



11281
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**IDENTIFICACIÓN DE UN LOCUS RESPONSABLE DE
HIPERALFALIPOPROTEINEMIA QUE CONFIERE UN EFECTO
PROTECTOR CONTRA EL DESARROLLO DE ATEROESCLEROSIS
EN UN FONDO GENÉTICO DE HIPERCOLESTEROLEMIA**

EJEMPLAR UNICO

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

M. en C. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA TERESA TUSIÉ LUNA

MÉXICO, D.F.

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Autorizo a la Dirección General de Publicaciones de la UNAM a difundir en forma electrónica impresa el contenido de mi tesis de maestría.

NOMBRE: SAMUEL CANIZALES

QUINTEROS

FECHA: 03/09/2003

FIRMA: [Firma manuscrita]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A los miembros de la familia con hipercolesterolemia familiar, por permitirnos realizar este estudio, mi agradecimiento infinito.

DEDICATORIAS

A Cristina, por amarme y por compartir conmigo
los momentos buenos y los difíciles,
que nos han permitido crecer juntos.

A mi pequeña hija Ana Cristina,
por haber llegado a nosotros.

A mis padres, que estarán siempre en mi memoria
"El que se va se lleva su memoria, su modo de ser río,
de ser aire, de ser adiós y nunca"
Rosario Castellanos

A mi familia, por mantenerse unida
y ser mi gran apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Teresa Tusié Luna, por su apoyo constante e incondicional para la realización de esta tesis.

Al Dr. Carlos Aguilar Salinas, por su colaboración en la caracterización clínica de la familia estudiada.

Al Dr. Graeme I. Bell y a la Dra. Nancy J. Cox, por permitirme realizar parte de este trabajo en su laboratorio.

Al Biólogo Salvador Ramírez Jiménez, por su apoyo en la extracción y purificación de muestras de DNA.

Al Dr. Alejandro Zentella y al Biol. José L. Ventura, por su ayuda en los ensayos funcionales para el receptor LDL.

A la M. en C. Laura Riba, por su ayuda en la redacción del manuscrito para publicación.

A la M. en C. Adriana Huertas Vázquez, por brindarme su amistad y por ser una gran compañera en la ciencia.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Biología Molecular y Medicina Genómica, por los grandes momentos que hemos compartido.

A los miembros del jurado, Dr. Fabio Salamanca Gómez, Dr. Rubén Lisker, Dr. Marco A. Juárez Oropeza, Dra. Susana Kofman, Dr. Roberto Hernández, Dr. Jaime Mas y Dra. María Teresa Tusié Luna, por la revisión crítica del presente trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la DGEP (UNAM), por las becas recibidas para la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1. Lípidos y lipoproteínas plasmáticas.....	5
1.1. Generalidades.....	5
1.2. Apolipoproteínas.....	5
1.3. Lipoproteínas.....	5
2. Hipercolesterolemia familiar.....	7
2.1. Aspectos históricos de la hipercolesterolemia familiar (HF).....	7
2.2. Aspectos clínicos de la hipercolesterolemia familiar.....	10
2.2.1. Heterocigotos para la HF.....	10
2.2.2. Homocigotos para la HF.....	11
2.3. Aspectos genético-molecular de la hipercolesterolemia familiar.....	11
2.4. Regulación de la expresión del gen del receptor LDL.....	13
2.5. Mutaciones en el gen del receptor LDL.....	14
3. Defecto familiar en la apolipoproteína B (DFB).....	16
3.1. Estructura del gen apo B.....	16
3.2. Características clínicas de los pacientes con DFB.....	17
3.3. Mutaciones en el gen apo B.....	17
4. Otros loci responsables de HF (dominante y recesiva).....	19
5. Aterosclerosis.....	21
5.1. Desarrollo de las lesiones ateroscleróticas.....	22
6. Factores genéticos que modifican el riesgo cardiovascular en pacientes con HF.....	23
6.1. Metabolismo de las HDL.....	23
6.2. Efecto de las HDL en la modulación del riesgo cardiovascular.....	24
6.2.1. Análisis clínico y genético de la variación de los niveles de HDL.....	24

6.2.2. Mecanismos de acción de las HDL.....	24
6.2.3. Clasificación de las HDL.....	25
6.2.4. Estudios genéticos para la identificación de los loci asociados a la variación de los niveles de HDL en humanos.....	25
7. Transporte reverso del colesterol (TRC).....	26
7.1. Proteínas que promueven la producción de las HDL maduras.....	28
7.1.1. Apolipoproteína A-I (apo A-I).....	29
7.1.2. Transportador ABCA1.....	30
7.1.3. Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs).....	32
7.2. Proteínas asociadas al metabolismo y transporte de las HDL.....	34
7.2.1. Lecitina colesterol acil transferasa (LCAT).....	34
7.2.2. Lipasa lipoproteica (LPL).....	35
7.2.3. Lipasa hepática (LII).....	37
7.2.4. Lipasa endotelial (LE).....	38
7.2.5. Proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP).....	39
7.3. Receptor de las HDL.....	41
7.3.1. Receptor basurero tipo B clase I (SR-BI).....	41
7.4. Otras proteínas asociadas a las HDL.....	42
7.4.1. Paraoxonasa 1 (PON1).....	42
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
III. HIPÓTESIS.....	45
IV. OBJETIVOS.....	46
V. SUJETOS Y MÉTODOS.....	47
1. Familia en estudio.....	47
1.1. Características clínicas.....	47
1.2. Determinaciones bioquímicas.....	52
2. Aislamiento de DNA genómico.....	52
3. Marcadores microsátélites.....	53
3.1. Análisis de marcadores radiactivos para genes candidatos.....	54
3.2. Escrutinio del genoma (marcadores fluorescentes).....	55
4. Análisis de ligamiento genético.....	56

4.1. Simulación de ligamiento genético.....	56
4.2. Estudio de ligamiento genético.....	56
5. Identificación de las mutaciones más frecuentes en apo B.....	57
6. Haplotipos de apo E.....	57
7. Transformación de líneas celulares.....	58
8. Determinación de los niveles de la proteína del RLDL en linfoblastos de pacientes con HF a través de hibridación tipo Western.....	58
9. Citometría de flujo en linfoblastos de pacientes con HF.....	59
10. Secuenciación del gen de las IL17 e IL17F.....	59
VI. RESULTADOS.....	61
1. Hipercolesterolemia familiar heterocigota (HF).....	61
1.1. Resultados clínicos y de laboratorio.....	61
1.2. Análisis de genes candidatos.....	61
1.3. Escrutinio completo del genoma.....	62
1.4. Resultados preliminares de ensayos funcionales en linfoblastos de Pacientes con HF.....	67
2. Hiperalfalipoproteïnemia (HA).....	69
2.1 Datos clínicos y de laboratorio.....	69
2.2. Análisis de genes candidatos.....	69
2.3. Escrutinio completo del genoma.....	72
2.4. Genes candidatos para la HA ubicados en el cromosoma 6p12.3-q13.....	75
VII. DISCUSIÓN.....	77
1. Evidencias clínicas y de laboratorio de la resistencia al desarrollo de ateroesclerosis en la familia CGZ.....	78
2. Ligamiento al cromosoma 1 banda p32 para HF (locus FH3).....	81
3. Efecto funcional del locus FH3 en pacientes de la familia CGZ.....	85
4. Ligamiento al cromosoma 6 banda p12.3-q13 para HA.....	86
4.1. Interleucinas 17 y 17F, genes candidatos para la HA.....	87
VIII. CONCLUSIONES.....	89
IX. PERSPECTIVAS.....	91
X. REFERENCIAS.....	93

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XI. ANEXOS.....	116
Anexo 1. Carta de consentimiento informado.....	116
Anexo 2. Oligonucleótidos para amplificación de los genes de las IL17 y 17F.....	117
Anexo 3. Gráficas del análisis de ligamiento de múltiples puntos para los 22 autosomas (Hipercolesterolemia familiar).....	118
Anexo 4. Gráficas del análisis de ligamiento de múltiples puntos para los 22 autosomas (Hiperalfalipoproteinemia).....	119
Anexo 5. Artículo publicado	120

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta del receptor LDL en células de mamíferos.....	9
Figura 2. Estructura del receptor LDL humano.....	13
Figura 3. Esquema del mecanismo de transporte reverso del colesterol (TRC).....	28
Figura 4. Árbol genealógico de la familia en estudio (CGZ) mostrando el fenotipo de HF y HA...51	51
Figura 5. Análisis de múltiples puntos del cromosoma 1 (región p32).....	64
Figura 6. Haplotipo sugerido para el cromosoma 1 (banda p32) ligado al fenotipo de HF en la familia CGZ.....	66
Figura 7. Detección de la proteína del receptor LDL por hibridación tipo Western en linfoblastos de pacientes con HF.....	67
Figura 8. Análisis de la externalización y unión del receptor LDL a su ligando en linfoblastos de pacientes con HF.....	68
Figura 9. Análisis de ligamiento de múltiples puntos para el fenotipo de HA con marcadores sobre el cromosoma 6 en la banda p12.13-q13.....	72
Figura 10. Haplotipo sugerido para el cromosoma 6 (banda p12.13-q13) ligado al fenotipo De HA en la familia CGZ.....	74
Figura 11. Electroferogramas de los cambios de nucleótidos encontrados en los genes de las IL-17 e IL-17F.....	76
Figura 12. Recombinantes de la región p32 del cromosoma 1 conteniendo el gen FH3 (PCSK9)...85	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características bioquímicas de las lipoproteínas.....	7
Tabla 2. Características clínicas de los miembros de la familia.....	49
Tabla 3. Resultados del análisis de ligamiento de 2-puntos para genes candidatos para HF.....	62
Tabla 4. Resultados del análisis de ligamiento de 2-puntos para marcadores en el cromosoma 1 banda p32 (Familia completa).....	63
Tabla 5. Resultados del análisis de ligamiento de 2-puntos para marcadores en el cromosoma 1 Banda p32 (Sólo afectados).....	63
Tabla 6. Resultados del análisis de ligamiento de 2-puntos para genes candidatos para HA.....	71
Tabla 7. Análisis de ligamiento de 2 puntos para marcadores en el cromosoma 6 en relación al fenotipo de HA.....	73

