

# Identificación y caracterización del primer español con defecto homocigoto familiar de unión de la apolipoproteína B

José Tomás Real, Javier Francisco Chaves<sup>a</sup>, José Javier Martín de Llano<sup>a</sup>, Ismael Ejarque, Miguel Civera, Juan Francisco Ascaso, Ervin Knecht<sup>a</sup>, María Eugenia Armengod<sup>a</sup> y Rafael Carmena

Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Clínico Universitario. Universidad de Valencia.

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia (FVIB).

**FUNDAMENTO:** El defecto familiar de unión de la apolipoproteína B-100 (DFB) es una enfermedad hereditaria autosómica dominante debida a mutaciones localizadas en el gen de la apolipoproteína B-100, clínicamente indistinguible de la hipercolesterolemia familiar. Describimos el primer homocigoto español para el DFB.

**MÉTODOS:** Estudiamos por técnica de PCR-SSCP la mutación R3500Q en los familiares de primer y segundo grado de la familia con DFB previamente descrita por nuestro grupo. Además, analizamos la actividad del receptor de LDL en un ensayo con LDL conjugada con oro coloidal.

**RESULTADOS:** El paciente presenta en ambos alelos la mutación R3500Q causante de DFB. El estudio de la actividad del receptor de LDL es normal, lo que descarta que se trate de una hipercolesterolemia familiar. El grado de hipercolesterolemia es menor del esperado tratándose de un homocigoto (colesterol total, 415, y cLDL, 352 mg/dl), y presenta una buena respuesta terapéutica a estatinas y resinas (descensos de hasta un 42% para el colesterol total y de un 51% para el cLDL).

**CONCLUSIONES:** Hemos detectado y caracterizado el primer homocigoto español para el DFB (mutación R3500Q), que presenta valores moderadamente elevados de colesterol total y cLDL a pesar de su situación de homocigosis. Estos datos demuestran que el fenotipo lipoproteico de los homocigotos DFB es diferente de la situación de homocigosis para la hipercolesterolemia familiar.

**Palabras clave:** Defecto familiar de unión de apolipoproteína B. Homocigosis. Mutación R3500Q. Análisis por PCR-SSCP. Gen de la apo B. Actividad del receptor de LDL.

Identification and characterization of the first Spanish familial ligand-defective apolipoprotein B homozygote

**BACKGROUND:** Familial ligand-defective apolipoprotein B 100 (FDB) is an autosomal inherited disease due to mutations on apo B 100, clinically indistinguishable from familial hypercholesterolemia (FH). We described the first Spanish homozygote for FDB.

**METHODS:** We have screened R3500Q mutation of apo B gene (PCR-SSCP analysis) in a large family with FDB and have identified the first Spanish homozygote for FDB.

**RESULTS:** The homozygote is a 58 year-old man with coronary heart disease, no presence of xanthomata and with total cholesterol and LDL cholesterol plasma levels of 415 and 352 mg/dl. The response to statins and resins was up to 42% for total cholesterol and 51% for LDLc plasma values. The LDL receptor activity was normal in the FDB homozygote.

**CONCLUSIONS:** We have identified and characterised the first Spanish homozygote for FDB (R3500Q mutation). Our data indicate a moderate lipoprotein phenotype in FDB homozygote, different as expected comparing to homozygous FH.

**Key words:** Homozygous familial ligand-defective apolipoprotein B. R3500Q mutation. SSCP analysis. Apo B gene. LDL receptor activity.

*Med Clin (Barc)* 2001; 116: 138-141

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 96/2063, 99/0008-01 y 03).

Correspondencia: Dr. J.T. Real.  
Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Clínico Universitario de Valencia.  
Avda. Blasco Ibáñez, 15. 46010 Valencia.

