholesterolemia, PCSK9.

Introducción

La Hipercolesterolemia Familiar Heterocigota (HF) es un trastorno genético común con una prevalencia estimada de 1 caso por cada 200-250 personas en los países occidentales (1). Se produce por mutaciones en el gen del receptor LDL (LDLR), en el gen de la apolipoproteína B (ApoB) o en el de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) y se transmite de forma autosómica dominante con penetrancia completa (2).

La importancia de la HF como problema de salud radica en la elevada incidencia de enfermedad coronaria prematura. Un estudio en población con HF utilizando coronariografía invasiva, mostró que la enfermedad aterosclerótica comienza a los 17 años en los varones y a los 25 años en las mujeres (3). El registro Simon Broome mostró un aumento significativo de la mortalidad en adultos jóvenes con HF y una disminución del riesgo relativo de morir después de 1992, año en que se introduce el tratamiento con estatinas (4). En el registro español de HF, el 55% de los varones y el 22% de las mujeres en la sexta década de la vida, han presentado manifestaciones de enfermedad coronaria (5). Por tanto, la HF se asocia con una disminución en la esperanza de vida de 20 a 30 años y una pérdida potencial de más de 2 millones de años de vida en España, a causa del desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV).

Las modificaciones en la alimentación y en el estilo de vida son los puntos de inicio en el tratamiento de los pacientes con HF, aunque es frecuente que se necesite tratamiento farmacológico para disminuir los niveles de LDL a niveles adecuados. Además es importante recordar el no consumo de tabaco, realizar ejercicio físico regularmente, mantener un peso saludable y controlar otros factores de riesgo cardiovascular (CV) (6). La piedra angular del tratamiento farmacológico son las estatinas, especialmente aquellas de alta potencia (7). Un estudio observacional en una cohorte de 1950 adultos con HF seguida durante más de 8 años encontró una disminución de 76% de eventos cardiovasculares en los tratados con estatinas respecto a los no tratados (8). Otros tratamientos farmacológicos incluyen la ezetimiba, los secuestradores de ácidos biliares, la niacina, la aféresis de lipoproteínas y los inhibidores de la PCSK9 (iPCSK9). Estos últimos se tratan de anticuerpos monoclonales humanos frente a la proteína PCSK9.

La proteína PCSK9 es una proteasa secretada en el hígado que se ha identificado como un regulador clave de los receptores de LDL (LDLR). PCSK9 se une directamente al factor de crecimiento epidérmico tipo A del LDLR, y promueve su degradación. Como consecuencia determina un aumento de los niveles de colesterol LDL en la circulación (9). Estudios previos demostraron que mutaciones en el gen PCSK9 condicionan una pérdida de función de dicha proteína sugiriendo que los sujetos portadores de las mismas mostrarán niveles reducidos de LDL y un descenso del riesgo de enfermedad cardiovascular entre un 80-90% (10). Finalmente, diversos trabajos han demostrado una relación positiva entre los niveles de PCSK9 plasmáticos y los niveles de colesterol total, LDL y apolipoproteína B (ApoB) (11,12).

Justificación

Este trabajo de fin de máster busca conocer la relación entre las mutaciones más frecuentes (LDLR, ApoB, ApoE y PCSK9) presentes en pacientes con hipercolesterolemia familiar con los niveles de PCSK9, dado que estos están directamente asociados con el riesgo de enfermedad arteriosclerótica y cardiovascular en los individuos. Todos los pacientes seleccionados pertenecen a un estudio prospectivo de seguimiento de una cohorte de familias con HF, con seguimiento anual a largo tiempo (13). Esto indica que es un estudio realizado sobre una cohorte de nuestro entorno, con suficientes sujetos para obtener un poder estadístico discriminatorio no presente en otros estudios y con parámetros con el potencial para ser trasladados a la práctica clínica diaria.

Objetivos

Objetivo general:

Estudiar la relación entre los niveles de PCSK9 y las distintas mutaciones presentes en los individuos con hipercolesterolemia familiar heterocigota, para identificar herramientas individualizadas enfocadas en disminuir el riesgo cardiovascular en pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigótica.

Objetivos específicos:

1. Determinar los niveles de PCSK9 mediante técnicas de inmunoensayo, en la cohorte de seguimiento constituida por pacientes con HF y sus familiares.

2. Analizar los niveles de PCSK9 en función de biomarcadores y parámetros clínicos asociados al riesgo de hipercolesterolemia (Test AGATSTON, IMC, parámetros lipídicos, glucemia, hábito tabáquico, tratamiento realizado)
3. Evaluar niveles de PCSK9 según la mutación en los genes LDLR, ApoB, ApoE y PCSK9.
4. Analizar la correlación entre los niveles de PCSK9 con otros parámetros clínicos y bioquímicos asociados al riesgo de enfermedad cardiovascular.

Material y métodos

Diseño:

Se trata de un estudio unicéntrico, de corte transversal anidado en una cohorte prospectiva. Se realizan dos tipos de análisis.

1. Estadística descriptiva de las características basales de la cohorte.
2. Estadística inferencial de asociación y correlación entre la variable principal del estudio (niveles plasmáticos de PCSK9) y presencia de las distintas mutaciones genéticas presentes en los participantes en el estudio, así como diversos parámetros bioquímicos plasmáticos, antropométricos y los tratamientos farmacológicos seguidos por tales individuos.

Participantes:

La población objeto del estudio incluye a 403 pacientes, mayores de 18 años, seleccionados de la cohorte SAFEHEART (www.safeheart/colesterolfamiliar.com, [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02693548), número NCT02693548).

Criterios de inclusión:

Para el objetivo principal se seleccionaron los pacientes según los siguientes criterios:

- Ser mayor de 18 años y estar incluidos en la cohorte SAFEHEART.
- Ausencia de enfermedad coronaria previa.
- Tener firmado el consentimiento informado (CI).