RESUMEN

La hipercolesterolemia familiar heterocigota (HF) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes, se caracteriza por la elevación de los niveles en plasma de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el desarrollo prematuro de la enfermedad arterial coronaria (EAC). En este trabajo estudiamos una familia con hipercolesterolemia familiar ligada al cromosoma 1 banda p32. Interesantemente, algunos de los miembros afectados con HF no mostraban evidencia de enfermedad aterosclerótica a edades avanzadas, lo que correlacionaba con la presencia de niveles elevados de la lipoproteína de alta densidad (HDL) o hiperalfalipoproteinemia (HA) en estos individuos. Por el contrario, la enfermedad arterial prematura era evidente en aquellos miembros con hipercolesterolemia familiar sin la presencia de hiperalfalipoproteinemia. El estudio de esta familia permitió establecer que el rasgo de hiperalfalipoproteinemia que protege contra el desarrollo de la EAC, presentaba también una forma de herencia autosómica dominante, con un patrón de segregación independiente de la hipercolesterolemia familiar. A través del escrutinio del genoma, identificamos un locus en la banda p12.13-q13 del cromosoma 6 ligado a niveles elevados de HDL (HA) en esta familia. El análisis de los haplotipos de esta región del cromosoma 6, definió la localización del gen a un intervalo de 7.32 cM (73-80 cM de pter), flanqueado por los marcadores D6S1280 y D6S1275. A través del análisis de ligamiento paramétrico de dos-puntos y el análisis de múltiples puntos se obtuvo un LOD score máximo de 3.05 y 3.17, respectivamente. Este hallazgo fue confirmado a través de un análisis de ligamiento no-paramétrico de múltiples puntos, con un score máximo de 3.78 ($P=0.0009$). Por lo tanto, proponemos que este locus (6p12.3-q13) ligado a niveles elevados de HDL, confiere protección contra el desarrollo de la EAC prematura en un fondo aterogénico de hipercolesterolemia familiar.

ABSTRACT

Heterozygous familial hypercholesterolemia (FH) is one of the most frequent hereditary disorders, is characterized by an isolated elevation of LDL particles that leads to premature coronary heart disease (CHD), usually before age 60. We studied an extended multigenerational kindred with FH linked to chromosome 1p32 in which atherosclerotic complications were either delayed or prevented in individuals with elevated high-density lipoprotein cholesterol levels (HDL-C) or hyperalphalipoproteinemia (HA). Premature CHD was observed in FH individuals without HA. The study of this family established that the HA trait in the family also followed an autosomal dominant mode of inheritance with a pattern of segregation independent from FH. It was identified a locus on chromosome 6 linked to elevated HDL-C levels (HA) in this family. Haplotype analysis refined the localization to a 7.32 cM interval (73-80 cM from pter) flanked by markers D6S1280 and D6S1275. Parametric two-point and multipoint analyses yielded maximum LOD scores of 3.05 and 3.17, respectively. This finding was confirmed with a nonparametric multipoint score of 3.78 ($P=0.0009$). We propose that this locus (6p12.3-q13), linked to elevated HDL-C levels confers protection against premature CHD within a FH context.

I. INTRODUCCIÓN

1. Lípidos y lipoproteínas plasmáticas

1.1. Generalidades

Los lípidos son componentes fundamentales en la estructura de las membranas celulares, y representan para la célula la mayor fuente de energía metabólica. Además, algunos de ellos sirven como reserva energética (Ej. los triacilglicérolos), como precursores de hormonas esteroideas y ácidos biliares (Ej. el colesterol), y como mensajeros intracelulares y extracelulares (Ej. prostaglandinas y fosfatidilinositol) (Yeagle 1985; Russell et al. 1999).

Los lípidos plasmáticos más importantes clínicamente son el colesterol y los triacilglicérolos (TG), ambos insolubles en agua, por lo que son transportados en la sangre unidos a proteínas (apolipoproteínas), formando macromoléculas llamadas lipoproteínas (Hegele 2001).

1.2. Apolipoproteínas

Las apolipoproteínas son un grupo de proteínas anfipáticas que se asocian a algunos pasos bioquímicos del metabolismo de los lípidos. Las masas moleculares de las apolipoproteínas abarcan un intervalo de menos de 7 kDa (apo C-I) a más de 500 kDa (apo B-100 y apo [a]).

La mayoría de las apolipoproteínas son solubles y se unen fácilmente a las estructuras lipídicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que en un inicio se sugirió que eran únicamente vehículos para la solubilización y el transporte de los lípidos en el plasma. Evidencias recientes, sugieren que las apolipoproteínas también tienen funciones activas en el metabolismo de las lipoproteínas, actuando como ligandos para receptores de lipoproteínas, así como co-factores para enzimas lipolíticas y proteínas transferidoras de lípidos (Kwiterovich 2002a).

1.3. Lipoproteínas

En el hígado y en el intestino se "empaquetan" los lípidos provenientes de la dieta o sintetizados en dichos tejidos, formando partículas lipoproteicas (lipoproteínas). Las lipoproteínas plasmáticas son macromoléculas esféricas formadas de lípidos y proteínas (apolipoproteínas). Con excepción del colesterol libre, los lípidos transportados por las lipoproteínas son casi siempre complejos, incluyendo ésteres de colesterol, triacilgliceroles y fosfolípidos. Las lipoproteínas presentan un núcleo lipídico no-polar con una cubierta hidrofílica constituida por colesterol libre, fosfolípidos y apolipoproteínas (Kwiterovich 2002a).

El transporte de los lípidos en sangre se realiza a través de diferentes lipoproteínas. Los triacilgliceroles son transportados principalmente por los quilomicrones (QM) y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, very low density lipoproteins). El colesterol a su vez, es transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL, low density lipoproteins) y por las lipoproteínas de alta densidad (HDL, high density lipoproteins).

Las lipoproteínas son clasificadas con base en su tamaño y densidad, entre otras características (Tabla 1). En orden decreciente a su densidad se ubican inicialmente las HDL, LDL, VLDL y los QM.

El metabolismo de las lipoproteínas es una red compleja de procesos bioquímicos, incluyendo el ensamblaje, la secreción y el catabolismo (Hegele 2001).

Las alteraciones en las concentraciones de estas macromoléculas (lipoproteínas) se denominan dislipidemias. Su importancia clínica radica en la demostrada relación entre las dislipidemias, principalmente, la hipercolesterolemia familiar (HF), y el desarrollo prematuro de la aterosclerosis (Gotto 1998; Castelli 1984; Grundy et al., 1999).

Tabla 1. Algunas características bioquímicas de las lipoproteínas

Lipoproteínas principales	Densidad (g/mL)	Lípidos principales	Apolipoproteínas	Movilidad electroforética
Quilomicrones	< 0.95	triglicéridos	apo B-48, apo A-I, apo A-II, apo C-I, apo C-II, apo E	Permanecen en el sitio de origen
Remanentes de quilomicrones	< 0.95	triglicéridos	apo B-48, apo E	β
VLDL	0.95-1.006	triglicéridos	apo B-100, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo E	pre- β o α_2
IDL	1.006-1.019	triglicéridos, colesterol	apo B-100, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo E	pre- β lenta
LDL	1.019-1.063	colesterol	apo B-100	β
Lp(a)	1.040-1.090	colesterol	Apo (a), Apo B-100	pre- β lenta
HDL ₂	1.063-1.125	Fosfolípidos, colesterol	Apo A-I, apo A-II, Apo C-I, apo C-II, Apo C-III, apo E	α_1
HDL ₃	1.125-1.210	Fosfolípidos, colesterol	Apo A-I, apo A-II, Apo C-I, apo C-II, Apo C-III, apo E	α_1

Apo= apolipoproteínas

Modificada de Kwiterovich 2002a.

2. Hipercolesterolemia familiar

2.1 Aspectos históricos de la hipercolesterolemia familiar (HF)

La presencia simultánea de xantomas en tendones y de ateromas fue descrita en repetidas ocasiones antes de 1900 (Fagge 1873, Fox 1879). En el siglo XVII, Frans Hals fue probablemente el primero en observar xantomas tendinosos, lo cual quedó plasmado en su pintura *Portrait of an Elderly Lady*, en la que se muestra una mujer de 60 años con lesiones en el dorso de las manos parecidas a lo que hoy conocemos como xantomas, por lo que pudiera ser el

primer caso de hipercolesterolemia familiar (HF) que se tenga registro (Erkelens y Sherwood 1989). A finales de los años 30's, Müller y Thannhauser describieron una enfermedad hereditaria con presencia de colesterol plasmático elevado, acumulación de colesterol en los tendones y enfermedad coronaria a edades tempranas (Müller 1938, 1939, Thannhauser y Magendantz 1938). En 1954, Gofman y colaboradores demostraron que la hipercolesterolemia se debía al aumento selectivo de las partículas LDL. Estudios clínicos realizados por Khachadurian en los años 60's confirmaron la herencia autosómica dominante de la HF y permitieron establecer las bases clínicas que diferencian las formas heterocigotas y homocigotas de la enfermedad (Khachadurian 1964). Todos estos hallazgos fueron las bases para los estudios realizados por Brown y Goldstein sobre el receptor LDL (RLDL), que permitieron posteriormente conocer la función principal de este receptor en la regulación del metabolismo de las LDL (Goldstein y Brown 1974, Brown y Goldstein 1976, Brown et al. 1981).

En 1985, Brown y Goldstein elucidaron la ruta del receptor LDL (Figura 1): Después de la síntesis de la proteína precursora del RLDL de 120 kDa, este es transportado del retículo endoplásmico al aparato de Golgi con un aumento en el peso molecular de la proteína (160 kDa) debido a un proceso de glucosilación. Del aparato de Golgi, la proteína madura es transportada a la superficie celular donde migra a regiones especializadas de la membrana plasmática llamadas vesículas cubiertas (coated pits). Una vez en estas envolturas, el receptor se une a la membrana plasmática, funcionando como un dímero (van Driel et al. 1987, Patel et al. 1993). Posteriormente, reconoce a su ligando (apolipoproteína B-100) y entra a la célula por medio de endocitosis mediada por el receptor. En los endosomas, el receptor se disocia de la partícula LDL y es reciclado a la superficie celular, pudiendo participar de nuevo en el proceso de endocitosis. Las LDL liberadas son degradadas en los lisosomas.

