

## Asociación de factores lipídicos, genotipo de APOE y tipos de mutación del gen del receptor de LDL con el infarto agudo de miocardio en sujetos con hipercolesterolemia familiar heterocigota

José T. Real, Juan F. Ascaso, Felipe J. Chaves<sup>a</sup>, Cintia González, Óscar Puig<sup>a</sup>, María E. Armengod<sup>a</sup> y Rafael Carmena

Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Clínico Universitario, Departamento de Medicina, Universidad de Valencia. <sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia (FVIB).



**FUNDAMENTO:** Evaluar la relación de los lípidos, del genotipo de APOE y del tipo de mutación del gen del receptor de LDL, clasificándolas en nulas y no nulas, sobre la prevalencia de infarto agudo de miocardio (IAM) en individuos heterocigotos con hipercolesterolemia familiar (HF) del sur de Europa, donde existen pocos datos al respecto.

**PACIENTES Y MÉTODO:** Se trata de un estudio transversal que compara individuos con HF e IAM (n = 32) y a individuos con HF sin IAM (n = 76) mayores de 35 años (41 varones y 67 mujeres). En 88 sujetos se estableció el diagnóstico genético, siendo divididos en portadores de mutaciones nulas o no nulas del gen del receptor de LDL. Se han comparado los factores clásicos de riesgo cardiovascular, concentraciones plasmáticas de lípidos y lipoproteínas, tipo de mutación del receptor de LDL y genotipo de APOE entre individuos con HF e IAM y sin IAM.

**RESULTADOS:** Las variables relacionadas con el IAM fueron, en el análisis univariante, la edad, la presencia de xantomas tendinosos o arco corneal, las concentraciones plasmáticas de colesterol total (CT) y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), el cociente CT/cHDL > de 5,3 y genotipo ε4 de la APOE. Las *odds ratio* (OR) bipareadas para IAM fueron: la presencia de xantomas o arco corneal, 1,36 (intervalo de confianza [IC] del 95%, 1,08-1,71; p = 0,01); la edad > 54 años (percentil 50 del total de individuos con HF) 1,56 (IC del 95%, 1,19-2,04; p = 0,001), y las concentraciones plasmáticas de CT > 332 mg/dl (percentil 50 del total de individuos con HF), 1,34 (IC del 95%, 1,05-1,71; p = 0,019). En el análisis multivariante sólo la edad (p = 0,002) y el CT (p = 0,032) permanecieron en el modelo.

**CONCLUSIONES:** El IAM en individuos con HF mayores de 35 años de una población del sur de Europa se relaciona de forma univariante con la edad y las concentraciones plasmáticas de CT y cLDL, el cociente CT/cHDL y genotipo ε4. El IAM se relaciona de forma independiente con la edad y las concentraciones plasmáticas de CT.

**Palabras clave:** Hipercolesterolemia familiar heterocigota. Infarto agudo de miocardio. Genotipo de APOE. Mutaciones del gen receptor de LDL. Factores lipídicos de riesgo cardiovascular.

Influence of plasma lipids, APOE genotype and type of LDL receptor gene mutations on myocardial infarction in subjects with familial hypercholesterolemia

**BACKGROUND:** Our goal was to analyze the relationship of lipids and lipoproteins, APOE genotype and mutations of the LDL receptor gene with the prevalence of myocardial infarction (MI) in patients with familial hypercholesterolemia (FH) from a Southern European FH population.

**PATIENTS AND METHOD:** We studied 108 heterozygous FH subjects aged > 35 years (41 males). It was a cross-sectional study comparing individuals with FH and MI with individuals with FH without MI. In 88 FH subjects, a mutation of the LDL receptor gene was detected. These FH subjects were divided in carriers of null mutation or no null mutations. We compared lipids and lipoproteins and prevalences of LDL receptor type mutation and APOE genotype.

**RESULTS:** Parameters associated with MI were: age, presence of xanthomas and arcus cornealis, plasma concentrations of total cholesterol (TC), LDLc, TC/HDLc ratio > 5.3 and ε4 genotype of the APOE gene. Odds ratio for MI were as follows: presence of xanthomas and arcus cornealis, 1.36 (CI 95%, 1.08-1.71; P = 0.01), age > 54 years (50 th of FH group), 1.56 (CI 95%, 1.19-2.04; P = 0.001) and plasma TC values > 332 mg/dl (50 th of FH group), 1.34 (CI 95%, 1.05-1.71; P = 0.019). In the logistic regression model, only age and TC were significantly associated with MI.

**CONCLUSIONS:** In FH subjects aged over 35 years from a Southern European population, MI is associated with age, plasma TC and LDLc values, TC/HDLc ratio and the ε4 genotype. In addition, MI is related with age and TC plasma levels on an independent basis.

**Key words:** Heterozygous familial hypercholesterolemia. LDL receptor gene mutation. APOE genotype. Coronary heart disease. Lipids. Lipoproteins.