El estudio SAFEHEART comenzó en el año 2004 e incluye a casos índice con diagnóstico genético de hipercolesterolemia familiar (HF) y a sus familiares >15 años (con o sin HF). Todos los casos se han caracterizado molecularmente para HF mediante un ADN-chip2 que identifica mutaciones funcionales en el LDLR (alelo nulo, alelo

defectuoso), en el receptor de ApoB y en el gen de PCSK9. Es un registro nacional que incluye a los pacientes que viven en España y que padecen HF, independientemente de su nacionalidad de origen. El estudio SAFEHEART fue aprobado por el Comité ético de la Fundación Jiménez Díaz (FJD) y los casos incluidos han firmado un CI autorizando la obtención de muestras de sangre para aislar ADN, obtener plasma y suero para los estudios propuestos en el estudio y su seguimiento.

Recogida de datos:

Datos clínicos: En el presente estudio se utilizaron los datos clínicos registrados en la base del estudio SAFEHEART a los que se le añadieron los valores obtenidos para las determinaciones del presente proyecto (niveles de PCSK9). Para determinar la intensidad del tratamiento hipolipemiante, se utilizó la clasificación recogida en la guía europea de dislipemias de 2019 (14).

Muestras de sangre: Se utilizaron las muestras de plasma de cada uno de los pacientes participantes en el estudio SAFEHEART y que se encuentran conservadas y almacenadas a -80°C en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

Determinaciones de Niveles de PCSK9: La determinación de los niveles de PCSK9 se llevó a cabo mediante ELISA de alta sensibilidad. Se utilizó el kit ab209885-Human PCSK9 SimpleStep ELISA kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico:

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software informático SPSS (IBM, versión 25.0) y para la generación de figuras el software Microsoft Office Excel (versión 16.16.27).

Las variables continuas con distribución normal se muestran como la media \pm error estándar y se compararon entre los distintos grupos cualitativos mediante análisis de ANOVA de un factor. Las variables categóricas se describen utilizando porcentajes y para la comparación entre ellas se utilizaron test de Chi-cuadrado. Se llevaron a cabo análisis de correlaciones de Pearson evaluando el grado de correlación r^2 y la significación asintótica (valor p). En todos los casos se consideró como estadísticamente significativo valor $p < 0.05$.

Resultados y Discusión

Descripción de la cohorte.

En el presente estudio se incluyeron aquellos pacientes de la cohorte de los cuales contábamos con datos clínicos (sexo, edad, hábito tabáquico, valores antropométricos, antecedentes familiares de ECV, antecedentes personales de diabetes e hipertensión, tratamiento seguido, test de AGATSTON); mutaciones genéticas (LDLR, ApoB, ApoE, PCSK9); parámetros bioquímicos y lipídicos (glucemia, niveles séricos de colesterol total, triglicéridos, ApoA, ApoB, Lp(a), colesterol LDL y HDL) y las determinaciones de los niveles plasmáticos de PCSK9.

Tabla 1: Características cualitativas basales de la cohorte.								
	N	%	p		N	%	p	
Sexo	Hombres	191	47,4%	0,81	Mutación en LDLR	Sí	362 89,8%	<0,001
	Mujeres	209	51,8%			No	38 9,4%	
AF de eventos CV	Sí	138	34,2%	<0,001	Mutación en ApoB	Sí	34 8,4%	<0,001
	No	240	59,6%			No	366 90,8%	
AF de ictus	Sí	22	5,5%	<0,001	Mutación en ApoE	Sí	2 0,5%	<0,001
	No	378	93,8%			No	398 98,8%	
AF de Cardiopatía Isquémica	Sí	117	29%	<0,001	Mutación en PCSK9	Sí	3 0,8%	<0,001
	No	283	70,3%			No	397 98,5%	
AF de Enfermedad Venosa Periférica	Sí	8	97,3%	<0,001	Diagnóstico de HF	Sí	346 85,8%	<0,001
	No	392	2%			No	45 11,2%	
Diagnóstico de DM	Sí	5	1,3%	<0,001	Intensidad de terapia hipolipemiente	Sin tratamiento	59 14,6%	<0,001
	No	395	98%			Baja	22 5,6%	
Diagnóstico de HTA	Sí	35	8,7%	Moderada		104 25,8%		
	No	365	90,6%	Alta		125 31%		
					Muy alta	90 22,3%		

La cohorte consta de 403 individuos, de las cuales fue posible determinar los niveles de PCSK9 en 319 de ellos. Las características basales de nuestra población de estudio se describen en las (Tablas 1 y 2). Se trata de una cohorte en la que se incluyen mayores de

18 años con diagnóstico de HF y sus familiares de primer grado, por lo que encontramos sujetos que no tienen el diagnóstico de HF (n=45). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de PCSK9 por sexo ni por edad. Tampoco según los antecedentes familiares (AF). En cuanto al tratamiento, la mayoría de los pacientes se encontraban en terapia hipolipemiente de alta o muy alta intensidad, fundamentalmente a base de estatinas (p<0,001).

Tabla 2: Características cuantitativas basales de la cohorte.

	Media	SD		Media	SD
Edad (años)	54,8	10,3	Niveles de ApoA (mg/dL)	140	27
Colesterol total (mg/dL)	248,5	68,6	Niveles de ApoB (mg/dL)	117,6	39
Triglicéridos (mg/dL)	99,7	56,4	Niveles de Lp(a) (mg/dL)	40,1	41,7
HDLc (mg/dL)	50,2	12,7	Peso (kg)	71,8	13,8
LDLc (mg/dL)	178,3	62,8	Talla (cm)	166,4	9,4
Niveles de TSH (mUI/L)	1,8	1,4	IMC (kg/m²)	25,9	4,3
Niveles de glucosa (mg/dL)	85,8	12,7	PCSK9 (ng/mL)	521,6	337,5
AGATSTON coronario	138,7	335,6			

Niveles de PCSK9 en función del tratamiento administrado.