La síntesis del RLDL es regulada a través de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG CoA Reductasa), la cual representa el paso limitante en la biosíntesis endógena del colesterol (Brown y Goldstein 1974a).

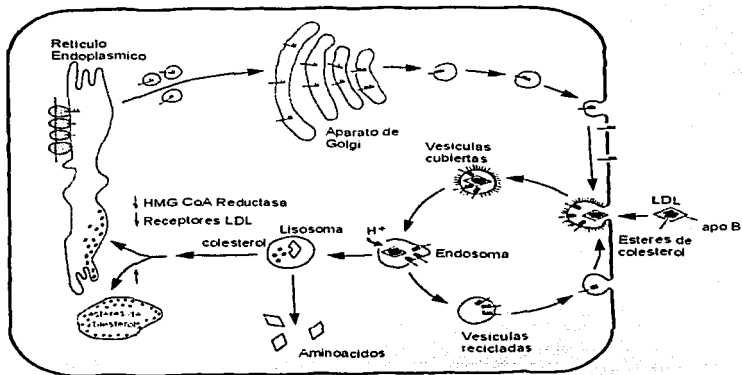


Figura 1. Ruta del receptor LDL en células de mamíferos (modificada de Brown y Goldstein 1985).

Los estudios pioneros de Brown y Goldstein fueron realizados en fibroblastos aislados de biopsias de piel de sujetos con formas homocigotas de la hipercolesterolemia familiar (HF). Estos estudios permitieron establecer que los heterocigotos para la hipercolesterolemia familiar (una copia del gen normal y otra defectuosa) expresan solamente la mitad de los niveles normales del receptor LDL sobre la superficie de sus células, mientras que los homocigotos (las dos copias del gen defectuosas) expresan poco o nulo receptores en la superficie celular. El número reducido de receptores LDL en estos pacientes, provoca una disminución de las LDL transportadas del plasma hacia el hígado, lo cual explica los altos niveles de LDL-colesterol encontrados en los individuos con hipercolesterolemia familiar (Brown y Goldstein 1974b). Por la gran importancia de estos

conocimientos, Brown y Goldstein fueron galardonados con el premio Nobel en fisiología en el año 1985.

2.2. Aspectos clínicos de la hipercolesterolemia familiar (HF)

Algunos estudios en retrospectiva, han permitido caracterizar clínicamente a la hipercolesterolemia familiar (HF), mostrando dos formas de presentación para la enfermedad: heterocigotos y homocigotos (Jensen et al. 1967; Christensen y Hørdér 1971; Schrott et al. 1972; Heiberg y Berg 1976; Beaumont et al. 1976; Sprecher et al. 1984; Miettinen y Gylling 1988).

2.2.1. Heterocigotos para la hipercolesterolemia familiar (HF)

En heterocigotos, la hipercolesterolemia es menos grave y está presente en casi todos los sujetos desde su nacimiento (Kwiterovich et al. 1973; 1974). La frecuencia de la HF es elevada en la población general (de forma aproximada uno de cada 500 sujetos la padecen). Los niveles de colesterol total y LDL-colesterol incrementan al doble o triple de los niveles normales (300-400 mg/dL y >250 mg/dL, respectivamente). La aparición de xantomas en el tendón de Aquiles y tendones extensores de las manos son específicos de la enfermedad, aunque solamente el 30% de los pacientes heterocigotos han desarrollado xantomas en la tercera década de su vida. Otras características como el arco corneal y el xantelasma son comunes pero no específicas de la enfermedad (Gofman et al. 1954). Pacientes con hipercolesterolemia familiar pueden presentar tendinitis o poliartritis localizada predominantemente en tobillos, rodillas, muñecas e interfalángicas proximales. Los triacilglicérols en heterocigotos se encuentran discretamente elevados; en un tercio de ellos existe elevación de triacilglicérols por cúmulo de remanentes de quilomicrones o lipoproteínas de densidad intermedia (IDL).

En diversos estudios se ha observado que los pacientes heterocigotos para la hipercolesterolemia familiar, muestran una tasa alta de mortalidad por enfermedad arterial coronaria. La presencia de síntomas coronarios se observa en los hombres en un 45% a los 50 años, 75% a los 60 años y más del 80% a los 70

años. Los porcentajes correspondientes en las mujeres son 20, 45 y 75 % para las respectivas edades (Goldstein et al. 1995). Comparando estos datos con la población general, la mortalidad coronaria en pacientes con hipercolesterolemia es 90 veces más alta (Smilde et al. 2001).

2.2.2. Homocigotos para la hipercolesterolemia familiar (HF)

La hipercolesterolemia familiar homocigota es extremadamente rara (1 en 1 000 000), se caracteriza por niveles de colesterol por arriba de 500 mg/dL, presencia de arco corneal y de xantomas tendinosos y tuberosos. Esta forma de HF se asocia fuertemente a cardiopatía isquémica en la primera década de vida (Khachadurian y Uthman 1973; Mabushi et al. 1978; Seftel et al. 1980).

2.3. Aspectos genético-moleculares de la hipercolesterolemia familiar (HF)

La hipercolesterolemia familiar presenta heterogeneidad genética, ya que alteraciones en 2 genes diferentes (RLDL y apo B) ocasionan un fenotipo muy similar, difícilmente distinguible clínica o bioquímicamente.

El gen del receptor LDL (RLDL) se encuentra en la porción distal del brazo corto del cromosoma 19 (p13.1-13.3), está constituido de 18 exones y 17 intrones altamente conservados a través de la evolución (Mehta et al. 1996). Este gen comprende 45 kb, se transcribe y procesa en un RNAm (ácido ribonucleico-mensajero) de 5.3 kb y se traduce en una proteína de 860 aminoácidos. En el RNAm, casi la mitad (2.8kb) constituye la región 3' no traducida que contiene una y media copias de DNA (ácido desoxirribonucleico) repetitivos de la familia Alu. En la Figura 2, se presenta la correlación de los exones del gen del receptor LDL con los cinco dominios funcionales de la proteína madura. El exón 1 codifica para una porción pequeña de la región 5' no traducida del RLDL, y para los 21 aminoácidos hidrofóbicos de la secuencia señal para el transporte del receptor LDL al retículo endoplásmico, esta región es cortada de la proteína durante su translocación en el retículo endoplásmico. Los exones del 2-6 codifican para siete repetidos ricos en cisteínas con 40 aminoácidos cada uno, comprendiendo en total 292 aminoácidos que corresponden al sitio de unión a los ligandos Apo B-100 y ApoE. Estos

repetidos contienen una formación octahédrica con un sitio de unión a Ca^{2+} , el cual está formado por cuatro residuos ácidos conservados (Fass et al. 1997). Los exones 7-14 codifican para un dominio de aproximadamente 400 aminoácidos, homólogo a una porción del precursor del factor del crecimiento epidermal, que incluye a tres secuencias repetidas constituidas por 40 aminoácidos, principalmente cisteínas. Esta región es requerida para la disociación ácido-dependiente del receptor LDL y su ligado (LDL-colesterol principalmente) (Davis et al. 1987). El exón 15 codifica para 58 aminoácidos, principalmente serinas y treoninas. Esta región sirve como sitio de enlace para las cadenas de carbohidratos ligados en posición O. La función de estas cadenas de azúcares no está bien establecida aún, pero la eliminación de dos nucleótidos en este exón provoca una disfunción en la internalización del receptor (Tashiro et al. 1998). El exón 16 codifica para la mitad del dominio membranar. La otra mitad del dominio membranar, mayormente citoplasmática, es codificada por el exón 17. El dominio citoplasmático comprende 50 aminoácidos del carboxilo terminal, incluyendo dos señales discretas, una para la localización del receptor en vesículas de clatrina y otra para su ubicación en la superficie basolateral de hepatocitos polarizados (Bos et al. 1995). Finalmente, el exón 18 codifica para los 12 aminoácidos últimos del dominio citoplasmático y contiene una región grande 3'-no traducida de 2.5 kB.

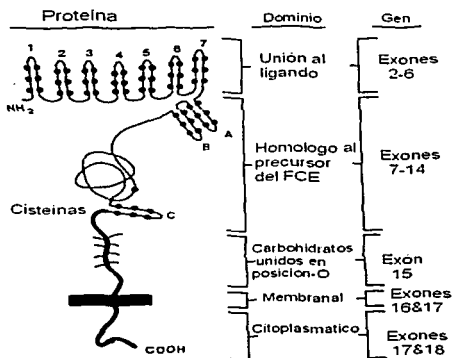


Figura 2. Estructura del receptor LDL humano y su relación con respecto a la organización de los exones del gen. (modificado de Hobbs et al. 1990).

2.4. Regulación de la expresión del gen del receptor LDL (RLDL)

La regulación de la expresión del gen del RLDL es un proceso complejo, su transcripción está regulada por mecanismos de retro-alimentación que funcionan para estabilizar la composición de los lípidos en las membranas celulares (Südhof et al. 1987). La región 5' del gen del receptor LDL contiene la mayoría o casi todas las secuencias que regulan la expresión del receptor LDL a través de esteroides. A 200pb del codón de inicio (metionina) se encuentran 3 repetidos de 16 pb cada uno, dos secuencias con alta proporción de A/T (caja TATA) y un sitio de iniciación para la síntesis del RNAm (Smith et al. 1990; Briggs et al. 1993).

A través de diferentes estrategias para el análisis de promotores, se demostró que dos de los repetidos (repetidos 1 y 3) de 16pb interactúan con el factor de transcripción Sp1 para promover la transcripción basal del RLDL (Sudhof

et al. 1987). Una mayor eficiencia en la transcripción es observada con la participación del repetido 2, el cual contiene un elemento regulatorio positivo para esteroides (SER-1). Este elemento regulatorio (SER-1), es el sitio de unión para una familia de factores transcripcionales llamados proteínas de unión a elementos regulatorios de esteroides (SREBPs) (Dawson et al. 1988; Sánchez et al. 1995). La forma activa de estos SREBPs es regulada por la presencia de esteroides.

La transcripción del RLDL no es solamente regulada por colesterol sino también por otros mediadores no esteroides como son: hormonas, factores de crecimiento y citocinas (Rudling et al. 1992; Stoepck et al. 1993; Pak et al. 1996; Streicher et al. 1996). Un elemento regulatorio actuando en cis en la región -17 a -1 del promotor, es responsable de la regulación independiente de esteroides para la transcripción del gen del RLDL (Liu et al. 2000).