Recibido el 17-7-2000; aceptado para su publicación el 12-12-2000

El defecto familiar de unión de la apolipoproteína B-100 (DFB) es una enfermedad hereditaria autosómica dominante, debida a mutaciones localizadas en el gen de la apolipoproteína B-100, caracterizada por la presencia de xantomas tendinosos, arco corneal, concentraciones elevadas de colesterol total (CT) y colesterol LDL (cLDL) y cardiopatía isquémica temprana<sup>1-5</sup>. Se han descrito cuatro mutaciones próximas al codón 3500 en el gen de la apo B (R3480P, R3500Q, R3500W y R3531C) que interfieren con el aclaramiento de las partículas LDL<sup>2-4</sup> y dan lugar al DFB. La mutación R3500Q, que supone un cambio de Arg a Gln y reduce en un 90% la capacidad de unión de la apo B-100 con el receptor de LDL, fue la primera descrita y es la más frecuente, siendo el resto de mutaciones poco prevalentes<sup>2,5</sup>. Esta forma de hipercolesterolemia primaria es clínicamente indistinguible de la hipercolesterolemia familiar (HF), ocasionada por mutaciones heterogéneas localizadas en el gen del receptor de LDL<sup>6</sup>. Por tanto, el diagnóstico del DFB es genético, mediante la detección de las mutaciones causantes de la enfermedad.

Al estudiar a 95 sujetos clínicamente diagnosticados de HF, nuestro grupo identificó recientemente al primer sujeto afectado por esta enfermedad en nuestro país<sup>7</sup>. En este grupo de sujetos con HF se realizó una detección de tres mutaciones causantes del DFB (R3500Q, R3500W y R3531C), utilizando la técnica de PCR-SSCP, encontrando un portador de la mutación R3500Q. Al ampliar el estudio de detección al resto de familiares de primer y segundo grado hemos identificado a cuatro sujetos más con la mutación R3500Q, y a un sujeto homocigoto para esta enfermedad. En la actualidad, desconocemos la prevalencia de la forma homocigota del DFB en nuestra población, habiendo sido descritos pocos casos de homocigotos DFB en diferentes países centroeuropeos<sup>8-12</sup>. En esta publicación describimos el primer homocigoto español para el DFB.

## Observación clínica y métodos

### Observación clínica

Varón de 58 años remitido a la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Clínico Universitario de Valencia para estudio y tratamiento de una dislipemia IIa. El paciente era familiar de segundo grado de la familia portadora de la mutación R3500Q detectada previamente por nuestro grupo<sup>7</sup> (fig. 1). Además, presentaba antecedentes familiares de hipercolesterolemia en su hermano y en una hija (fig. 1). El hermano, de 60 años y enfermo de diabetes tipo 2, presentaba un valor de CT de 274 mg/dl; triglicéridos, 229 mg/dl; colesterol HDL (cHDL), 38 mg/dl; cLDL, 181 mg/dl, y apo B, 159 mg/dl. La hija de 24 años presentaba un valor de CT de 260 mg/dl; triglicéridos, 63 mg/dl; cHDL, 68 mg/dl; cLDL, 189 mg/dl, y apo B, 130 mg/dl. Ninguno de los dos presentaban xantomas, xantelasmas ni arco corneal, y no tomaban medicación hipolipemiente en el momento de practicarles el estudio analítico.

Entre los antecedentes personales de interés del paciente cabe destacar que era ex fumador de dos pueros/día desde hacía 8 años; no refería ingestión habitual de alcohol; no presentaba hipertensión arterial ni diabetes; tenía artrosis de cadera derecha y enfermedad arteriosclerótica con obstrucción aortoiliaca bilateral revascularizada en 1984, así como cardiopatía isquémica. En el año 1992 sufrió un infarto agudo de miocardio anteroseptal, realizándose fibrinólisis con estreptocinasa. En dicho ingreso se detectó la dislipemia IIa, añadiendo a su tratamiento 20 mg/día de lovastatina. Se le realizó una coronariografía en la que se objetivó una lesión de la arteria descendente anterior proximal del 90%. Se practicó una aterectomía sobre dicha lesión, quedando una estenosis residual del 25%, y el paciente permaneció asintomático. En el año 1994 sufrió un nuevo infarto agudo de miocardio, en esta ocasión de cara inferior. En la ecocardiografía se objetivó un ventrículo izquierdo dilatado, con alteraciones segmentarias de su contractilidad, con una función sistólica del 40%. La última prueba de esfuerzo practicada en 1999 sin medicación fue submáxima negativa a 100 W. En mayo de 1998 se practicó una nueva revascularización aortobifemoral, con buen resultado para la claudicación. En ese año la ventriculografía isotópica reflejó una fracción de eyección del 21,1% para el ventrículo izquierdo y del 46% para el derecho.