No se observaron diferencias significativas en función de la intensidad del tratamiento hipolipemiente recibido por los participantes (Figura 1). Tras comparar específicamente entre los pacientes sin tratamiento y los pacientes con una terapia de alta o muy alta intensidad, la cual es la recomendable para HF como se demostró previamente (7), se observa una tendencia a la significación donde los niveles de PCSK9 fueron menores en la población con alta o muy alta intensidad con respecto a los individuos que no recibieron tratamiento (p=0,08) (Figura 2).

Estudiando por separado cada fármaco incluido en la base de datos tampoco se observaron diferencias significativas en función del mismo o la dosis utilizada, ni en función de si el sujeto realizaba tratamiento con un solo fármaco o en combinación con otros.

Figura 1: Niveles de PCSK9 en función de la intensidad del tratamiento hipolipemiante.

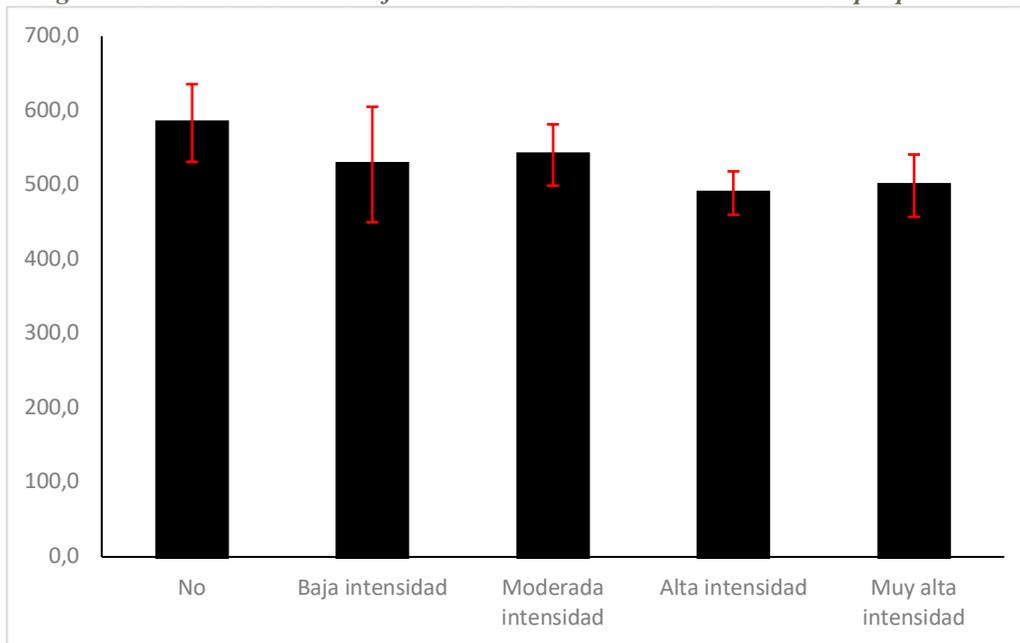
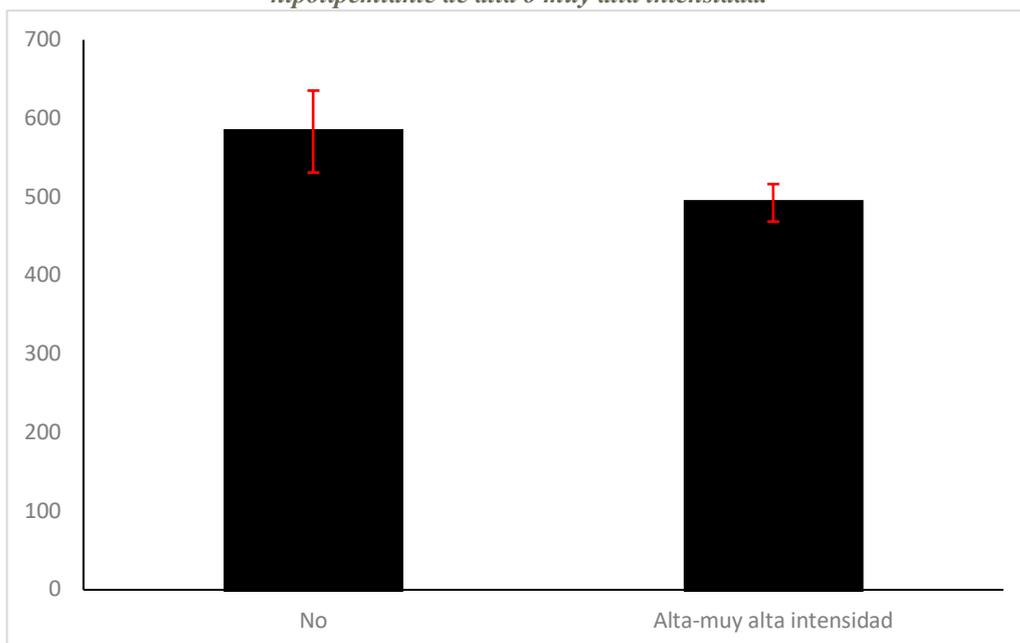


Figura 2: Niveles de PCSK9 en pacientes sin tratamiento hipolipemiante vs pacientes en tratamiento hipolipemiante de alta o muy alta intensidad.



Niveles de PCSK9 en función de las distintas mutaciones en los individuos con HF.

Los individuos con mutación en LDLR presentaban unos valores de PCSK9 superiores a aquellos que no presentaban la mutación en dicho receptor ($p=0.02$) (Figura 3). No existen diferencias significativas en cuanto a sexo, edad o tratamiento administrado entre los grupos (Tabla 3).

Figura 3: Niveles de PCSK9 en función de presencia o no de mutación en LDLR.