2.5. Mutaciones en gen del receptor LDL

Al rededor de 900 mutaciones han sido descritas en el gen del RLDL, incluyendo 69 eliminaciones mayores (al menos un exón), 18 inserciones mayores (al menos un exón) y 840 mutaciones puntuales (610 sustituciones, 121 eliminaciones pequeñas y 53 inserciones o duplicaciones pequeñas) (Villéger et al. 2002).

Las mutaciones en el gen del RLDL han sido clasificadas en cinco categorías de acuerdo a las consecuencias funcionales que ocasionan (Hobbs et al. 1990):

Clase 1 (Alelos nulos). Estas mutaciones impiden la síntesis de RLDL e incluye eliminaciones en el promotor, mutaciones sin sentido y defectos relacionados a corte y empalme del RNAm (alelos nulos), por lo que provocan una falla completa para producir receptor inmunoprecipitable por cualquiera de los métodos inmunológicos. Se asocia a cuadros clínicos muy severos. Son las mutaciones que reducen en mayor medida el número de receptores LDL funcionales.

Clase 2 (Defecto en el transporte). Representa casi el 50% de las mutaciones asociadas al fenotipo de hipercolesterolemia familiar. El defecto radica en el

transporte del receptor de las LDL del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi para su glucosilación. En esta clase existen dos subtipos, la variedad 2A donde se produce una proteína que no puede ser transportada fuera del retículo endoplásmico, por lo que no se detecta la forma madura del receptor LDL (160 kDa) y la variedad 2B en la que existe un defecto en la estructura y plegamiento del receptor maduro, el cual a pesar de que llega a la superficie celular, no es capaz de reconocer a las lipoproteínas que contienen apo B-100 y apo E (IDL y LDL). La mayoría de las mutaciones que condicionan a esta clase de defectos se ubican en los exones codificantes para el dominio de unión al ligando y en el dominio homólogo al precursor del factor de crecimiento epidermal.

Clase 3 (Defecto de unión al ligando). En esta clase de mutaciones, el RLDL es transportado normalmente a la superficie celular, pero el problema estriba en que una cantidades menores de LDL. Los defectos se encuentran en las repeticiones que comprometen el dominio de unión al ligando (exones 2-6) o defectos en las repeticiones del dominio homólogo al precursor del factor de crecimiento epidermal, es decir en los exones 7-14.

Clase 4 (Defecto de internalización). Este tipo de mutación se traduce en un defecto en la internalización del receptor. Parecido a la clase 2, la clase 4 es clasificada en dos subtipos. El subtipo 4A involucra mutaciones en el dominio citoplasmático del receptor y afecta las secuencias indispensables para la migración del complejo receptor-lipoproteína hacia vesículas cubiertas y el subtipo 4B en el cual las alteraciones se encuentran en los dominios del receptor que facilitan la unión a la membrana celular, como consecuencia de estas mutaciones los receptores muestran una menor adherencia a la superficie celular, por lo que no pueden internalizar las partículas LDL.

Clase 5 (Defecto en el reciclamiento). Este es un defecto en la disociación ácido dependiente entre el receptor y el ligando. Este proceso se realiza en el endosoma y es esencial en el reciclaje del receptor. Las alteraciones se encuentran en las repeticiones homólogas al precursor del factor de crecimiento epidérmico.

Recientemente, se han caracterizado mutaciones en el RLDL con defectos funcionales diferentes a los descritos anteriormente.

Una nueva clase de mutación: Alelo Turku (defecto en la ubicación basolateral)

La mutación Turku (G823D) se ubica en la región carboxilo terminal (dominio citoplasmático) del receptor LDL, la cual es muy importante para determinar la ubicación del receptor LDL en las células polarizadas. Esta mutación provoca que el receptor de las LDL sea transportado a la superficie apical (membranas colindantes) de las células hepáticas, por lo que no puede unirse a las partículas LDL. Una característica única de este alelo mutado es que solamente modifica la región del péptido señal que permite la ubicación basolateral del receptor LDL en las células hepáticas, por lo que el funcionamiento del receptor LDL es normal en células no polarizadas (Koivisto et al. 2001).

3. Defecto Familiar en la apolipoproteína B (DFB)

Un segundo grupo de defectos moleculares causantes de hipercolesterolemia familiar son las alteraciones estructurales en el gen apo B.

3.1 Estructura del gen apo B

El único componente proteico de las LDL es la apo B-100, la cual sirve como ligando para el receptor LDL (Goldstein et al. 1995).

En 1986, cuatro grupos reportaron la secuencia completa del DNA complementario (DNAc) para el gen apo B, así como la secuencia deducida de aminoácidos (Knott et al. 1986; Law et al. 1986; Chen et al. 1986; Cladaras et al. 1986). El gen apo B se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 2 en la región p23 y está constituido aproximadamente por 29 exones y 28 intrones. El DNAc (ácido desoxirribonucleico complementario) es de 14,121 nucleótidos con regiones no traducidas en los extremos 5' y 3' de 128 pb y 304 pb, respectivamente. El DNAc codifica para una proteína madura de 4,536 aminoácidos. Cada partícula de VLDL, IDL y LDL contiene una molécula de apo B-100, la cual no es intercambiada (Young 1990). El sitio de unión al receptor LDL está localizado en la porción carboxilo terminal de la molécula (Chen et al. 1988).

Con el uso de anticuerpos monoclonales, Milne y colaboradores (1989), determinaron que la región de unión al receptor se encontraba entre los aminoácidos 2,980-3,780. Una región con aminoácidos cargados positivamente se localizó entre los aminoácidos 3,359-3369. Esta región corresponde a una secuencia homóloga, al sitio de unión de la apolipoproteína E con el receptor LDL (Knott et al. 1986). Sin embargo, se ha sugerido que la unión de apo B-100 al receptor LDL, no depende solamente, de la secuencia de la proteína, sino también de su conformación (Goldstein et al. 1985, Borén et al. 2001).

3.2. Características clínicas de los pacientes con defecto familiar en apo B

Los pacientes con defectos homocigotos para apo B-100, presentan concentraciones de colesterol similar a la de los heterocigotos para RLDL (März et al. 1993). Estudios realizados en homocigotos para la mutación R3500Q han mostrado que la síntesis de LDL-apo B-100 se encuentra reducida en estos pacientes. Sin embargo, la hipercolesterolemia es ocasionada por la disminución en el catabolismo de las mismas (Schaefer et al. 1997). Un proceso similar ocurre en los heterocigotos para mutaciones en apo B100 (Pietzsch et al. 1996). Resulta interesante, que los pacientes homocigotos para mutaciones en apo B-100, presentan un incremento en la producción y en el catabolismo de apo AI, a diferencia de la disminución en la síntesis de esta apolipoproteína, que presentan los pacientes con mutaciones en el gen del receptor LDL (Schaefer et al. 1992; 2000). Estos hallazgos sugieren, que la menor aterogenicidad de la hipercolesterolemia observada en pacientes con mutaciones en el gen apo B, con respecto a los pacientes con alteraciones en el gen RLDL, podría deberse a una disminución en los niveles de LDL o a un aumento en los niveles de apo A-I y por lo tanto de HDL, los cuales son asociados con una disminución del riesgo cardiovascular.

3.3. Mutaciones en el gen apo B

Vega y Grundy (1986) demostraron que pacientes con hipercolesterolemia moderada presentaban un menor catabolismo de las LDL. Estudios adicionales

permitieron sugerir un posible defecto en las LDL, ya que los receptores LDL normales mostraban menor afinidad por estas lipoproteínas. Estudios realizados en las familias de estos pacientes, indicaban que el probando y los familiares afectados eran heterocigotos para un defecto transmitido de forma autosómica dominante. La enfermedad fue llamada defecto de apolipoproteína B familiar (Innerarity et al. 1987). Hasta la fecha, solamente se han descrito tres mutaciones en el gen apo B que afectan la unión al receptor LDL. Soría y colaboradores (1989), describieron un cambio de Adenina (A) por Guanina (G) en el nucleótido 10,708 (exón 26) en sujetos con hipercolesterolemia familiar. Esta mutación causa una sustitución de arginina por glutamina en el aminoácido 3500 del gen de apo B (R3500Q). La segregación de esta mutación fue confirmada en diferentes familias con hipercolesterolemia familiar (Innerarity et al. 1990). Arnold y colaboradores (1994), separaron las LDL con apo B-100 defectuosa (R3500Q) de las LDL normales, usando un anticuerpo monoclonal para apo B-100 (MB19), demostrando que el receptor LDL normal tiene solamente el 10% de afinidad por esta forma defectuosa de apo B-100. La frecuencia para esta mutación ha sido estimada en 0.4% en población Suiza y 0.08% en el norte de Europa y en Estados Unidos (Tybjaerg-Hansen et al. 1998; Hansen et al. 1994). En un estudio reciente realizado a un grupo de 30 pacientes mexicanos con hipercolesterolemia familiar, se identificó solamente una familia con la mutación R3500Q, lo que sugiere una frecuencia baja de mutaciones en este gen en nuestra población (Robles-Osorio et al. 2003).

En 1995, Pullinger y colaboradores describieron otra mutación asociada al fenotipo de hipercolesterolemia familiar. Esta mutación origina el cambio de arginina por cisteína en la posición 3531 (R3531C). En heterocigotos para esta mutación se observó un 70% de afinidad del receptor LDL por esta variante. Hasta la fecha, se han identificado 27 probandos con esta mutación, todos ellos de población caucásica (Pullinger et al. 1995). Sin embargo, recientemente se describió una familia en la que esta misma variante no parece ser la causa principal que ocasiona la hipercolesterolemia en la familia (Rabés JP et al. 2000).

Finalmente, una tercera mutación fue descrita por Gaffney y colaboradores (1995) en el codón 3500 (una sustitución Arginina por triptofano, R3500W) en individuos de dos familias provenientes de Escocia. Estudios para esta mutación mostraron que el receptor LDL presenta una afinidad similar a la que mostrada por la variante con la mutación R3500Q. Esta mutación fue también encontrada en 12 probandos de origen Asiático (Choong et al. 1997; Tai et al. 1998).

Otras mutaciones en el gen apo B (T3492I y R3480W), han sido descritas en casos únicos asociados a hipercolesterolemia (Bednarska-Makaruk et al. 2001; Boren J et al. 2001).