En cuanto a la historia dietética, basada en el recordatorio de 24 h y en la tabla de frecuencias semanal, se

calculó una ingestión aproximada de 2.000 kcal/día rica en grasa saturada y colesterol.

La medicación, en el momento de su estudio, consistía en: 25 mg/p.o./12 h de captopril, 40 mg/p.o./día de furosemida, y 20 mg/p.o./día de monitrato de isosorbida. Destacaba que no recibía ningún fármaco hipolipemiente ni antiagregante.

En la exploración física el índice de masa corporal era de 28,4 kg/m<sup>2</sup> y la presión arterial de 155/95 mmHg. No se observaron xantomas ni xantelasmas, y presentaba un arco corneal completo bilateral. La exploración por aparatos fue normal.

Se le practicó un estudio bioquímico completo incluyendo hormona tirotrópica que fue normal. Los valores de lípidos y lipoproteínas en situación basal fueron los siguientes: CT, 415 mg/dl; cLDLc, 352 mg/dl; cHDL, 46 mg/dl; triglicéridos, 84 mg/dl; apolipoproteína B, 186 mg/dl, y Lp (a), 20 mg/dl. Genotipo de apo E: E3/E3.

Se le realizó detección genética de la mutación R3500Q que presentaba su prima hermana, caso índice de la primera familia descrita<sup>7</sup>, detectando en el estudio por PCR-SSCP ausencia total de las bandas correspondientes a los alelos normales, lo que indicaba que se trataba de un homocigoto (fig. 1); esta sospecha se confirmó por secuenciación, mientras que no se encontró ninguna mutación en el gen del receptor de LDL.

Como se observa en la figura 1, la técnica de barrido permitió detectar en el núcleo familiar a sus dos hijos (heterocigotos obligados) y su hermano como portadores de la mutación R3500Q. Además, estudiamos la actividad del receptor de LDL en el homocigoto y en su hermano heterocigoto (fig. 2) comparándola con la de un control sano del mismo sexo y edad similar, y con la de un paciente con HF portador de la mutación E256K del receptor de LDL. Como se observa en la figura 2, la actividad del receptor de LDL es normal en el homocigoto y heterocigoto DFB, como cabría esperar, y muy baja en el portador de la mutación E256K.

Tras este estudio inicial, se añadió al tratamiento una dieta hipocalórica de 1.600 kcal/día baja en grasa saturada y colesterol (tipo NCEP-1), así como 30 mg/día de atorvastatina y 200 mg/día de aspirina.

Los valores de lípidos y lipoproteínas durante el seguimiento en la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis se presentan en la tabla 1. Pese a utilizar altas dosis de estatinas asociadas a resinas, no se han conseguido los objetivos terapéuticos de prevención secundaria. No obstante, con 80 mg/día de simvastatina y 10 g/día de colestipol hemos obtenido descensos del 42% para el CT, del 51% para el cLDL y del 26%

para los triglicéridos, así como un ascenso del 20% en las concentraciones plasmáticas de cHDL.

### Métodos

**Determinación de parámetros bioquímicos.** Tras 12-14 h de ayuno en situación basal, se determinaron por técnicas estandarizadas el CT y los triglicéridos (método enzimático colorimétrico), el cHDL (precipitación con polianiones), el colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad (cVLDL) (ultracentrifugación secuencial), el cLDL (por sustracción del cHDL y del cVLDL) y la apolipoproteína B (inmunodifusión radial). En los pacientes con tratamiento farmacológico se estableció un período de lavado de 4 semanas.

**Estudio de la actividad del receptor de LDL.** La actividad del receptor de las LDL se determinó empleando linfocitos aislados de sangre periférica. De forma resumida, los linfocitos purificados se estimularon con fitohemaglutinina y se cultivaron durante 48 h en presencia de suero deficiente en lipoproteínas, con el fin de provocar una expresión máxima del receptor de las LDL. La cantidad de LDL unida e internalizada por las células se midió empleando como ligando LDL conjugada con oro coloidal, en un ensayo similar al previamente descrito para fibroblastos<sup>13</sup>.