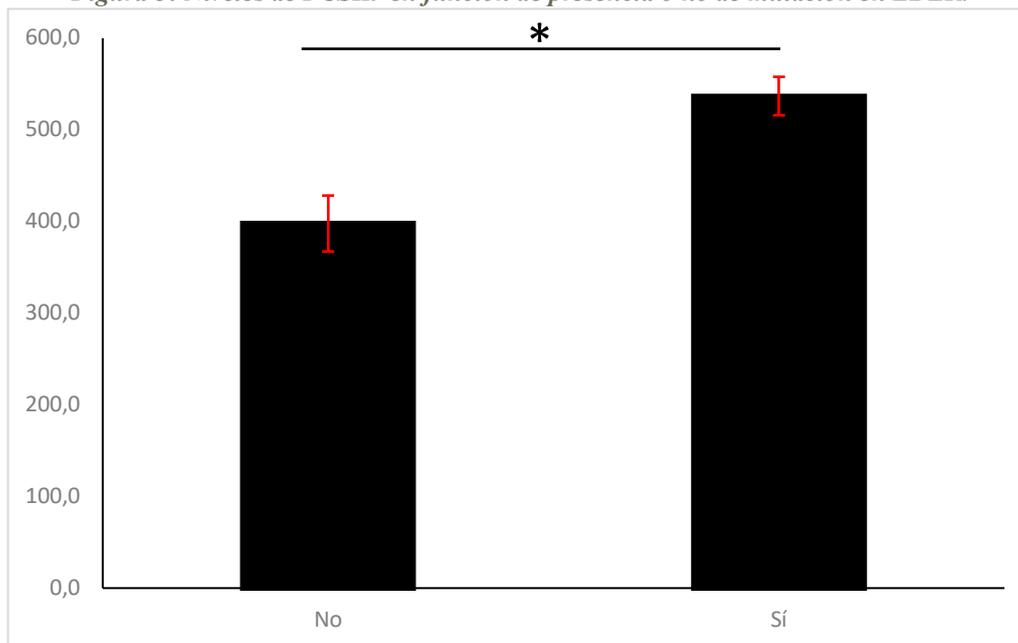


Tabla 3: Comparación entre grupos de mutación de LDLR.

	Sin mutación en LDLR	Con mutación en LDLR	p valor
Edad	58 ± 1,7	54,5 ± 0,5	0,046
Sexo	Masculino n=14	Masculino n=177	0,18
	Femenino n=24	Femenino n=185	
Tratamiento recibido	Sin tratamiento n=8	Sin tratamiento n=51	0,26
	Baja intensidad n=0	Baja intensidad n=22	
	Moderada intensidad n=9	Moderada intensidad n=95	
	Alta intensidad n=15	Alta intensidad n=110	
	Muy alta intensidad n=6	Muy alta intensidad n=84	

En cuanto a la mutación en ApoB (Figura 4), los sujetos del estudio que portaban la mutación en el receptor de ApoB mostraron valores de PCSK9 menores que aquellos individuos que no portaban la mutación (p=0.02). Las diferencias entre ambos grupos se muestran en la (Tabla 4).

Figura 4: Niveles de PCSK9 en función de la presencia o no de mutación en ApoB.

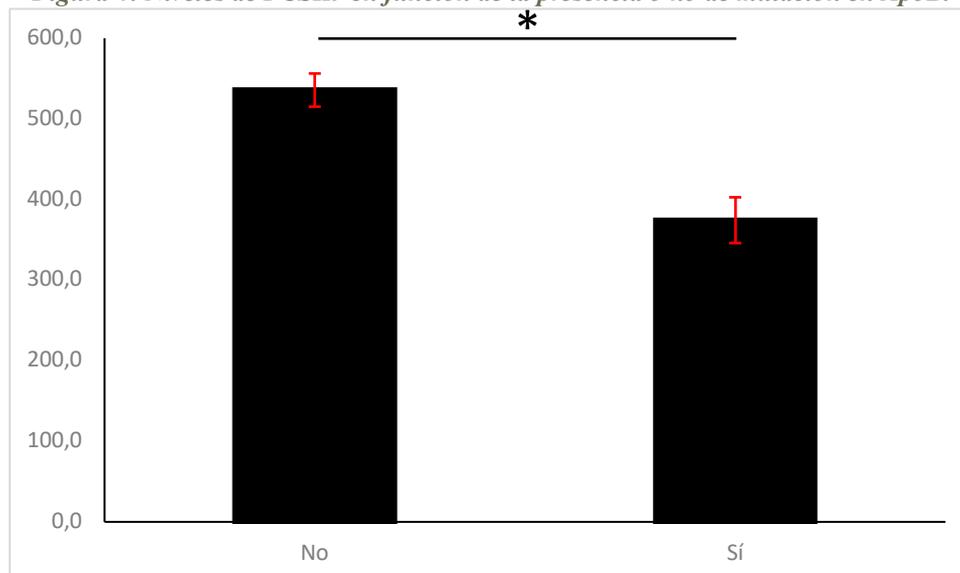


Tabla 4: Comparación entre grupos de mutación de ApoB.

	Sin mutación en ApoB	Con mutación en ApoB	p valor
Edad	54,5 ± 0,6	57,9 ± 1,8	0,06
Sexo	Masculino n=181	Masculino n=10	0,03
	Femenino n=185	Femenino n=24	
Tratamiento recibido	Sin tratamiento n=53	Sin tratamiento n=6	0,4
	Baja intensidad n=21	Baja intensidad n=1	
	Moderada intensidad n=98	Moderada intensidad n=6	
	Alta intensidad n=110	Alta intensidad n=15	
	Muy alta intensidad n=84	Muy alta intensidad n=6	

Relación de los niveles de PCSK9 con variables clínicas asociadas al riesgo cardiovascular.

Nuestros resultados muestran una correlación positiva entre los niveles séricos de PCSK9 y los niveles de colesterol total ($r^2=0,14$; $p=0,01$) (Figura 5), así como con los niveles de LDL ($r^2=0,124$; $p=0,02$) (Figura 6).

Figura 5: Gráfico de dispersión entre niveles de PCSK9 y niveles de colesterol total sérico.