Todas las mutaciones mencionadas modifican la estructura secundaria de las LDL, disminuyendo la afinidad del receptor LDL por estas lipoproteínas. En un inicio, se atribuyó el incremento de las LDL a la interferencia que podría ocasionar el cambio de un aminoácido cargado en el dominio de unión de la apo B-100 con el receptor. Sin embargo, estudios recientes demostraron que el efecto observado, es realizado a distancia, cambiando la estructura secundaria de la apo B-100. La conformación secundaria requerida para una afinidad normal de la apo B-100 por el RLDL, esta dada en parte, por la interacción entre el aminoácido 3500 con el triptofano 4369 (Borén et al. 1998; 2001).

4. Otros loci asociados al fenotipo de hipercolesterolemia familiar (dominante y recesiva)

Desde hace algunos años, se ha sugerido que el fenotipo clínico expresado en la hipercolesterolemia familiar podía ser causado solamente por mutaciones en dos genes distintos: el gen del receptor LDL en el cromosoma 19 (Francke et al. 1984) y el gen de la apo B en el cromosoma 2 (Law et al. 1985). Sin embargo, actualmente existen reportes de familias con hipercolesterolemia familiar, para las cuales, ninguno de estos genes (receptor LDL o apo B) están afectados, lo que sugiere la existencia de otros genes que pudieran estar implicados en el desarrollo de esta patología (Haddad et al. 1999; Khoo et al. 2000). Recientemente, Varret y

colaboradores (1999), identificaron un tercer locus en el cromosoma 1 en la región p32 en una familia francesa con hipercolesterolemia familiar. Esta misma región mostró ligamiento positivo para 3 familias de origen español. Posteriormente, Hunt y colaboradores (2000), describieron una familia de Utha, EUA, con hipercolesterolemia familiar ligada también a esta misma región cromosómica (1p32), confirmando una heterogeneidad genética mayor a la sugerida para este padecimiento.

En este contexto, es apropiado mencionar una forma rara de hipercolesterolemia familiar con un patrón de herencia autosómico recesivo. Las características clínicas asociadas a esta forma recesiva de hipercolesterolemia familiar son muy parecidas a las presentadas por los homocigotos para las formas dominantes. Los pacientes con hipercolesterolemia familiar recesiva no presentan mutaciones en el gen del receptor LDL, ni en el gen de la apo B (Zullani et al. 1995, 1999; Schmidt et al. 1998, Norman et al. 1999). Dos loci nuevos han sido descritos para esta forma recesiva de hipercolesterolemia familiar, uno en el cromosoma 15 en la región q25-q26 (Ciccarese et al. 2000) y otro en el cromosoma 1 en la región p35-p36 (Eden et al. 2001). El gen responsable de la hipercolesterolemia recesiva mapeado en el cromosoma 1 fue clonado recientemente. Este gen codifica para una posible proteína adaptadora del receptor LDL. Seis mutaciones distintas han sido identificadas a la fecha. Esta proteína adaptadora contiene un dominio de unión a fosfotirosina (PTB), el cual en otras proteínas similares se une motivos NPxY del tallo citoplasmático de los receptores de superficie celular, incluyendo el receptor LDL (Margolis et al. 1999). Además, esta proteína parece tener una función tejida específica, ya que es requerida para el funcionamiento normal del receptor LDL en el hígado, pero no en fibroblastos (García et al. 2001; Wilund et al. 2002).

5. Aterosclerosis

Las enfermedades crónico degenerativas se han constituido como uno de los principales problemas de salud pública en México, siendo la enfermedad arterial coronaria (EAC) la principal causa de muerte (Secretaría de Salud, 2001). La aterosclerosis al igual que otras enfermedades complejas (diabetes, hipertensión, obesidad, etc.) tiene entre sus componentes etiológicos, factores genéticos y ambientales. La susceptibilidad genética tiene un papel primario en el desarrollo de este padecimiento, contribuyendo no sólo al desarrollo de la enfermedad arterial coronaria sino al de otras patologías asociadas, tales como diabetes e hipertensión (Marenberg et al. 1994). Adicionalmente, factores ambientales como el tabaquismo, la dieta o la inactividad física pueden influenciar la expresión de este padecimiento (Hegele 2001). La enfermedad arterial coronaria, es un síndrome que presenta como mecanismo fisiopatológico común el daño crónico al endotelio vascular. La aterosclerosis puede ser considerada como un proceso de inflamación crónica, resultado de la interacción de lipoproteínas modificadas, macrófagos derivados de monocitos, linfocitos y elementos celulares normales de la pared arterial, todos ellos condicionantes para el desarrollo de lesiones y la formación de la placa de ateroma. La ruptura de la placa y la trombosis resulta frecuentemente en infarto al miocardio e insuficiencia vascular cerebral (Ross 1999; Lusis 2000).

Debido, a que la aterosclerosis se presenta en la mayoría de los casos por la interacción de diversos factores genéticos y ambientales, se le considera una entidad compleja, en la cual no es posible reconocer un patrón de herencia mendeliano, que sugiera la participación de un único gen en la mayoría de las familias afectadas (Lusis 2000). Es por ello, que las dislipidemias causadas por la alteración de un sólo gen (formas monogénicas o mendelianas), constituyen un modelo de estudio menos complejo para la identificación de los genes que pudieran modular el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria, tal es el caso de la hipercolesterolemia familiar.

El estudio de familias con hipercolesterolemia familiar, ha permitido el reconocimiento de distintos genes (RLDL y apo B) implicados en el metabolismo de lípidos, ayudando a entender los distintos mecanismos que condicionan el desarrollo de la aterosclerosis. Asimismo, el entendimiento de la regulación de los niveles de LDL-colesterol, hizo posible el descubrimiento de fármacos como las estatinas, usados hasta la fecha en el control de las dislipidemias (Knopp 1999).

5.1. Desarrollo de las lesiones ateroscleróticas

Estudios anatomopatológicos han demostrado claramente la existencia de lesiones arteriales desde edades tempranas en paciente con hipercolesterolemia familiar (Fuster et al. 1992; Zaman et al. 2000).

Entre las diferentes teorías postuladas sobre el origen y desarrollo de la aterosclerosis, las de mayor aceptación son: la teoría trombogénica y la teoría lipídica, las cuales pueden ser englobadas en una teoría multifactorial, que apunta a un proceso crítico y común como es la disfunción del endotelio vascular. De hecho, se considera la disfunción endotelial como el primer paso en el proceso patológico de la enfermedad arterial coronaria (Zaman et al. 2000).

El endotelio vascular es la capa monocelular que recubre la superficie luminal de toda nuestra red vascular, separando la pared de la sangre circulante. Esta capa celular participa en una serie de procesos bioquímicos y moleculares, como son la permeabilidad vascular a las lipoproteínas plasmáticas, expresión de proteínas adhesivas, reclutamiento de monocitos, liberación de agentes con actividad pro y anti-trombótica, factores de crecimiento y sustancias vasoactivas. De ahí, la importancia que tiene la disfunción endotelial en varios procesos patológicos como son la aterosclerosis, la trombosis, entre otros. (Bonetti et al. 2003)

6. Factores genéticos que modifican el riesgo cardiovascular en pacientes con hipercolesterolemia familiar.

Estudios realizados en pacientes con hipercolesterolemia familiar que presentan una misma mutación y niveles similares de LDL y colesterol total en plasma, muestran diferencias importantes en el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria, lo que hace evidente la existencia de factores genéticos y ambientales capaces de modular el riesgo al desarrollo de aterosclerosis en estos pacientes (Wittekoek et al. 1998; 1999; Smilde et al. 2001).

Los factores que parecen modificar de manera importante el riesgo al desarrollo de enfermedad arterial coronaria en pacientes con hipercolesterolemia familiar son: 1) Los niveles plasmáticos de las HDL, 2) Los niveles elevados de lipoproteína (a) [Lp(a)], considerado como un factor de riesgo independiente para la enfermedad arterial coronaria, 3) La hiperhomocisteinemia, reconocida como un factor de riesgo independiente para la trombosis y la aterosclerosis, 4) La inflamación inferida a través de marcadores como la proteína C reactiva y el fibrinógeno, entre otros (Jacobs et al. 1990; Lingehel et al. 1998; Rubba et al. 1994; Ridker et al. 1998; Hopkins et al. 2001; Umans-Eckenhausen et al. 2002). De esta variedad de factores, se ha considerado a los niveles plasmáticos de HDL, como uno de los más importantes en la modificación del riesgo cardiovascular, con base en diferentes estudios epidemiológicos (Gordon 1998).

6.1. Metabolismo de las HDL

Las HDL se originan principalmente en el hígado y en el intestino, de donde son secretadas como partículas nacientes de forma discoidal, compuestas fundamentalmente de fosfolípidos y de apolipoproteínas A-I y A-II, con muy bajo contenido de colesterol. Una vez en el torrente sanguíneo, las HDL tienen un papel esencial en el transporte del colesterol del tejido periférico hacia el hígado (transporte reverso del colesterol, TRC) (Fielding et al. 1995; Tall 1998; Angelín et al. 2002; Nofer et al. 2002).

6.2. Efecto de las HDL en la modulación del riesgo cardiovascular

6.2.1. Análisis clínico y genético de la variación de los niveles de HDL

Estudios clínicos y epidemiológicos han demostrado que los niveles bajos de HDL (hipoalfalipoproteinemia) es uno de los principales factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria, aún con niveles normales de colesterol total (Gordon et al. 1989; von Eckardstein et al. 2001). Es importante mencionar que más del 40% de los pacientes con infarto al miocardio, presentan niveles bajos de HDL (Genest et al. 1991).

En contraparte, niveles elevados de HDL (hiperalfalipoproteinemia, HA), han sido asociados a la disminución y al retardo de la formación de las lesiones ateroscleróticas en humanos (Genest et al. 1999; Stein et al. 1999).

La hiperalfalipoproteinemia se caracteriza por niveles elevados de HDL (>60 mg/dl) y longevidad (Luoma 1997). En la mayoría de los casos se sugiere una forma de herencia poligénica y multifactorial para esta condición. Sin embargo, existen reportes de familias con un patrón aparente de herencia autosómico dominante (Kuusi et al. 1989; Yamashita et al. 1991).