**Amplificación de ADN genómico por PCR y análisis por técnica de SSCP, y secuenciación de la mutación R3500Q.** En cada sujeto estudiado se amplificaron de una zona del exón 26 del gen de la apo B 320 pares de bases (pb) por PCR, utilizando los oligonucleótidos descritos por Schuster et al<sup>14</sup>. Una vez amplificado el fragmento, se obtuvieron las cadenas simples de ADN añadiendo 8 µl de formamida 95%/10 mM EDTA a 2 µl del producto amplificado por PCR, siendo todo ello calentando a 95 °C durante 2 min y depositado rápidamente en agua con hielo y cargando 1 µl de la mezcla en un gel (90 × 90 × 0,5 mm) del 12% de acrilamida (29: 1) y el 5% de glicerol. La electroforesis se realizó a 350 voltios durante 4 h a 8 °C. Posteriormente el gel fue teñido con plata.

La secuenciación del fragmento analizado del gen de la apolipoproteína B se realizó en un secuenciador ALF DNA sequencer de Pharmacia mediante la técnica de Sanger modificada, y utilizando dUTP marcado con fluoresceína como marcador interno. Se analizó el ADN de controles sanos, heterocigotos y homocigotos para la mutación R3500Q, y el del paciente con HF portador de la mutación E256K del gen del receptor de LDL.