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias proyectos de investigación 96/2063 y 99/0008.

Correspondencia: Prof. Rafael Carmena.  
Departamento de Medicina. Hospital Clínico Universitario.  
Avda. Blasco Ibáñez, 17. 46010 Valencia.  
Correo electrónico: carmena@uv.es

Recibido el 4-10-2001; aceptado para su publicación el 26-2-2002.

La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad autosómica dominante que en su forma heterocigota afecta a uno de cada 500 sujetos de la población general. La enfermedad se caracteriza por concentraciones elevadas de colesterol total y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), xantomas tendinosos y cardiopatía isquémica (CI) temprana y se debe a mutaciones localizadas en el gen del receptor de LDL (rLDL)<sup>1,2</sup>. La expresión fenotípica de la HF es muy variable, como lo son la incidencia y gravedad de la CI. Se cree que la variable expresión fenotípica depende de factores como la edad, dieta, índice de masa corporal, tipo de mutación del rLDL y de la influencia de otros genes<sup>3-5</sup>.

Se han descrito más de 700 mutaciones localizadas en el gen del rLDL responsables de la HF. Estas mutaciones han sido clasificadas funcionalmente en 5 clases. Los alelos o mutaciones nulas (clase I) son aquellas en las que no existe receptor inmunoprecipitable<sup>2</sup>. Las de clase II se caracterizan por alterar el transporte del receptor hasta la membrana celular; las de clase III, por afectar a la unión con la lipoproteína LDL; las de clase IV alteran la internalización del complejo partícula LDL-receptor y, finalmente, las de clase V afectan al reciclado del receptor<sup>2</sup>. Además, en los estudios realizados para caracterizar molecularmente a sujetos con HF definidos por criterios clínicos, un 15-20% presenta un fenotipo IIa con patrón de herencia dominante no explicado por mutaciones localizadas en el gen del rLDL<sup>6</sup>, y un 3-8% de los casos se deben realmente a mutaciones localizadas alrededor del codón 3500 del gen de apo B<sup>2,6</sup>. En poblaciones caucásicas centroeuropeas y americanas los estudios acerca de la influencia del tipo de mutación del rLDL sobre la expresión clínica de la enfermedad y la prevalencia y gravedad de la CI demuestran, en general, que los individuos con HF con mutaciones «graves» presentan valores superiores de colesterol total y cLDL, mayor prevalencia

de xantomas, peor respuesta terapéutica a estatinas y mayor prevalencia de CI temprana<sup>3-8</sup>. Dentro de las mutaciones graves se incluyen las nulas (clase I), en las que no se sintetiza rLDL, y las mutaciones en la porción 5' del exón 4 que codifica la zona 5 de repeticiones del rLDL (clase III), imprescindible para la unión con la apo B/E<sup>8</sup>.

En cambio, en poblaciones mediterráneas del sur de Europa incluyendo la española, existen pocos datos al respecto. Bertolini et al<sup>9</sup>, en población italiana, observaron que en individuos con HF mayores de 30 años la prevalencia de CI se relacionaba con la edad, con antecedentes de tabaquismo e hipertensión y concentraciones plasmáticas de cLDL. El riesgo de CI en sujetos con HF con mutaciones nulas fue 2,6 veces superior comparado con el de los individuos con HF portadores de mutaciones defectuosas. Además, nuestro grupo demostró recientemente, en un estudio con individuos con HF apareados por factores de riesgo cardiovascular clásicos y tipo de mutación del gen del rLDL, que los valores de cHDL y la relación colesterol total/cHDL se relacionaban con la CI<sup>10</sup>.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la relación de los lípidos plasmáticos, del genotipo de la apolipoproteína E (APOE) y del tipo de mutación del rLDL, clasificándolas en nulas y no nulas, sobre la prevalencia del infarto agudo de miocardio en población con HF de la Comunidad Valenciana. Este análisis es necesario puesto que en poblaciones con HF del sur de Europa existen pocos datos al respecto.

## Pacientes y método

### Sujetos

Hemos estudiado a 108 sujetos heterocigotos con HF mayores de 35 años (41 varones y 67 mujeres). Todos los participantes son caucásicos, residen en la Comunidad Autónoma de Valencia y son controlados periódicamente en la unidad de lípidos y arteriosclerosis de nuestro hospital. El comité de ética de nuestro hospital aprobó el protocolo de estudio y todos los sujetos dieron su consentimiento por escrito para participar.

En todos ellos se realizaron historia clínica y exploración física completas. El índice de masa corporal (IMC) se calculó dividiendo el peso por la talla al cuadrado (kg/m<sup>2</sup>). La presión arterial se midió, con el paciente en sedestación, con un esfigmomanómetro de von Recklinghausen, después de 5 min de reposo. Se consideró la media de tres determinaciones tomadas cada 5 min. La CI se definió por una historia clínica documentada de infarto agudo de miocardio (IAM): clínica, elevación de la fracción MB de la creatinfosfocinasa (CPK-MB) y electrocardiograma (ECG) patológico.

### Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal que compara a individuos con HF e IAM frente a individuos con HF sin IAM (excluido por criterios clínicos y electrocardiográficos). Los criterios de inclusión fueron: HF heterocigota definida por criterios clinicobiológicos y edad mayor de 35 años. Los criterios de exclusión fueron: HF homocigota, enfermedad endocrinometabólica

(hipotiroidismo, diabetes, obesidad grave), hepática (cirrosis), renal (insuficiencia renal terminal) o vascular significativa (infarto agudo de miocardio en los tres meses previos al estudio), toma de fármacos que afecten al metabolismo lipídico y que no puedan ser interrumpidos, e ingesta de etanol mayor de 30 g/día. Los criterios clinicobiológicos para definir la HF heterocigota siguieron las directrices del MEDPED: valores de colesterol total y/o cLDL superiores al percentil 95 corregidos por edad y sexo, presencia de xantomas tendinosos, presencia de CI en el caso índice o familiares de primer grado y distribución bimodal de los valores de colesterol total y/o cLDL en la familia indicando un patrón autosómico dominante del fenotipo lipoproteico IIa.

### Métodos de laboratorio

**Medición de lípidos y apo-B.** Tras 12-14 h de ayuno se recogió una muestra de sangre de la vena antecubital en tubos con EDTA (sistema Vacutainer) que fue centrifugada en menos de 4 h. La extracción de ADN se realizó con un método estandarizado<sup>11</sup>. El colesterol y los triglicéridos fueron medidos por técnicas enzimáticas<sup>12</sup>. El colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) se determinó tras precipitación de lipoproteínas con apo B con polianiones<sup>13</sup> y el colesterol unido a lipoproteínas de muy alta densidad (cVLDL) tras separación de VLDL ( $d < 1,006$  g/ml) por ultracentrifugación<sup>14</sup>. El cLDL se calculó por diferencia. Los valores plasmáticos totales de apo B se midieron por inmunoturbidimetría<sup>15</sup>. Los coeficientes de variación para los lípidos y lipoproteínas de nuestro laboratorio son inferiores al 5%. La medición de lípidos y lipoproteínas se realizó en condiciones basales sin la toma de fármacos que influyen en el metabolismo lipídico (véase criterios de exclusión).

**Métodos genéticos.** El diagnóstico genético de los individuos con HF se estableció siguiendo un protocolo escalonado de diagnóstico molecular previamente descrito<sup>16-19</sup>. Las muestras de ADN genómico fueron inicialmente investigadas para la presencia de mutaciones localizadas en el gen de apo B responsables del defecto familiar de unión de apo B-100 (R3480P, R3500Q, R3500W y R3531C), dado que presenta idéntico fenotipo que la HF<sup>16</sup>.

Entre las muestras negativas se llevó a cabo la detección de grandes reordenamientos del gen con técnica de Southern blot, utilizando inicialmente digestiones con *Bgl*I e hibridación con una mezcla de sondas que abarcan todo el gen y con *Kpn*I + *Xba*I e hibridación con una sonda correspondiente al exón 2<sup>17</sup>. Si se detectaban bandas anormales, se confirmaba su existencia utilizando otras enzimas para descartar polimorfismos de restricción. Una vez confirmadas, se procedía a su caracterización por análisis de restricción (mapeado de restricción) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) larga<sup>17</sup>. En el tercer escalón, se analizaban las muestras negativas de los estudios anteriores para el cribado de pequeñas mutaciones, utilizando la técnica de amplificación por PCR y análisis de polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCP) y posterior

caracterización por secuenciación directa<sup>18,19</sup>. Se amplificaron el promotor, 18 exones y zonas intrónicas adyacentes a los exones por técnica de PCR. Los oligonucleótidos empleados y las condiciones del PCR-SSCP son similares a las utilizadas por Leren y Hjermann<sup>20</sup>.

La determinación del genotipo de la APOE se realizó utilizando el método descrito por Hixon y Vernier<sup>21</sup>

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS versión 9 para Windows) y se expresan como medias (desviación estándar). Las medias de las variables cuantitativas se compararon utilizando la prueba de la t de Student para datos independientes. Las proporciones se compararon utilizando tablas de contingencia y la prueba de la  $\chi^2$  o la prueba exacta de Fisher ( $n < 5$ ). Utilizamos el análisis de regresión logística tomando como variable dependiente la presencia de CI, y como independientes la edad, IMC, lípidos, genotipo de APOE y tipo de mutación del rLDL.