Para confirmar el efecto protector de las HDL, se han realizado estudios en animales transgénicos que sobre-expresan apo A-I (la apolipoproteína principal de las HDL), en un fondo genético aterogénico. Estos estudios han mostrado una fuerte inhibición en la progresión de la aterosclerosis, apoyando la hipótesis del efecto protector de las HDL (Rubin et al. 1991; Duverger et al. 1996; Benoit et al. 1999).

6.2.2. Mecanismos de acción de las HDL

El mecanismo por el cual las HDL reducen el riesgo de enfermedad arterial coronaria, aún no ha sido completamente dilucidado. El efecto protector de las HDL pudiera estar mediado principalmente por 4 mecanismos: 1) el transporte reverso del colesterol de tejido periférico hacia el hígado (Glomset et al. 1980; Ho et al. 1980; Hara et al. 1991); 2) la inhibición de la oxidación de las LDL (Mackness et al. 1998); 3) la inhibición de la expresión de las moléculas de adhesión

inducidas por citocinas en células endoteliales (Cockerill et al. 1995) y; 4) la activación de la sintasa endotelial de óxido nítrico (Yuhanna et al. 2001).

6.2.3. Clasificación de las HDL

Se han descrito diferentes subclases de HDL basándose en ciertas características fisicoquímicas y funcionales (Tabla 1). Una clasificación con base en su densidad de flotación (r), las distingue en HDL2 (1.063-1.125 g/mL) y en HDL3 (1.125-1.21 g/mL). Otros métodos de separación como la electroforesis en gradiente o filtración en gel, se han utilizado para afinar la clasificación de las HDL (Williams et al. 1993).

Las HDL son las lipoproteínas con mayor proporción proteica (55-60% de masa seca), siendo la apo A-I su apolipoproteína más abundante. La purificación de las HDL de sujetos normolipémicos, permitió identificar diferentes apolipoproteínas constituyentes de las HDL, como son apo A-I, A-II, A-IV. En ausencia de apo A-I, apo E es requerida para un metabolismo normal de las lipoproteínas con un porcentaje alto de triacilgliceroles (Duriez et al. 1999; Breslow 2001).

6.2.4. Estudios genéticos para la identificación de los loci asociados a la variación de los niveles de HDL en humanos

Estudios realizados en gemelos, sugieren que entre el 50-70% de la variación en los niveles de las HDL en humanos está determinada genéticamente (Whitfield et al. 1983; Heller et al. 1993). Es por ello, que algunos esfuerzos han sido orientados a tratar de identificar las variantes genéticas que determinan las concentraciones de HDL en el humano. Pero, debido a que en la mayoría de las familias, esta condición no parece co-segregar de forma mendeliana, sino como un rasgo complejo, la identificación de los genes involucrados en el metabolismo de las HDL se ha complicado, por lo que se conoce poco de las causas moleculares que lo condicionan (Hasstedt et al. 1984; Moll et al. 1986). A través del escrutinio del genoma, mediante un análisis de ligamiento genético, se han identificado al menos 22 loci diferentes, que modulan como un rasgo cuantitativo

(quantitative trait loci, QTL) los niveles de HDL. Sin embargo, los genes responsables ubicados en estas regiones, no han sido identificados aún (Mahaney et al. 1995; Peacock et al. 2001; Soro et al. 2002; Wang et al. 2002).

Adicionalmente, se han aplicado estrategias nuevas para la identificación de genes asociados a la variación de los niveles de HDL en la población general, tal es el caso del análisis de polimorfismos de un sólo nucleótido (single nucleotide polymorphisms, SNPs), para genes candidatos como el de la proteína transferidora de ésteres del colesterol (CETP), la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), entre otros, involucrados principalmente en el transporte reverso del colesterol (Knoblauch et al. 2002).

7. Transporte reverso del colesterol (TRC)

Uno de los mecanismos por medio del cual las HDL evitarían la formación de la placa ateromatosa, es el transporte reverso del colesterol, el cual se define como el regreso de colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje.

La identificación del gen del transportador transmembranal ABCA1 como el responsable de la hipoalfalipoproteinemia familiar (enfermedad de Tangier), así como de factores genéticos que regulan el metabolismo de las HDL y el transporte reverso del colesterol, han impulsado el interés en las HDL como posible blanco para estrategias terapéuticas nuevas contra el desarrollo de la aterosclerosis (Young et al. 1999; Tall y Wang 2000).

El transporte reverso del colesterol, inicia con la interacción del transportador transmembranal ABCA1 y las HDL nacientes, promoviendo el eflujo de colesterol y fosfolípidos de las células hacia las HDL. El colesterol captado por las HDL es enseguida esterificado por la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT). Esta esterificación provoca que el colesterol pierda su carácter anfipático, transformándose en una molécula hidrofóbica. En consecuencia, los ésteres de

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Introducción

colesterol abandonan la superficie de la lipoproteína para situarse en el interior de la partícula, aumentando el tamaño de la misma. El colesterol esterificado puede ser intercambiado por triacilgliceroles provenientes de las lipoproteínas que contienen apo B-100, principalmente VLDL e IDL. El intercambio de lípidos hidrofóbicos está facilitado por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP). Este transporte tiene como paso final, la unión de las HDL al receptor basurero B-I (SR-BI), el cual reconoce a las HDL maduras para su selectiva utilización en el hígado (Tall y Wang 2000) (figura 3).

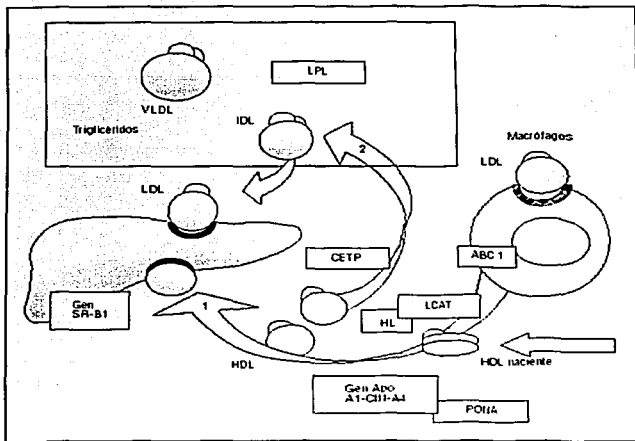


Figura 3. Esquema del mecanismo de transporte reverso del colesterol (TRC). La incorporación en los aceptores primarios de colesterol (partículas pre-b1 o HDL nacientes) y la esterificación de los mismos por la LCAT, dan origen a aumentos progresivos del tamaño de la HDL. El colesterol esterificado puede seguir dos rutas: 1) ser eliminado directamente de las HDL, a través de un mecanismo en el que interviene el receptor hepático SR-B1 o 2) por acción de la CETP ser intercambiado por triglicéridos provenientes de las lipoproteínas que contienen apo B, llegando así al hígado para su reciclamiento o excreción. Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipasa lipoproteica (LPL), receptor basurero B-1 (SR-B1), proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), transportador transmembranal (ABC1), lecitina:colesterol aciltransferasa, lipasa hepática (HL), paraoxonasa I (PON1).

7.1. Proteínas que promueven la producción de las HDL maduras

Para que el proceso complejo que significa el transporte reverso del colesterol se realice, es necesaria la participación de una gran variedad de proteínas. La función de estas proteínas, las mutaciones más importantes y/o

frecuentes y su relación con el desarrollo de la aterosclerosis en humanos y en modelos animales se describe a continuación.

7.1.1. Apolipoproteína A-I (apo A-I)

A través de estudios inmunológicos, se demostró a principios de los años 80's, que la principal proteína estructural de las HDL es la apolipoproteína-AI (apo A-I), presentando una correlación directa con los niveles de HDL. Apo A-I, es una proteína de 28 KDa, encontrada en una concentración promedio de 125 mg/dL en plasma humano. Esta proteína es sintetizada principalmente en hígado e intestino delgado y es el principal activador de la enzima lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) (Brewer et al. 1978). El gen apo A-I se ubica en el cromosoma 11 como parte de un grupo de genes (apo AI-CIII-AIV) (Tall 1996). La regulación de la síntesis de esta proteína se realiza fundamentalmente de forma transcripcional, a través de mecanismos complejos tejido específico (Ginsburg et al. 1995). El factor nuclear de hepatocitos 4 alfa (HNF4 α), es un regulador transcripcional de efecto positivo sobre el gen apo A-I (Fuernkranz et al. 1994).

Existen reportes de al menos 12 mutaciones diferentes en el gen apo A-I (Sviridov et al. 2002), algunas de las más interesantes debido al fenotipo asociado son: la mutación milano (R173C) identificada en una familia italiana, asociada con longevidad y con incremento en el catabolismo de HDL sin aumento en el riesgo de la enfermedad arterial coronaria. La incongruencia de este estado metabólico, se trató de explicar argumentando que esta mutación, da origen a una proteína más eficaz en cuanto al eflujo de colesterol (Franceschini et al. 1980; Li et al 1999). Otro tipo de mutación muy similar a la milano es la mutación paris (R151C). El perfil lipídico y el bajo riesgo de aterosclerosis observado en los pacientes, es similar al presentado con la mutación milano (Bielicki et al. 2002). Finalmente, otra mutación interesante es la mutación pisa (L141R), la cual a diferencia de las otras dos mutaciones mencionadas, está asociada con niveles bajos de HDL, opacidad corneal y enfermedad arterial coronaria (Miccoli et al. 1996). Estos hallazgos sugieren que existe variabilidad en el desarrollo de

ateroesclerosis dependiendo de la mutación presentada en el gen apo A-I (Breslow 2001).

Estudios en modelos animales, sugieren que la modulación de los niveles de HDL y apo A-I representan un posible blanco terapéutico contra el desarrollo de aterosclerosis. Por ejemplo, se ha observado que el modelo de ratón aterogénico por deficiencia de apo E presenta inhibición en la progresión de la aterosclerosis, debido a la infusión repetida de HDL o apo A-I de forma directa en la arteria. De igual forma, la sobre-expresión de apo A-I en este mismo modelo, inhibe el desarrollo de aterosclerosis (Paszty et al. 1994; Plump et al. 1994).