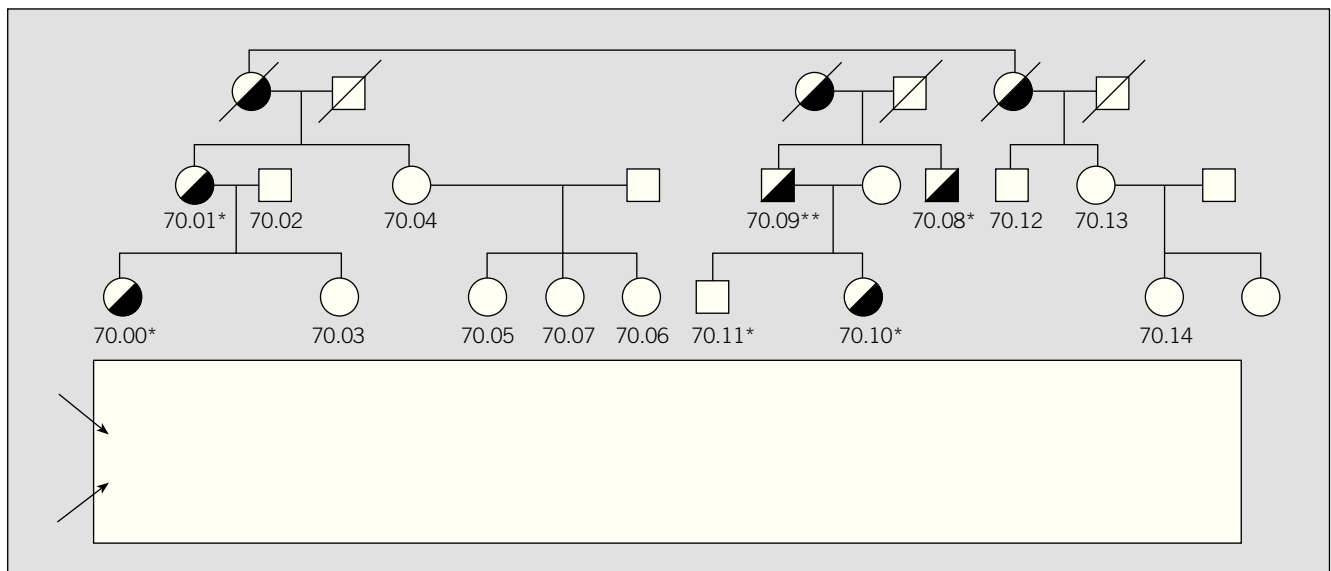


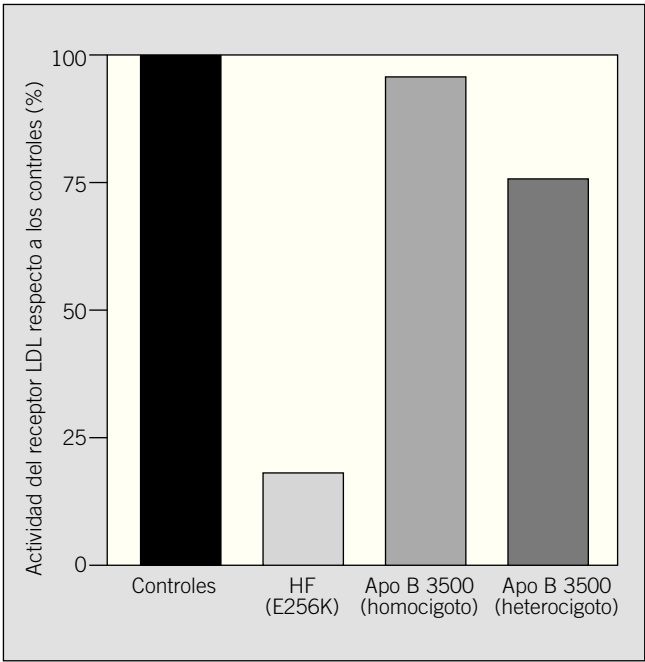
Fig. 1. Familia inicialmente diagnosticada de hipercolesterolemia familiar numerada como FH 70. Tras el estudio molecular se demuestra que los sujetos afectados son portadores de la mutación R3500Q causante del defecto familiar de unión de la apolipoproteína B. Los afectados son 70.00, 70.01 (previamente descritos por Real et al<sup>7</sup>), 70.08, 70.09, 70.10 y 70.11, como se observa en el estudio por PCR-SSCP. Las bandas anormales se señalan con flechas en el gel. El sujeto 70.09 fue clínicamente diagnosticado como heterocigoto, pero presenta dos bandas anormales en el gel, tratándose de un homocigoto. El sujeto 70.11 fue clínicamente diagnosticado como sano al no presentar hipercolesterolemia, sin embargo el estudio molecular demostró que se trataba de un heterocigoto. \*Forma heterocigota; \*\*forma homocigota.

El estudio del gen del receptor de LDL del paciente homocigoto con DFB, así como el de varios controles sanos y pacientes con HF, se realizó mediante ampliación por PCR de todos los exones, regiones intrónicas próximas y región promotora del gen del receptor de LDL y análisis de SSCP de todos ellos mediante el sistema anteriormente indicado y en diferentes condiciones de electroforesis (10-15% de acrilamida 29:1; 0-15% de glicerol; 2-25 °C de temperatura, y bajo una diferencia de potencial entre 350 y 500 W). La determinación del genotipo de apo E se realizó utilizando el método descrito por Hixon y Vernier<sup>15</sup>.

**Discusión**

Estudios epidemiológicos realizados en diferentes países del norte de Europa y América demuestran una alta prevalencia de la mutación R3500Q en su forma heterocigota, que oscila entre 1/700 habitantes en la población germánica y 1/300 en la población suiza<sup>5</sup>. En el estudio de Tybjaerg-Hansen et al<sup>16</sup>, la prevalencia de esta mutación en la población danesa general fue del 0,008, siendo significativamente superior en pacientes con isquemia coronaria y en sujetos con HF. Además, se calcula que la prevalencia de la forma heterocigota entre sujetos con hipercolesterolemia oscila entre 0,01 y 0,03, lo que indica que se trata de una forma frecuente de hipercolesterolemia primaria<sup>5</sup>. En la actualidad, se desconoce la prevalencia de la mutación R3500Q en la población española, aunque la detección de la mutación R3500Q en sujetos con HF diagnosticados clínicamente apunta que debe de ser muy baja<sup>7</sup>. Curiosamente, al ampliar el estudio familiar de un portador R3500Q detectado en tal detección, hemos sido capaces de identificar cuatro nuevos casos de heterocigotos con DFB y un homocigoto con DFB (fig. 1). Esta aparente contradicción entre baja prevalencia en nuestro país y la detección de una forma homocigota se debe a la gran endogamia que existe en la zona de donde procede la familia estudiada. El pueblo donde se detectó la primera familia diagnosticada de DFB pertenece a una comarca de montaña muy aislada por accidentes geográficos, donde es frecuente encontrar una elevada endogamia. De hecho, los padres del homocigoto eran primos hermanos. Esta característica ha permitido detectar a diferentes heterocigotos y al homocigoto descrito.