## Resultados

Las características clinicobiológicas generales de los 108 individuos con HF heterocigota se exponen en la tabla 1. No encontramos diferencias estadísticamente significativas ni clínicamente relevantes en los parámetros clinicobiológicos estudiados entre varones y mujeres. Por ello, en los análisis posteriores se consideró al grupo completo.

Los 108 individuos con HF definida por criterios clinicobiológicos fueron divididos en dos grupos, según presentasen o no IAM. Las características clínicas generales, valores plasmáticos de lípidos y apo B de los sujetos con HF, divididos según la presencia o no de IAM, se presentan en la tabla 2. Encontramos que, al comparar los sujetos con IAM frente a los que no lo presentaban, existían diferencias significativas con respecto a edad, prevalencia de xantomas y arco corneal y concentraciones plasmáticas más elevadas de colesterol total y cLDL. En el estudio univariante, expresado el riesgo de IAM en *odds ratio* (OR), la presencia de xantomas o arco corneal supone un riesgo de 1,36 (intervalo de confianza [IC] del 95%, 1,08-1,71;  $p = 0,01$ ), la edad ma-

TABLA 1

### Características generales y lípidos plasmáticos de los 108 individuos clínicamente diagnosticados de hipercolesterolemia familiar

|                                | Varones (n = 41) | Mujeres (n = 67) |
|--------------------------------|------------------|------------------|
| Edad (años)                    | 52,1 (10,3)      | 55,5 (10)        |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> )       | 27,1 (3,3)       | 27,4 (4,1)       |
| Xantomas y arco corneal, n (%) | 28 (68)          | 39 (58)          |
| Cardiopatía isquémica, n (%)   | 12 (29)          | 20 (30)          |
| PAS (mmHg)                     | 134,6 (19,2)     | 136,9 (21,4)     |
| PAD (mmHg)                     | 79,5 (11,0)      | 81,6 (14,2)      |
| CT (mg/dl)                     | 352,5 (67,8)     | 342,8 (74,2)     |
| TG (mg/dl)                     | 138,3 (58)       | 119,1 (51,6)     |
| cLDL (mg/dl)                   | 274,2 (69,6)     | 264,1 (73,8)     |
| cHDL (mg/dl)                   | 49,2 (13,6)      | 53,1 (14,9)      |
| cVLDL (mg/dl)                  | 26,7 (13,5)      | 22,6 (10)        |
| Apo B (mg/dl)                  | 164,8 (45,1)     | 159,8 (38,4)     |

No se aprecian diferencias significativas ni clínicamente relevantes entre varones y mujeres. Los datos se expresan como media (DE) o número (porcentaje). IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; cVLDL: colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad; apo B: apolipoproteína B; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica.

TABLA 2

**Características clinicobiológicas, tipo de mutación del rLDL y prevalencia de genotipos de APOE de los individuos con hipercolesterolemia familiar (HF) estudiados, divididos según la presencia o no de infarto agudo de miocardio (IAM)**

|                                | HF + IAM (n = 32) | HF sin IAM (n = 76) |
|--------------------------------|-------------------|---------------------|
| Edad (años)                    | 59,2 (7,2)        | 52,1 (10,6)**       |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> )       | 26,7 (2,9)        | 27,5 (4,1)          |
| Xantomas y arco corneal, n (%) | 25 (78)           | 42 (55)*            |
| Tabaco n (%)                   | 4 (13)            | 12 (16)             |
| PAS (mmHg)                     | 140,8 (19,1)      | 134,1 (20,9)        |
| PAD (mmHg)                     | 82,5 (16,2)       | 80,2 (11,6)         |
| CT (mg/dl)                     | 376,1 (72,9)      | 333,3 (67,6)*       |
| TG (mg/dl)                     | 144,7 (66,4)      | 118,1 (46,6)        |
| cLDL (mg/dl)                   | 293,7 (70,1)      | 255,9 (70,3)*       |
| cHDL (mg/dl)                   | 49,6 (14,2)       | 52,6 (14,7)         |
| cVLDL (mg/dl)                  | 26,4 (13,6)       | 23,2 (10,4)         |
| Apo B (mg/dl)                  | 160,4 (42,8)      | 162,1 (39,9)        |
| Mutaciones del gen rLDL, n (%) |                   |                     |
| Nulas                          | 9 (28)            | 23 (30)             |
| No nulas                       | 18 (56)           | 38 (50)             |
| Sin mutación                   | 5 (16)            | 15 (20)             |
| Genotipo de APOE, n (%)        |                   |                     |
| E3/E3                          | 18 (55)           | 59 (78)             |
| E3/E4                          | 6 (20)            | 11 (15)             |
| E2/E3                          | 5 (15)            | 6 (8)*              |
| E2/E4                          | 3 (10)            |                     |

\*p < 0,01; \*\*p < 0,001. Los datos se expresan como media (DE) o número (porcentaje). IMC: índice de masa corporal; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; cVLDL: colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad; apo B: apolipoproteína B; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica.