En vista del papel protector de la apo A-I, se podría predecir la formación prematura de ateromas en ausencia total de esta proteína. No obstante, en un estudio realizado en ratones a los cuales se les eliminó el gen apo A-I, no desarrollaron lesiones ateroscleróticas mayores, ni más tempranas que el grupo de ratones control (Li et al. 1993). Para reconciliar las observaciones hechas en los ratones que no expresan la apo A-I, algunos investigadores han argumentado que otras apolipoproteínas, particularmente la apo E, podrían desempeñar la función de captar el colesterol de los tejidos periféricos para su eliminación (Huang et al. 1994).

7.1.2. Transportador ABCA1

La proteína ABCA1 forma parte de un grupo de transportadores transmembranales altamente conservados (Santamarina-Fojo et al. 2000), presenta dos regiones de unión a ATP, y dos dominios transmembranales. En forma análoga a las proteínas de resistencia a múltiples drogas, se ha sugerido que los dominios transmembranales forman un canal en la membrana plasmática a través del cual los fosfolípidos y colesterol son transferidos al exterior de la membrana (Hamon et al. 2000). ABCA1, se expresa en la mayoría de los órganos, pero su expresión más alta es en tejido fetal, placenta, pulmón, glándulas suprarrenales e hígado (Langmann et al. 1999), teniendo en este último, una función clave en la homeostasis del colesterol (Basso et al. 2003).

La enfermedad de Tangier, es un padecimiento recesivo asociado con la acumulación de colesterol en el sistema retículo endotelial y una marcada reducción de HDL (<10 mg/dl) (hipoalfalipoproteinemia familiar) y Apo A-I, como resultado de un catabolismo acelerado de las mismas (Assman et al. 2001). Recientemente, a través de análisis de ligamiento y clonación posicional, tres grupos de investigación identificaron de manera independiente al gen humano ABCA1, como responsable del fenotipo de la enfermedad de Tangier, demostrando la importancia fisiológica de ABCA1 en el mantenimiento de la integridad metabólica de las HDL (Brooks-Wilson et al. 1999; Bodzioch et al. 1999; Rust et al. 1999).

El gen ABCA1 está localizado en el cromosoma 9 en la región q31 y comprende 50 exones (Santamarina-Fojo et al. 2000). El transcrito de este gen es de 6,789 pb (Pullinger et al. 2001) y se traduce en una proteína de 2,261 aminoácidos (Santamarina-Fojo et al. 2000; Pullinger et al. 2001), 60 aminoácidos más de lo originalmente reportado (Assmann et al. 2001).

De manera interesante, individuos heterocigotos para mutaciones en el gen ABCA1 también presentan niveles reducidos de HDL y apo A-I. En heterocigotos obligados se ha observado un riesgo aumentado de enfermedad arterial coronaria. Estas características sugieren un efecto dependiente de dosis génica para la expresión del fenotipo ocasionado por las alteraciones en el gen ABCA1 (Young et al. 1999; Tall y Wang 2000). La contribución de ABCA1 en la variación en los niveles de HDL en la población general no ha sido claramente establecida aún. Estudios recientes, han sugerido que distintos SNPs ubicados en regiones no codificantes del gen ABCA1 regulan la expresión del mismo, y éstos pudieran estar asociados al desarrollo de aterosclerosis, ya sea modificando o no los niveles de las lipoproteínas (Lutucuta et al. 2001; Zwarts et al. 2002).

La relación de ABCA1 con el aumento al riesgo de aterosclerosis, ha sido sugerida en ratones deficientes de *Abc1* (-/-), debido a que éstos presentan niveles bajos de HDL y acumulación de lípidos en macrófagos, dándoles la apariencia de células espumosas, lo que mimetiza el inicio del proceso aterosclerótico en humanos (McNeish et al. 2000). De forma interesante, cuando

el ratón deficiente de *Abc1* fue reconstituido con células de médula ósea normal (incluyendo macrófagos), los niveles de HDL y apo A-I incrementaron sólo ligeramente (Haghpasand et al. 2001). Por lo que, aunque los macrófagos son las células más afectadas por la deficiencia de *Abc1*, se cree que éstos contribuyen poco en la regulación de los niveles de apo A-I y HDL en plasma (Abisman et al. 2001).

Estudios posteriores, han mostrado que la deficiencia total de *Abc1* no está asociada a la aterosclerosis en ratones deficientes del receptor LDL o apo E (van Eck et al. 2002). Sin embargo, la deficiencia selectiva de *Abc1* en macrófagos, incrementó de manera significativa la aterosclerosis en estos mismos modelos animales (van Eck et al. 2002; Aiello et al. 2002).

El conocimiento de la función de los transportadores ABC y la naturaleza de sus sustratos translocados es todavía insipiente, por lo que se espera que trabajos futuros nos permitan evaluar la importancia de estos transportadores en la patogénesis de padecimientos poligénicos como lo es la aterosclerosis.

7.1.3. Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs)

Los PPARs son factores de transcripción dependientes de ligando que forman una subfamilia de la superfamilia de los receptores nucleares hormonales, los cuales regulan el metabolismo de los lípidos y la glucosa, además de estar involucrados en la diferenciación celular (Pineda-Torra et al. 1999).

Tres isoformas de PPARs han sido identificadas (PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ) cada una de ellas codificada por un gen diferente. Dos de estas isoformas (α y γ) han sido asociadas al desarrollo o inhibición de la aterosclerosis.

PPAR α es expresado en concentraciones altas en el hígado, músculo cardiaco, riñón y células de la pared arterial. Por su parte, PPAR γ es expresado en concentraciones altas principalmente en el tejido adiposo blanco. Los receptores PPAR α y PPAR γ han sido detectados también en casi el 60% de las placas ateroscleróticas presentes en arterias coronarias y carótidas humanas (Fruchart et al. 1999; Duval et al. 2002).

Recientemente, se reportó que la activación de PPAR α y PPAR γ induce la expresión del gen que codifica para el transportador ABCA1. Este transportador controla la salida de colesterol mediada por apoA-I en macrófagos, a través de un mecanismo de inducción del receptor LXR α (Liver X receptor α). Resulta interesante que la activación de estos PPARs incrementa la salida de colesterol mediada por apo A-I en macrófagos normales, pero no en macrófagos aislados de pacientes con la enfermedad de Tangier, dejando de manifiesto la importancia del transportador ABCA1 en este proceso. Estos hallazgos sugieren que los PPARs tienen una función importante en el primer paso del transporte reverso del colesterol, a través de la activación de la salida de colesterol mediado por el transportador ABCA1 (Chinetti et al. 2001; Moore et al. 2001).

Se han identificado diversos polimorfismos en el gen PPAR α (L162V, alelo C en intrón 7) asociados a variaciones en los niveles de lípidos plasmáticos y a la progresión de la aterosclerosis en el humano (Flavell et al. 2002). Sin embargo, estos datos contrastan con los obtenidos en estudios en modelos animales, en los que se sugiere que la ausencia de PPAR α en ratones con disrupción del gen apo E, puede proteger contra el desarrollo de aterosclerosis (Tordjman et al. 2001).

Por otra parte, los estudios iniciales con activadores de la expresión de PPAR γ en macrófagos, proporcionaron resultados contradictorios acerca del papel de este receptor en el desarrollo de la aterosclerosis. Algunos de estos estudios, proponen un sistema de retro-alimentación positivo que promueve la formación de células espumosas a través de la activación de PPAR γ (Ricote et al. 1998; Jiang et al. 1998). Sin embargo, este modelo contrasta con los resultados obtenidos con activadores de PPAR γ , en modelos animales con un fondo genético aterogénico y en macrófagos humanos, en los que la incidencia de aterosclerosis no sólo no aumentaba, sino que se reduce (Li et al. 2000; Claudel et al. 2001).

Recientemente, se han obtenido datos nuevos que parecen relacionar las acciones anti-aterogénicas de las HDL con el mecanismo de acción del PPAR γ . Para tratar de explicar esta relación, se ha propuesto que las HDL inducen la

expresión y translocación al núcleo, así como la fosforilación del PPAR γ , dando como resultado, la inhibición de la expresión de genes diana de este gen. Uno de los genes afectados es el receptor basurero CD36. Este receptor se ha asociado a la formación de células espumosas, por lo que su inhibición, podría explicar la disminución en el desarrollo de aterosclerosis (Chinetti et al. 2001).

En humanos, un polimorfismo frecuente (Pro12Ala) de PPAR γ ha sido asociado con diferentes patologías, como son la diabetes mellitus tipo 2 (confiere resistencia), la obesidad y recientemente con un riesgo reducido a infarto al miocardio (Altshuler et al. 2000; Ek et al. 1999; Hamann et al. 1999; Ridker et al. 2003).

En resumen, los PPARs desempeñan un papel importante en muchos de los procesos celulares y moleculares implicados en la aterosclerosis. La modulación farmacológica de la actividad de estos receptores, podría ayudar a prevenir o tratar la enfermedad arterial coronaria, por lo que representan un futuro prometedor en la prevención y tratamiento de la aterosclerosis.

7.2. Proteínas asociadas al metabolismo y transporte de las HDL

7.2.1. Lecitina : colesterol aciltransferasa (LCAT)

La LCAT fue propuesta en los años 60's como una enzima importante para el metabolismo intravascular de las HDL (Glomset et al. 1966). El gen de la lecitina:colesterol aciltransferasa fue mapeado en la banda q22 del cromosoma 16 (Teisberg et al. 1974). Esta enzima (LCAT) es sintetizada principalmente por hepatocitos y se propone que su función es la de transferir un grupo acilo de la posición sn2 de una fosfatidilcolina hacia un grupo hidroxilo del colesterol, resultando en la formación de un éster de colesterol hidrofóbico que se desplaza hacia el núcleo de las HDL, contribuyendo a la formación de las HDL esféricas (Albers et al. 1981). La sobre-expresión de la lecitina:colesterol aciltransferasa en ratones y conejos resulta en niveles incrementados tanto de HDL como de apo A-I, aumentado de igual manera la velocidad del transporte reverso del colesterol

(Hoeg et al. 1996; Berard et al. 1997). La deficiencia de lecitina:colesterol aciltransferasa en ratones y en humanos se manifiesta en una marcada disminución en la formación de ésteres de colesterol en las HDL y niveles reducidos tanto HDL y Apo A-I, aunado a un incremento en el catabolismo de Apo A-II (Ng et al. 1997; Kuivenhoven et al. 1997). La sobre-expresión de la lecitina:colesterol aciltransferasa parece estar asociada a la disminución del desarrollo de la aterosclerosis, ya que conejos y ratones deficientes del RLDL o apo E con sobre-expresión de la LCAT presentan protección al desarrollo de aterosclerosis (Hoeg et al. 1996; Ng et al. 2002; Mertens et al. 2003).