*Fig. 2. Estudio de la actividad del receptor de LDL presentada como el porcentaje de actividad con respecto a los controles. Los sujetos portadores de la mutación R3500Q tienen una actividad del receptor de LDL normal. En cambio, el sujeto con hipercolesterolemia familiar (HF) portador de la mutación E256K presenta una actividad de aproximadamente un 20% con respecto a la normalidad.*



La prevalencia de la forma homocigota no se conoce, y se han descrito pocos casos. Gallagher et al<sup>8</sup> describieron dos casos, un varón de 66 años con enfermedad coronaria y valores de CT de 367 mg/dl, y su hermana de 69 años, sin evidencia de enfermedad coronaria y con concentraciones plasmáticas de CT de 463 mg/dl. März et al<sup>9</sup> han descrito otro homocigoto con enfermedad coronaria y cifras moderadamente elevadas de CT y cLDL, al igual que el homocigoto descrito por Funke et al<sup>10</sup>. Como ocurre en el paciente que presentamos, los homocigotos con DFB hasta ahora descritos presentan frecuentemente enfermedad coronaria y cifras moderadamente elevadas de CT y cLDL, diferentes de las esperadas. Así, en teoría, un homocigoto con DFB que presente en sus dos alelos una mutación como la R3500Q, que reduce en un 90% la unión de la partícula LDL a su receptor, debería tener concentraciones de CT y cLDL del rango que presentan los homocigotos con HF. Se han realizado diferentes estudios *in vivo* para tratar de explicar esta característica. Gallagher y Myant<sup>18</sup> han propuesto que en estos homocigotos la

actividad residual de unión de apo B junto con un aclaramiento normal de los precursores de LDL, las lipoproteínas VLDL, explicaría los valores moderadamente elevados de CT y cLDL. Además, Schaefer et al<sup>17</sup> han demostrado que la vía catabólica de las lipoproteínas VLDL que contienen apo E está elevada en el homocigoto con DFB estudiado por su grupo. Este mayor aclaramiento de las partículas precursoras de LDL explicaría la moderada elevación de CT y cLDL que presentan los homocigotos con DFB. También se han encontrado estas características en los sujetos con DFB heterocigotos. Igualmente Pietzsch et al<sup>18</sup> demostraron *in vivo* un mayor aclaramiento de los precursores de LDL en sujetos heterocigotos con DFB. Estos hallazgos también podrían explicar la buena respuesta farmacológica a estatinas (descensos del 42% para el CT y del 51% para cLDL) observada en el homocigoto con DFB que presentamos, aunque no se hayan conseguido todavía los objetivos terapéuticos de prevención secundaria. En teoría, al igual que ocurre con la forma homocigota para la HF, cabría esperar una falta de respuesta a es-

TABLA 1

**Lípidos y apolipoproteína B plasmáticos durante el seguimiento clínico del paciente homocigoto con defecto familiar de unión de la apolipoproteína B-100**

	Basal	Febrero de 1998 (atorvastatina, 30 mg/día)	Julio de 1998 (atorvastatina, 40 mg/día)	Diciembre de 1998 (atorvastatina, 60 mg/día)	Febrero de 1999 (simvastatina, 80 mg/día)	Septiembre de 1999 (80 mg/día de simvastatina + 10 g/día de colestipol)
CT (mg/dl)	415	294 (29)	280 (33)	290 (30)	250 (40)	240 (42)
cLDL (mg/dl)	352	229 (35)	225 (36)	240 (32)	189 (46)	173 (51)
cHDL (mg/dl)	46	52 (13)	40 (13)	34 (26)	50 (9)	55 (20)
TG (mg/dl)	84	64 (23)	74 (12)	87 (4)	58 (30)	62 (26)
Apo B (mg/dl)	186	182 (2)	176 (5)	155 (17)	145 (20)	132 (29)

Entre paréntesis se indica el porcentaje de descenso o ascenso con respecto a la basal. CT: colesterol total; cLDL: colesterol LDL; cHDL: colesterol HDL; TG: triglicéridos; apo: apolipoproteína.

tatinas en el homocigoto con DFB, al tener completamente alterada la unión de apo B con el receptor de LDL. En cambio, como se observa en la [tabla 1](#), se consiguen importantes descensos de las concentraciones plasmáticas de CT y cLDL con dosis elevadas de diferentes estatinas y resinas. Por tanto, la sobreexpresión del receptor de LDL sano inducido por las estatinas, junto con una actividad residual de unión de la apo B defectuosa y un mayor aclaramiento de los precursores de LDL, podría explicar esta buena respuesta a estatinas y resinas<sup>18</sup>.