TABLA 3

**Grandes reordenamientos del gen del receptor de LDL incluidos en el estudio**

| Nombre                   | Tamaño (kb) | Exones afectados  | Lugares de delección/inserción |
|--------------------------|-------------|-------------------|--------------------------------|
| FH <sup>Valencia-1</sup> | ≈20 kb del  | Promotor, 1 y 2   | Región 5'/intrón 2             |
| FH <sup>Valencia-2</sup> | 17 kb ins   | 3 al 14           | Intrón 2/intrón 14             |
| FH <sup>Valencia-3</sup> | 3,8 kb ins  | 3 al 4            | Intrón 2/intrón 4              |
| FH <sup>Valencia-4</sup> | 4,2 kb del  | 4 al 6            | Intrón 3/intrón 6              |
| FH <sup>Valencia-5</sup> | del         | Promotor y exón 1 | Región 5'/intrón 1             |

Adaptada de Chaves et al<sup>17</sup>.

yor de 54 años (percentil 50 del total de individuos con HF) de 1,56 (IC del 95%, 1,19-2,04; p = 0,001) y las concentraciones plasmáticas de colesterol total superiores a 332 mg/dl (percentil 50 del total de individuos con HF) de 1,34 (IC del 95%, 1,05-1,71; p = 0,019). En el análisis multivariante, al introducir como variables independientes la edad, los valores de colesterol total y cLDL, la presencia de xantomas o arco corneal, el IMC y el genotipo de APOE, y considerando como variable dependiente la presencia de IAM, sólo la edad (p = 0,002) y el colesterol total (p = 0,032) permanecieron en el modelo. De esta forma, si un sujeto con HF de nuestra población tiene más de 54 años y una concentración plasmática de colesterol total superior a 332 mg/dl, el riesgo de padecer un IAM aumenta aproximadamente dos veces (OR = 1,95; IC del 95%, 1,27-2,99; p < 0,001).

Aunque el cociente colesterol total/cHDL no alcanzó significación estadística, los sujetos con HF con un cociente superior a 5,3 (percentil 25 del total de individuos con HF) tienen una razón de riesgo en el análisis univariante de 1,42 para CI (IC del 95%, 1,16-1,75; p < 0,01).

En 88 de los 108 sujetos clínicamente diagnosticados de HF se encontró una mutación en el gen del rLDL responsable de la enfermedad. Los sujetos con HF

TABLA 4

**Descripción de las pequeñas mutaciones del receptor de LDL incluidas en nuestro estudio**

| Localización | Alteración molecular       | Nombre        | Efecto                                   |
|--------------|----------------------------|---------------|--|
| Exón 1       | A → C en 1                 | M-21L         | Met → Leu en 1                           |
| Exón 1       | G → A en 11                | W-18X         | Trp → Stop en -18                        |
| Exón 2       | Ins A en 112               | 112insA       | Stop tras codón 18                       |
| Exón 3       | C → G en 267               | C68W          | Cys → Trp en 68                          |
| Exón 3       | C → G en 274               | Q71E          | Gln → Glu en 71                          |
| Exón 3       | G → A en 301               | E80K          | Glu → Lys en 80                          |
| Intrón 3     | G → C en 313+1             | 313 + 1 G ⇒ C | 5'splice alterado                        |
| Exón 4       | T → C en 346               | C95R          | Cys → Arg en 95                          |
| Exón 4       | C → G en 542               | P160R         | Pro → Arg en 160                         |
| Exón 5       | Del ATGA en 790            | 790delATGA    | Stop tras codón 242                      |
| Exón 5       | A → C en 800               | E246A         | Glu → Ala 246                            |
| Exón 6       | G → A en 829               | E256K         | Glu → Lys en 256                         |
| Exón 6       | Del T en 884               | 884delT       | Stop tras codón 273                      |
| Exón 6       | Ins TCAG en 920            | 920insTCAG    | Stop tras codón 285                      |
| Exón 6       | T C en 929                 | I289T         | Ile Thr en 289                           |
| Exón 8       | A → G en 1124              | Y354C         | Tyr → Cys en 354                         |
| Exón 8       | G → A en 1136              | C358Y         | Cys → Tyr en 357                         |
| Exón 9       | C → T en 1246              | R395W         | Arg → Pro en 395                         |
| Exón 9       | C → G en 1301              | T413R         | Thr → Arg en 413                         |
| Intrón 9     | G → A en 1359-1            | 1359-1G → A   | Splicing                                 |
| Exón 10      | T → A en 1463              | I467N         | Ile → Asn en 467                         |
| Exón 11      | CACCCCTA → GCCCAAT en 1698 | ITL545MPN     | Ile-Thr-Leu → Met-Pro-Asn en 545-546-547 |
| Intrón 12    | G → C en 1845+1            | 1845+1G → C   | Splicing                                 |
| Exón 14      | G → A en 1988              | G642E         | Gly → Glu en 642                         |
| Intrón 15    | C → A en 2312-3            | 2312-3C → T   | Splicing                                 |
| Exón 16      | G → A en 2389              | V779M         | Val → Met en 779                         |