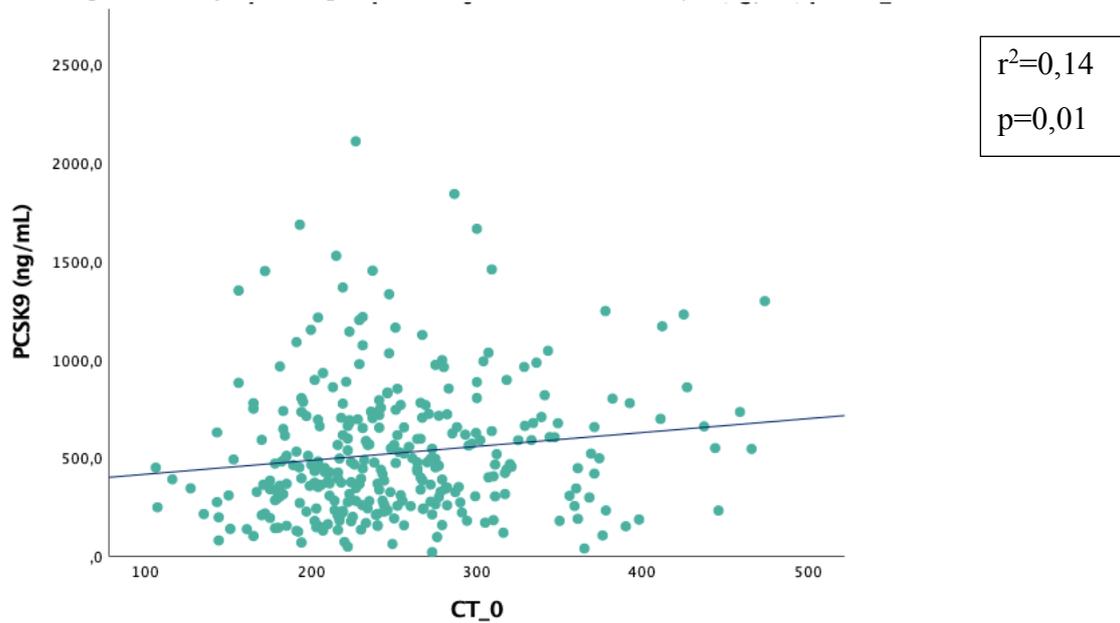
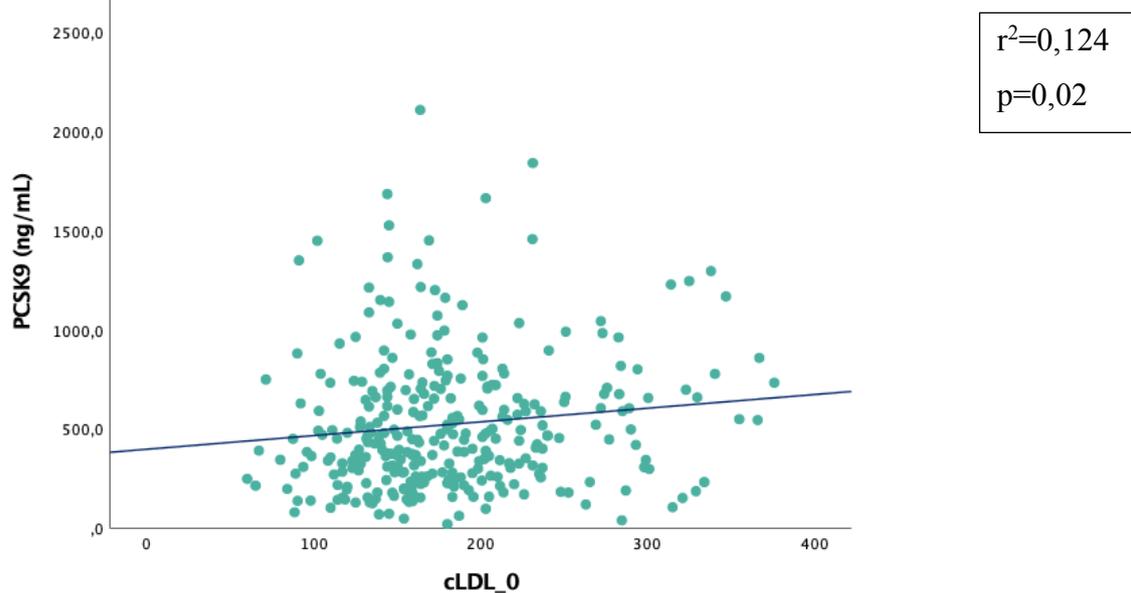


Figura 6: Gráfico de dispersión entre niveles de PCSK9 y niveles séricos de LDL.



También se observó una correlación positiva entre los niveles de PCSK9 y los niveles de glucemia ($r^2=0,183$, $p<0,01$) (Figura 7). Además, a pesar de tener una muestra pequeña ($n=4$), los pacientes diagnosticados de DM mostraron niveles más altos de PCSK9 que los sujetos no diabéticos ($p<0,01$) (Figura 8).

Figura 7: Gráfico de dispersión entre niveles de PCSK9 y niveles de glucemia.