En conclusión, hemos detectado y caracterizado el primer homocigoto español para el DFB que presenta valores moderadamente elevados de CT y cLDL a pesar de su situación de homocigosis. Este hallazgo, junto con la buena respuesta a las estatinas, indica que el fenotipo lipoproteico de los homocigotos con DFB es diferente de la situación de homocigosis para la HF. Probablemente también encontremos diferencias en la expresión fenotípica de la enfermedad al compararla con la HF en la situación de heterocigosis. En la actualidad, esta hipótesis está siendo analizada por nuestro grupo de investigación<sup>19</sup>.

#### Agradecimiento

Agradecemos la inestimable colaboración de la familia afectada.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Myant NB. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparison with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1993; 104: 1-18.
- Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apo B-100. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 587-591.
- Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM et al. Familial ligand-defective apolipoprotein B: identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest* 1995; 95: 1225-1234.
- Gaffney D, Reid JM, Cameron IM, Vass K, Caslake MJ, Sheperd J et al. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidaemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1025-1029.
- Rauh G, Keller C, Schuster H, Wolfgram G, Zöllner N. Familial defective apolipoprotein B-100: a common cause of primary hyperlipemia. *Clin Invest* 1992; 70: 77-78.
- Hobbs H, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992; 1: 445-466.
- 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: 15-17.
- Gallagher JJ, Myant NB. The affinity of low density lipoproteins and very low density lipoprotein remnants for the low density lipoprotein receptor in homozygous familial defective apolipoprotein B-100. *Atherosclerosis* 1995; 115: 263-272.
- März W, Ruzicka V, Phol T, Usadel KH, Gross W. Familial defective apolipoprotein B-100: mild hypercholesterolemia without atherosclerosis in a homozygous patient. *Lancet* 1992; 340: 1362.
- Funke H, Rust S, Seedorf U, Brennhäusen B, Chirazi A, Motti C et al. Homozygosity for familial defective apolipoprotein B 100 (FDB) is associated with lower plasma cholesterol concentrations than homozygosity for familial hypercholesterolemia (FH). *Circulation* 1992; 86: 691 (resumen).
- Horinek A, Ceska R, Sobra J, Vrablik M. Familial defective apolipoprotein B-100 homozygote with premature coronary atherosclerosis. A case report. *J Intern Med* 1999; 246: 2235-2236.
- Gallagher JJ, Myant NB. Variable expression of the mutation in familial defective apolipoprotein B-100. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 973-976.
- Martin de Llano JJ, Andreu EJ, Pastor A, De la Guardia M, Knecht E. Electrothermal atomic absorption spectrometric diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Analytical Chemistry* 2000; 72: 2406-2413.
- Schuster H, Rauh G, Müller S, Keller C, Wolfgram G, Zöllner N. Allele-specific and asymmetric PCR amplification in combination: a one step protocol for rapid diagnosis of familial defective apo B-100. *Anal Biochem* 1992; 204: 22-25.
- Hixon JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.
- Tybjærg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr P, Nordestgaard BG. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1577-1583.
- Schaefer JR, Scharnagl H, Baumstark MW, Schweer H, Zech LA, Seyberth H et al. Homozygous familial defective apolipoprotein B 100. Enhanced removal of apolipoprotein E containing VLDLs and decreased production of LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 348-353.
- Pietzsch J, Wiedemann B, Julius U, Nitzsche S, Gehrisch S, Bergmann S et al. Increased clearance of low density lipoprotein precursors in patients with heterozygous familial defective apolipoprotein B-100: a stable isotope approach. *J Lipid Res* 1996; 37: 2074-2087.
- Real JT, Ejarque I, Chaves FJ, Ascaso P, Civera M, Ascaso JF et al. Fenotipo lipoproteico en el defecto familiar de unión de apo B 100. *Clin Invest Arteriosclerosis* 2000; 12: 12 (resumen).