caracterizados molecularmente se dividieron en dos grupos: portadores de mutaciones nulas y no nulas. El grupo de sujetos con HF con mutaciones nulas (n = 32) incluye: grandes reordenamientos del gen del rLDL que afectan al promotor y a los primeros exones (mutaciones *HF Valencia 1* y *5*) y pequeñas mutaciones que producen un codón de parada (W-18X, 112insA, 790delATG, 920insTCAG y 884delT). Las características moleculares de estas mutaciones se han descrito en publicaciones previas de nuestro grupo<sup>10,16-18</sup> y se presentan en las tablas 3 y 4.

El grupo de sujetos con mutaciones no nulas incluye a 56 individuos con HF y con mutaciones puntuales que afectan a diferentes exones, dando lugar a cambios en los aminoácidos de la proteína, mutaciones de *splicing* o grandes reordenamientos del gen que mantienen la pauta de lectura y el mensajero<sup>10,16-18</sup>. Se excluyeron mutaciones puntuales que generan codones *stop* tardíos y, por tanto, proteínas truncadas. Las mutaciones incluidas fueron: R395W, E256K, M-21L, C358Y, C95R, C68W, W779M, duplicación E3-E14, duplicación de E3-E4, delección E4-E6, 1359-1GA, 1467N, G642E, P160R, Y354C, E80K, Q71E, 313+1G, E246A, 2312CA, 1467N, 1845+1GC, I289T, ILT-545MPN y T413R. Las características moleculares de estas mutaciones se presentan en las tablas 3 y 4. La prevalencia de mutaciones nulas, en teoría más graves, no fue más alta en los sujetos con HF y IAM (tabla 2).

En el grupo de los 108 individuos con HF, la distribución de los genotipos de APOE fue significativamente diferente entre los sujetos con IAM y sin IAM (tabla



2), siendo la prevalencia del alelo  $\epsilon 4$  mayor en el grupo con IAM (30 frente a 15%;  $p < 0,01$ ). En cambio, en el análisis multivariante, el alelo  $\epsilon 4$  de APOE no permanece en el modelo de regresión.

## Discusión

En individuos con HF, la presencia de CI temprana es muy prevalente. El 48% de los varones y el 20% de las mujeres con HF menores de 50 años presenta CI<sup>22</sup>. Nuestro estudio demuestra que el IAM en sujetos con HF de una población del sur de Europa se relaciona en el análisis univariante con la edad, prevalencia de xantomas y arco corneal, mayores concentraciones plasmáticas de colesterol total y cLDL, cociente colesterol total/cHDL superior 5,3 y genotipo de APOE. Esta relación se mantiene de forma independiente con la edad y las concentraciones plasmáticas de colesterol total. En otras poblaciones de individuos con HF heterocigota, la CI se ha relacionado con la edad, el sexo masculino, el tabaquismo, la obesidad visceral, las elevaciones plasmáticas de cLDL y los descensos de cHDL<sup>7,9,10,22</sup>.

Es conocido que, tanto en población general como en la población con HF, la edad es un factor de riesgo cardiovascular<sup>9,22-24</sup>. En un estudio previo, llevado a cabo en Quebec, se demostró que tanto el comienzo como la progresión de la CI se correlacionaba en el análisis univariante con la edad<sup>22,24</sup>. Ferrières et al<sup>25</sup> demostraron, en pacientes con HF portadores de la misma mutación, que la edad y los valores de cLDL en mujeres, y la edad y los valores de cHDL en varones, eran predictores de CI. Recientemente, Bertolini et al<sup>9</sup>, en la población italiana con HF, demostraron que en individuos con HF mayores de 30 años, los factores independientes que contribuyen a la CI, en sujetos con mutaciones defectuosas, son el sexo masculino, la hipertensión arterial y las concentraciones plasmáticas de cLDL. En los individuos con HF receptor negativos, por otra parte, sólo las dos primeras variables fueron significativas. Hopkins et al<sup>26</sup>, estudiando a individuos con HF heterocigota, demostraron que la edad, el sexo masculino (OR = 5,64), el tabaquismo (OR = 2,71), la razón cLDL/ LDL apo-B como expresión de LDL pequeñas y densas (OR = 2,6) son determinantes de CI. En cambio, en este estudio otros parámetros como la Lp (a), concentraciones plasmáticas de insulina, homocisteína y proteína C reactiva, así como el polimorfismo de inserción-delección del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) no se relacionaron con CI. En nuestro estudio no encontramos una asociación entre tabaquismo e IAM en una población de individuos con HF de-

bido, probablemente, a que la recogida de esta variable se efectuó de forma categórica teniendo en cuenta el hábito tabáquico actual. En cambio, no se tuvo en cuenta si el individuo era ex fumador, cuándo comenzó su hábito y la cantidad de cigarrillos consumidos. Solamente 4 de los sujetos del grupo con IAM continuaban siendo fumadores.