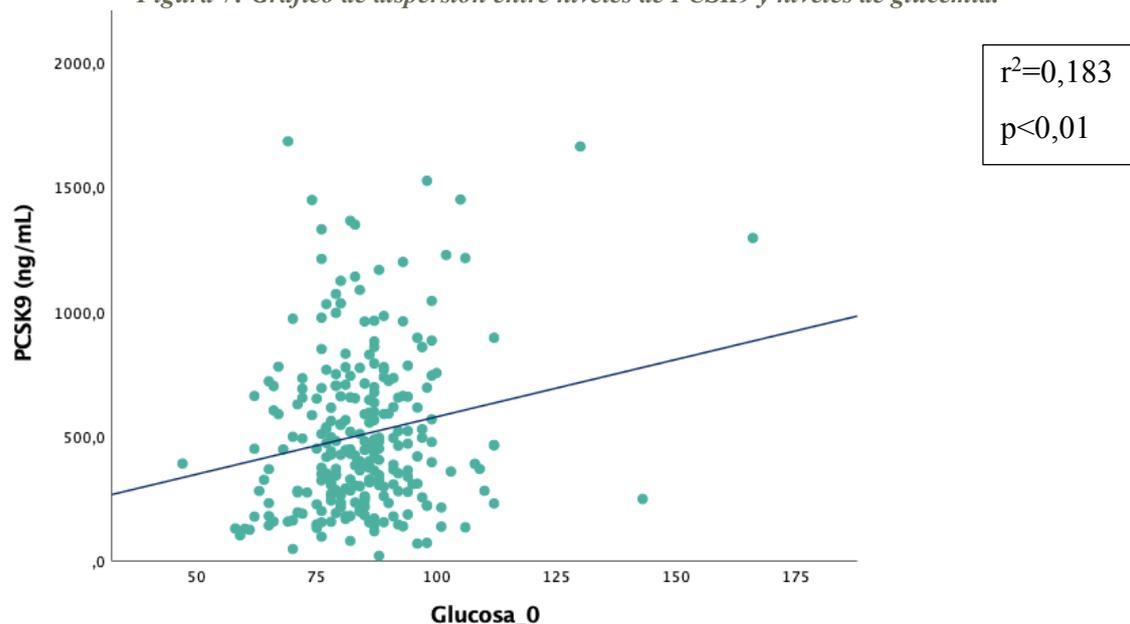
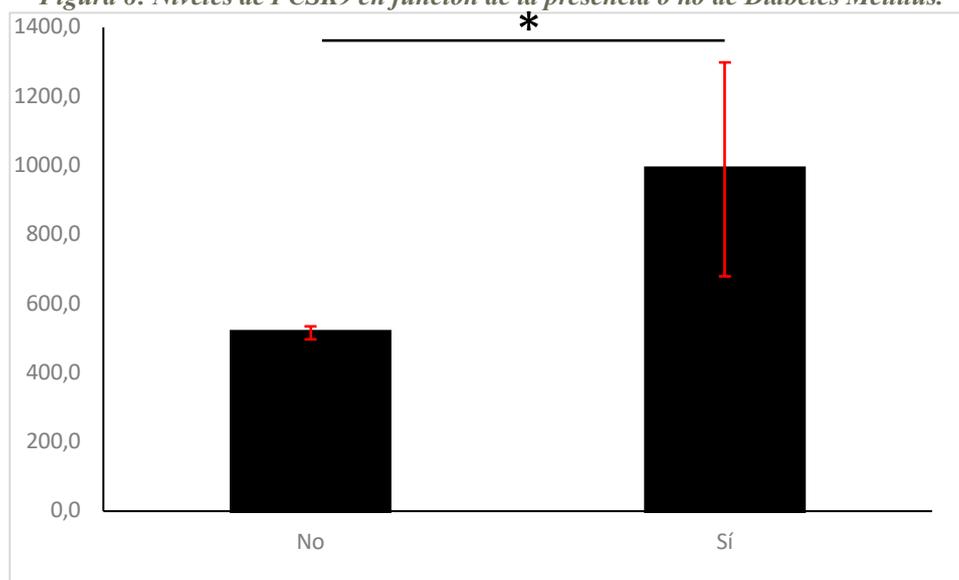
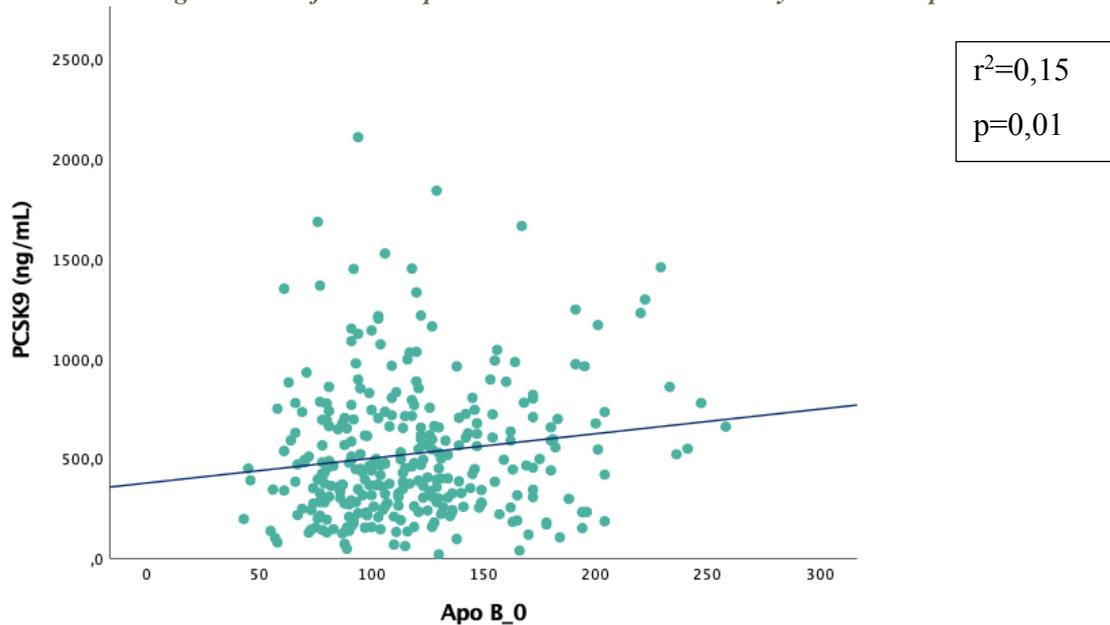


Figura 8: Niveles de PCSK9 en función de la presencia o no de Diabetes Mellitus.



Finalmente, en relación a los niveles séricos de lipoproteínas, se observó una tendencia hacia la significación entre los niveles de PCSK9 y los de ApoA ($r^2=0,11$; $p=0,06$) y una correlación positiva entre los niveles de PCSK9 y los de ApoB (Figura 9) ($r^2=0,15$; $p=0,01$).

Figura 9 : Gráfico de dispersión entre niveles de PCSK9 y niveles de ApoB.