En un estudio previo de nuestro grupo en el que comparamos a individuos con HF con y sin CI, con similar edad, IMC, distribución de sexos y presencia de mutaciones del rLDL del tipo nulo y polimorfismo DD del gen de la ECA, observamos que las concentraciones plasmáticas de cHDL y la relación colesterol total/cHDL son los únicos parámetros lipídicos correlacionados con la CI<sup>10</sup>. En este mismo sentido, Vohl et al<sup>7</sup> demostraron que los heterocigotos con HF con mayor riesgo cardiovascular fueron los que presentaron mutaciones nulas, mayores valores plasmáticos de triglicéridos y menores de cHDL.

En este trabajo hemos encontrado una distribución similar de mutaciones de tipo nulo y no nulas en los individuos con HF con y sin IAM, probablemente debido a la limitada potencia de nuestro estudio. Además, dentro de las mutaciones no nulas se incluyen mutaciones muy heterogéneas. Algunas afectan a la zona de unión que son *a priori* potencialmente graves, y otras son grandes reordenamientos que conservan la pauta de lectura, pero cuya gravedad funcional desconocemos. Por tanto, este grupo heterogéneo puede suponer un sesgo a la hora de interpretar los resultados. Será necesario ampliar el número de sujetos a estudiar para poder clasificarlos de una forma más acorde con el defecto funcional del receptor. Este hallazgo contrasta con los resultados de otros grupos, en los que el tipo de mutación del rLDL sí influye en el riesgo cardiovascular de los sujetos con HF<sup>3,9,24</sup>. Esto es debido a que las mutaciones de tipo nulo se asocian a mayores concentraciones plasmáticas de colesterol total y cLDL y a una menor respuesta al tratamiento con las estatinas. Así, en el estudio de Sun et al<sup>8</sup> las mutaciones clasificadas como «graves», que incluían los alelos nulos, presentaban mayores concentraciones de colesterol total y cLDL en situación basal y tras tratamiento. En cambio, los sujetos con otras mutaciones *a priori* menos graves presentaban concentraciones menores y mejor respuesta terapéutica. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que los individuos con HF portadores de mutaciones nulas presentan una menor respuesta terapéutica a la simvastatina, lo que confirma los datos de otros estudios en una población del sur de Europa, donde no existían datos al respecto hasta la fecha<sup>17,18</sup>.

Nuestros resultados demuestran que el genotipo de APOE guarda una importante

relación con la presencia de IAM en el análisis univariante. Así, siendo la distribución del tipo de mutación del rLDL similar en ambos grupos, la prevalencia del alelo  $\epsilon 4$  es dos veces superior en el grupo con IAM. La relación del alelo  $\epsilon 4$  con la CI en individuos con HF es conocida<sup>7-9,25,26</sup> y puede deberse a la interacción de este genotipo con las mutaciones del receptor de LDL; por una parte, empeorando las concentraciones plasmáticas de lípidos y lipoproteínas, al igual que sucede en la población general, y por otra, por el propio efecto sobre el inicio y progresión de la arteriosclerosis coronaria. En un reciente metaanálisis se concluye que el riesgo de enfermedad coronaria en portadores del alelo  $\epsilon 4$  es un 26% mayor que en los portadores del alelo  $\epsilon 3$ , siendo la asociación independiente de los valores plasmáticos de colesterol<sup>27</sup>. Además, un estudio realizado en nuestro país con sujetos hipercolesterolémicos demuestra que el alelo  $\epsilon 4$  se asocia de forma significativa e independiente con la prevalencia de CI en este grupo de sujetos con una razón de riesgo de 2,56<sup>28</sup>.

No obstante, debido a que nuestro estudio es transversal, no podemos inferir una relación de causalidad con los factores comentados. Son necesarios estudios prospectivos, que incluyan mayor número de individuos con HF, para determinar la posible existencia de causalidad.

En definitiva, en individuos con HF heterocigota mayores de 35 años, con distribución similar de mutaciones nulas y no nulas, el IAM se relaciona, en el análisis univariante, con la edad y las concentraciones plasmáticas de colesterol total y cLDL, un cociente colesterol total/cHDL superior a 5,3 y el genotipo  $\epsilon 4$  de APOE. En el análisis multivariante, el IAM se relaciona con mayor edad y mayores concentraciones plasmáticas de colesterol total. Estos resultados aconsejan prestar especial atención al control estas alteraciones lipídicas en estos sujetos dado su elevado riesgo cardiovascular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
2. Hobbs H, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
3. Gudnason V, Day INM, Humphries SE. Effect on plasma lipid levels of different classes of mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1994;17:1717-22.
4. Hoeg JM. Homozygous familial hypercholesterolemia: a paradigm for phenotypic variation. *Am J Cardiol* 1993;72:11D-14D.
5. Ward AJ, O'Kane M, Nicholls DP, Young IS, Nevin NC, Graham CA. A novel single base deletion in the LDLR gene (211delG): effect on serum lipid profiles and the influence of other genetic polymorphism in the ACE gene, apoB and apoE genes. *Atherosclerosis* 1996;120:83-91.