No se observaron correlaciones significativas entre los niveles de PCSK9 y los niveles de triglicéridos, HDL, Lp(a), TSH, score de AGATSTON coronario o a los parámetros antropométricos de peso, talla o IMC.

Discusión

En nuestro estudio se observó que los niveles de PCSK9 en individuos con HF que portaban la mutación en LDLR fueron más altos que en aquellos no portadores. Además, encontramos que los individuos con HF portadores de la mutación en el gen ApoB mostraron menores niveles de PCSK9, independientemente del tratamiento seguido. Finalmente, los niveles de PCSK9 mostraron una correlación positiva con los niveles séricos de glucemia, colesterol total, LDL y ApoB.

Teniendo en cuenta que la enfermedad coronaria es la principal causa de muerte de los individuos con HF, es primordial identificar biomarcadores o características clínicas de los pacientes que permitan estimar MEJOR el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV), definida por la aparición de un evento de enfermedad coronaria, ictus o enfermedad arterial periférica. De esta manera es posible indicar un tratamiento farmacológico, nutricional y de actividad física personalizado, con unos objetivos individualizados que disminuya el riesgo de un evento CV. Actualmente los niveles de PCSK9 no se utilizan de forma rutinaria en la práctica clínica, pero sí se utilizan los anticuerpos monoclonales inhibidores de dicha proteína (iPCSK9) para tratar a los pacientes con HF que no están suficientemente controlados.

Los iPCSK9 han sido estudiados en diversos ensayos clínicos incluyendo poblaciones con ECV, HF heterocigota y homocigota, dislipemia mixta y pacientes con intolerancia a estatinas (15). Basándose en el riesgo/beneficio, estos fármacos apenas presentan efectos secundarios relevantes y podrían ser una opción preferencial en el tratamiento de la HF, especialmente en el caso de otras comorbilidades como es la diabetes. La prevalencia de diabetes en pacientes con HF es reducida (16), sin embargo su presencia multiplica por tres el riesgo de evento CV (17). Esto último se encuentra en línea con los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde la presencia de diabetes mellitus tipo 2 se asoció de manera significativa con mayores niveles de PCSK9, y por ende a un mayor riesgo CV.

Por otra parte, estudios previos demostraron que los niveles de PCSK9 se correlacionan positivamente con los niveles séricos de ApoB, LDL y colesterol total (11,12), en concordancia con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Las distintas mutaciones genéticas sufridas en los diversos receptores o lipoproteínas pueden determinar el riesgo CV de los individuos con HF, tal y como sugieren algunos estudios y paneles de expertos (18). Así, la mutación más frecuente sería la mutación de LDLR, causante de un 90% de los casos de HF, seguida por un 5-10% en mutaciones en ApoB y <1% en PCSK9 (19). Esto concuerda con los datos recogidos en nuestra cohorte, en la cual la mutación más frecuente fue la de LDLR. No solo es importante estudiar las mutaciones en forma de inserciones o deleciones, sino también los polimorfismos. Estos generan alelos nulos o alelos defectuosos, lo cual modificará los niveles de LDL de los individuos y por tanto su riesgo vascular. En nuestro estudio carecemos de la muestra suficiente para poder distinguir entre estos tipos de modificaciones genéticas pero sería interesante analizarlo en un futuro.

En el caso de mutación en LDLR, ésta inducirá una mayor cantidad de LDL circulante en el organismo, al ser incapaz de captarse aumentando su producción al estar disminuido el colesterol intracelular (20). Como respuesta, el organismo sintetizará PCSK9 para compensar la falta de unión entre lipoproteína y receptor, dando lugar así a mayores niveles de PCSK9 en el organismo. Esto está en línea con nuestros resultados donde los niveles de PCSK9 se correlacionaron positivamente con los niveles de LDL y los individuos con mutación en el LDLR mostraron mayores niveles de PCSK9 en el

organismo. Por tanto, se trataría de una mutación que aumentaría el riesgo vascular en individuos con HF.

Otra de las mutaciones analizadas en nuestro estudio es la localizada en el gen de la ApoB. Esta se trata de un defecto autosómico dominante que impide la unión de LDL a LDLR, por tanto, aumentando el colesterol extracelular e incrementa la síntesis de colesterol intracelular. Se ha demostrado que la deficiencia de PCSK9 disminuye los niveles de ApoB (21) de forma independiente a la función y número de LDLR. Por tanto, la interacción de PCSK9 con LDLR no es la única vía patogénica de producción de aterosclerosis, sino que existen distintos mecanismos por los que se pueden producir y los cuales se encuentran actualmente en estudio.

En nuestro trabajo, mutaciones en el gen ApoB se relacionaron con menores niveles de PCSK9, lo cual supondría un menor riesgo CV que la mutación en LDLR. Esto coincide con lo descrito en la bibliografía hasta la fecha, donde la mutación en ApoB produce la menor elevación de LDL de todas las mutaciones presentes en la HF (22), y por tanto el menor riesgo vascular de todas las posibles mutaciones presentes.

En nuestro estudio no encontramos estadísticamente significativo el efecto del tratamiento hipolipemiante sobre los niveles de PCSK9. La mayoría de los pacientes se encontraban tratados con estatinas. Las estatinas actúan tanto en la actividad de la hidroximetilglutaril Co-A reductasa (la enzima que sintetiza colesterol) como sobre los receptores de LDL. En los pacientes con HF se ha demostrado que necesitan mayor dosis (23) para cumplir con sus objetivos lipídicos. Incluso en el caso de mutación homocigótica pueden ser inefectivas. En nuestro estudio los pacientes se encontraban con tratamiento estatínico prescrito en práctica habitual. Además, se trata de una cohorte de largo seguimiento, donde los objetivos lipídicos han ido cambiando a lo largo del tiempo, lo cual influye en la intensificación de tratamiento que realizan los médicos sobre sus pacientes. Son necesarios posteriores estudios con terapias más optimizadas a las últimas recomendaciones, así como otros tratamientos como es el caso de los iPCSK9 para analizar en práctica clínica real su verdadero impacto en cohortes como la nuestra.