6. Haddad L, Day N, Hunt S, Williams RR, Humphries SS, Hopkins PN. Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia. A non-LDLR, non-APOB kindred. *J Lipid Res* 1999;40:1113-22.
7. Volh MC, Gaudet D, Moorjani S, Tremblay G, Perron P, Hagne C, et al. 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; 27:366-73.
8. Sun XM, Neuwirth C, Patel DD, Knight BL, Soutar AK, with the Familial Hypercholesterolemia Regression Study Group. Influence of genotype at the low density lipoprotein receptor gene locus on the clinical phenotype and response to lipid lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1998; 136:175-85.
9. Bertolini A, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini C. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in cluster of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor defective or receptor negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:41-52.
10. Real JT, Chaves FJ, Martínez-Usó I, García-García AB, Ascaso JF, Carmena R. Importance of HDL cholesterol levels and the total/HDL cholesterol ratio as a risk factor for coronary heart disease in molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolemia. *Eur Heart J* 2001;22: 465-71.
11. Tilzer L, Thomas S, Moreno RF. Use of silica gel polymer for DNA extraction with organic solvents. *Anal Biochem* 1989;183:13-5.
12. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-5.
13. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res* 1970;11:583-95.
14. Havel RJ, Eder HJ, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of centrifugally separated lipoproteins in human serum. *Eur J Clin Invest* 1995;34:1345-54.
15. Rosseneu M, Vercaemst R, Steinberg KK, Cooper GR. Some considerations of methodology and standardization of apolipoprotein B immunoassays. *Clin Chem* 1983;29:427-33.
16. Real JT, Chaves FJ, Ascaso JF, Armengod ME, Carmena R. Estudio del defecto familiar de la apo B-100 en sujetos con el diagnóstico clínico de hipercolesterolemia primaria: identificación de la primera familia afectada en España. *Med Clin (Barc)* 1999;113:15-7.
17. Chaves FJ, Real JT, García-García AB, Puig O, Ordovás JM, Ascaso JF, et al. Large rearrangements of the LDL receptor gene and lipid profile in a Spanish population. *Eur J Clin Invest* 2001; 31:309-17.
18. Chaves FJ, Real JT, García-García AB, Civera M, Armengod ME, Ascaso JF, Carmena R. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in a South European outbreed population: influence of LDL receptor gene mutations on treatment response to simvastatin in total, LDL and HDL cholesterol. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86: 4926-32.
19. Real JT, Chaves FJ, Civera M, García-García AB, Ascaso JF, Armengod ME, Carmena R. Influencia de las mutaciones HF Valencia 1 y 2 del gen del receptor de LDL sobre la respuesta terapéutica a simvastatina en sujetos con hipercolesterolemia familiar heterocigota caracterizados molecularmente. *Med Clin (Barc)* 2001; 116:81-5.
20. Leren TP, Hjermann I. Is responsiveness to lovastatin in familial hypercholesterolaemia influenced by the specific mutation in the low density lipoprotein receptor gene? *Eur J Clin Invest* 1995;25:967-73.
21. Hixon JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990;31:545-8.
22. Gagné C, Moorjani S, Brun D, Toussaint M, Lupien PJ. Heterozygous familial hypercholesterolemia. Relationship between plasma lipids, lipoproteins, clinical manifestations and ischaemic heart disease in men and women. *Atherosclerosis* 1979;34:13-24.
23. Real JT, Ascaso JF, Chaves FJ, Tenés S, Priego MA, Puig O, et al. Plasma Lp (a) values in familial hypercholesterolemia and its relation to coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 1999;9:41-4.
24. Moorjani S, Roy M, Torres A, Bétard C, Gagné C, Lambert M, et al. Mutations of low density lipoprotein receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolemia. *Lancet* 1993;341:1303-6.
25. Ferrières 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;92:290-5.
26. Hopkins PN, Stephenson S, Wu LL, Riley WA, Xin Y, Hunt SC. Evaluation of coronary risk factors in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2001;87:547-53.
27. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1250-5.
28. Peña R, Mostaza JM, Lahoz C, Jiménez J, Subirats E, Pinto X, et al. Polimorfismo de apolipoproteína E y enfermedad coronaria. *Med Clin (Barc)* 2001;116:681-5.