Conclusiones

El conocimiento de la relación entre las distintas mutaciones (en genes LDLR, ApoB, ApoE y PCSK9) y el comportamiento de parámetros bioquímicos asociados al desarrollo de enfermedad cardiovascular (PCSK9) permitiría predecir el riesgo vascular de manera individualizada en pacientes con hipercolesterolemia familiar, y de esta manera optimizar el tratamiento farmacológico para disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Posibles carencias del estudio

No fue posible llevar a cabo las comparaciones entre los grupos según la mutación en ApoE o en PCSK9 por la reducida muestra de estudio genético positivo para ambas mutaciones (n=2 y n=3).

Se trata de un estudio observacional transversal sobre una cohorte de seguimiento no incluida en ensayo clínico, por lo que el tratamiento que siguen los pacientes es referido y el recomendado por parte de su médico.

Los objetivos de LDL han cambiado en guías de práctica clínica recientes respecto a los anteriores, por lo que gran parte de los pacientes incluidos en nuestra base de datos no seguían un tratamiento farmacológico optimizado a sus necesidades individuales.

Propuestas

Para próximos estudios sería interesante actualizar la base de datos con tratamientos más novedosos para la HF, y estudiar la influencia de los mismos en los niveles de PCSK9. Además, sería posible realizar un estudio prospectivo a largo plazo para estudiar los eventos cardiovasculares en la cohorte, comparando los niveles de PCSK9 entre los individuos que los sufren y los que no.

Bibliografía

1. Bouhairie VE, Goldberg AC. Familial hypercholesterolemia. *Cardiol Clin*. 2015 May;33(2):169–79.
2. Hopkins PN, Toth PP, Ballantyne CM, Rader DJ. Familial Hypercholesterolemias: Prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol* 2011 Jun 1;5(3):S9–17.
3. Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, Takeda R. Development of coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1989 Feb;79(2):225–32.
4. Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. *Atherosclerosis*. 1999 Jan;142(1):105–12.
5. Alonso R, Castillo S, Civeira F, Puzo J, de la Cruz JJ, Pocoví M, et al. Hipercolesterolemia familiar heterocigota en España. Estudio descriptivo de 819 casos no relacionados. *Med Clin (Barc)*. 2002;118(13):487–92.
6. McGowan MP, Hosseini Dehkordi SH, Moriarty PM, Duell PB. Diagnosis and Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *J Am Heart Assoc*. 2019 Dec;8(24):e013225.
7. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, et al. 2018
AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCN
A Guideline on the Management of Blood Cholesterol: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Jun;73(24):3168–209.
8. Vermissen J, Oosterveer DM, Yazdanpanah M, Defesche JC, Basart DCG, Liem AH, et al. Efficacy of statins in familial hypercholesterolaemia: a long term cohort study. *BMJ*. 2008 Nov;337:a2423.
9. Konrad RJ, Troutt JS, Cao G. Effects of currently prescribed LDL-C-lowering drugs on PCSK9 and implications for the next generation of LDL-C-lowering agents. *Lipids Health Dis*. 2011 Feb;10:38.
10. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley THJ, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*.

- 2006 Mar;354(12):1264–72.
11. Xu R-X, Li S, Zhang Y, Li X-L, Guo Y-L, Zhu C-G, et al. Relation of plasma PCSK9 levels to lipoprotein subfractions in patients with stable coronary artery disease. *Lipids Health Dis.* 2014 Dec;13:188.
 12. Guardiola M, Plana N, Ibarretxe D, Cabré A, González M, Ribalta J, et al. Circulating PCSK9 levels are positively correlated with NMR-assessed atherogenic dyslipidaemia in patients with high cardiovascular risk. *Clin Sci (Lond).* 2015 Jun;128(12):877–82.
 13. Mata N, Alonso R, Badimón L, Padró T, Fuentes F, Muñiz O, et al. Clinical characteristics and evaluation of LDL-cholesterol treatment of the Spanish Familial Hypercholesterolemia Longitudinal Cohort Study (SAFEHEART). *Lipids Health Dis.* 2011 Jun;10:94.
 14. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020 Jan;41(1):111–88.
 15. Ascaso JF, Civeira F, Guijarro C, López Miranda J, Masana L, Mostaza JM, et al. Indications of PCSK9 inhibitors in clinical practice. Recommendations of the Spanish Society of Arteriosclerosis (SEA), 2019. *Clin e Investig en Arterioscler* 2019;31(3):128–39.
 16. Climent E, Pérez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Plana N, Sánchez R, Ros E, et al. Effect of LDL cholesterol, statins and presence of mutations on the prevalence of type 2 diabetes in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Sci Rep.* 2017 Jul;7(1):5596.
 17. Paquette M, Bernard S, Ruel I, Blank DW, Genest J, Baass A. Diabetes is associated with an increased risk of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 2019;13(1):123–8.
 18. Sturm AC, Knowles JW, Gidding SS, Ahmad ZS, Ahmed CD, Ballantyne CM, et al. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(6):662–80.
 19. Iacocca MA, Hegele RA. Recent advances in genetic testing for familial hypercholesterolemia. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017 Jul;17(7):641–51.
 20. Ruiz ÁJ. PCSK-9: papel en las hipercolesterolemias y anticuerpos monoclonales específicos inhibitorios, *Cardiología.* 2017(24):4-12.

21. Sun H, Krauss RM, Chang JT, Teng B-B. PCSK9 deficiency reduces atherosclerosis, apolipoprotein B secretion, and endothelial dysfunction. *J Lipid Res.* 2018 Feb;59(2):207–23.
22. Berrade S, Oyarzábal M, Chueca M. Genética de la hipercolesterolemia familiar . Indicaciones de los estudios genéticos y su utilidad. 2012;3:75–80.
23. Portela Romero M, Pombo Romero J, Bugarín González R, Tasende Souto M. Hipercolesterolemia familiar heterocigota: estudio de utilización de estatinas en condiciones de práctica clínica. *Atención Primaria.* 2006;38(6):333–8.