Estudios realizados en pacientes homocigotos para la deficiencia familiar de la lecitina:colesterol aciltransferasa, muestran un riesgo alto de isquemia coronaria. Sin embargo, la enfermedad del ojo de pescado (deficiencia de LCAT) es una excepción. Esta enfermedad presenta una forma de herencia recesiva y se caracteriza clínicamente por el depósito progresivo de colesterol alrededor de la cornea, dándole un aspecto singular del que deriva el nombre de la enfermedad. Los sujetos con esta patología presentan hipoalfalipoproteinemia grave asociada a hipertrigliceridemia moderada, pero no tienen un riesgo elevado de aterosclerosis, particularmente las mujeres (Elkhalil et al. 1997; Kuivenhoven et al. 1997).

Estos antecedentes sugieren que la sobre-expresión de la lecitina:colesterol aciltransferasa en humanos provocaría un aumento en los niveles de HDL y Apo A-I, pero no es claro si este aumento podría proteger contra el desarrollo de enfermedad arterial coronaria.

7.2.2. Lipasa lipoproteica (LPL)

La lipasa lipoproteica pertenece a una familia de genes que incluye a la lipasa hepática (LH), lipasa pancreática y la recientemente descrita lipasa endotelial (LE). Todos los miembros de esta familia presentan un sitio catalítico similar de serina activa (Goldberg et al. 1996). Estudios de ligamiento genético, han permitido localizar al gen de la lipasa lipoproteica en el cromosoma 8 en la banda p22 (Emi et al. 1993). La lipasa lipoproteica es sintetizada principalmente

en el músculo esquelético, el músculo cardíaco y en los adipocitos. Posteriormente, es transportada y unida al endotelio capilar a través de los proteoglicanos sulfato de heparina. La función de la lipasa lipoproteica es la de hidrolizar los triacilgliceroles contenidos en los quilomicrones y las VLDL. Algunos estudios sugieren que los fosfolípidos y apolipoproteínas que son disociados de estas lipoproteínas son adquiridos por las HDL (Merkel et al. 2002). La actividad de la lipasa lipoproteica es regulada por procesos intracelulares, siendo inactiva cuando no está glucosilada y activa cuando forma un homodímero. Para la dimerización de la lipasa lipoproteica se ha comprobado que no se requiere la participación de los proteoglicanos de sulfato de heparina (Berryman et al. 1995). La activación máxima de la lipasa lipoproteica requiere la presencia de la apo C-II contenida tanto por lipoproteínas ricas en triglicéridos como por las HDL (Havel et al. 1973; Shen et al. 2002).

Estudios realizados en ratones transgénicos que sobre-expresan la lipasa lipoproteica, han mostrado que no existe una asociación consistente con los niveles elevados de HDL (Clee SM 1997). La sobre-expresión tejido-específica de la lipasa lipoproteica en el músculo esquelético provoca niveles normales de triacilgliceroles y niveles bajos de HDL (Levak-Frank et al. 1997). En contraparte, cuando la lipasa lipoproteica es sobre-expresada en músculo cardíaco se presentan valores normales tanto de triglicéridos como de HDL (Levak-Frank et al. 1999), lo que pudiera sugerir, un proceso de expresión regulado tejido específico, que afecta de manera diferencial los niveles de HDL.

La sobre-expresión de la lipasa lipoproteica en ratones deficientes de receptor LDL, ha sido asociada con niveles reducidos de colesterol en plasma y bajo riesgo de aterosclerosis (Shimada et al. 1996). En ratones homocigotos para la deficiencia de la lipasa lipoproteica se ha observado una quilomicronemia drástica, disminución en los niveles de HDL y muerte neonatal después de 1-2 días de vida (Weinstock et al. 1995; Coleman et al. 1995). Ratones heterocigotos para la deficiencia de la lipasa lipoproteica, presentan hipertrigliceridemia intermedia y problemas para el catabolismo de las VLDL (Weinstock et al. 1995).

En humanos, se han descrito cerca de 100 mutaciones en el gen de la lipasa lipoproteica, la mayoría de las cuales son mutaciones sin sentido localizadas principalmente en los exones 5 y 6 (Merkel et al. 2002). Estas mutaciones se encuentran en pacientes con deficiencia de lipasa lipoproteica, ya sea en forma homocigota o heterocigota compuesta, causando un síndrome conocido como quilomicronemia familiar. Sin embargo, se han reportado mutaciones heterocigotas en pacientes con niveles elevados de triglicéridos, niveles bajos de HDL e hiperlipidemia combinada. Todas estas patologías asociadas comúnmente al desarrollo de enfermedad arterial coronaria (Brunzell y Deeb 2001). Existen algunas mutaciones frecuentes en el gen de la lipasa lipoproteica, por ejemplo, D9N y N291S. Estas mutaciones ocurren en el 4-5% de la población general y en el 10% en los pacientes con hipercolesterolemia familiar, resultando en niveles bajos de HDL y niveles elevados de triglicéridos, condicionando a estos pacientes a un riesgo incrementado al desarrollo de enfermedad arterial coronaria (Wittekoek et al. 1998). Sin embargo, también existe una mutante (Ser477Paro) asociada con niveles elevados de HDL y riesgo reducido de enfermedad arterial coronaria (Groenemeijer et al. 1997; Hokanson 1999;), lo que sugiere que algunas alteraciones en el gen de la lipasa lipoproteica en humanos, pueden disminuir el riesgo al desarrollo de aterosclerosis.

7.2.3. Lipasa hepática (LH)

La lipasa hepática es una enzima lipolítica que se expresa principalmente en el hígado. Esta enzima se encuentra unida al endotelio vascular del hígado, ovarios y glándulas suprarrenales, a través de los proteoglicanos sulfato de heparina (Brunzell y Deeb 2001; Perret et al. 2002). El gen de la lipasa hepática se ubica en la banda q21-23 del cromosoma 15 (Sparkes et al. 1987). La lipasa hepática tiene como función hidrolizar triglicéridos y fosfolípidos presentes principalmente en remanentes de quilomicrones, IDL y HDL. Esta enzima tiene un papel importante en el metabolismo de las HDL *in vivo*, ya que transforma las HDL largas (HDL2) en HDL pequeñas (HDL3) (Santamarina-Fojo et al. 1998; Weng et al. 1999; Zambon et al. 2003). La lipasa hepática sirve de co-factor para el

metabolismo selectivo del colesterol de las HDL mediado por el receptor SR-BI (Lambert et al. 1999). La actividad de la lipasa hepática se ve suprimida por el estradiol e incrementada por la testosterona, sugiriendo uno de los mecanismos a través del cual, las hormonas afectan los niveles de HDL. (Brinton et al. 1996; Tan et al. 1998).

Estudios en modelos animales (ratones y conejos) que sobre-expresan la lipasa hepática han mostrado niveles bajos de HDL, pero sin evidencias claras de aterosclerosis, mientras que los ratones con deficiencia de lipasa hepática presentan un ligero aumento en los niveles de HDL, con efectos tanto pro- como anti-aterogénico (Busch et al. 1994; Fan et al. 1994). En ratones que presentan inhibición de la actividad de la lipasa hepática por sobre-expresión de apo A-II, se observa un aumento en los niveles de HDL, pero con presencia de aterosclerosis (Hedrick et al. 2001). En otro modelo murino deficiente de apo E (fondo aterogénico), la deficiencia de lipasa hepática disminuye el tamaño de las placas ateroscleróticas en la aorta (Mezdour et al. 1997). Estos datos controversiales, demuestran lo complejo que puede ser interpretar los efectos de los niveles de HDL en el desarrollo de la aterosclerosis.

En humanos, la actividad alta de la lipasa hepática está asociada con niveles bajos de HDL, mientras que la deficiencia de lipasa hepática está asociada con un modesto aumento de las HDL grandes. Existen reportes de polimorfismos en el locus de la lipasa hepática asociados a riesgo aumentado de enfermedad arterial coronaria, pero estos son inconsistentes en diferentes estudios (Cohen et al. 1999).

En conclusión, la inhibición de la actividad de la lipasa hepática podría aumentar modestamente los niveles de HDL, pero difícilmente se podría pronosticar el efecto del aumento de las HDL sobre la aterosclerosis.

7.2.4. Lipasa endotelial (LE)

La lipasa endotelial fue caracterizada funcionalmente como un miembro de la familia de las lipasas, es sintetizada en las células endoteliales. El gen de la lipasa endotelial se encuentra ubicado en la banda q21 del cromosoma 18. La

lipasa endotelial presenta sitios de unión a lipoproteínas y heparina, altamente conservados en las otras lipasas. Esta lipasa utiliza como sustrato principal a los fosfolípidos, los cuales al ser hidrolizados de las HDL, provocan la liberación de ácidos grasos y la generación de HDL pequeñas (Jayne et al. 1999; Hirata et al. 1999). La sobre-expresión de la lipasa endotelial en ratones produce niveles bajos tanto de HDL y Apo A-I (Jayne et al. 1999). Estudios recientes han evidenciado la participación de la lipasa endotelial como un determinante principal en la variación de los niveles de HDL (Ishida et al. 2003; Ma et al. 2003).

En el humano, se han identificado seis variantes génicas asociadas a niveles elevados de HDL, pero se desconoce si estas variantes afectan el riesgo a enfermedad arterial coronaria (deLemos et al. 2002).

7.2.5. Proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP)

La proteína transferidora de ésteres de colesterol es una glucoproteína hidrofóbica sintetizada en hígado, intestino delgado, bazo, tejido adiposo, glándulas suprarrenales, riñón, corazón y músculo esquelético (Lagrost et al. 1994; Tall 1993). La CETP realiza la transferencia de ésteres de colesterol contenidos en las HDL por triglicéridos de las lipoproteínas IDL y VLDL (Tall 1990).

Individuos homocigotos para la deficiencia de CETP han sido reportados en población japonesa. Estos sujetos presentan un incremento marcado en los niveles de las HDL y apo A-I, además de una disminución significativa en el catabolismo de apo A-I (Inazu et al. 1990; Ikewaki et al. 1993). La deficiencia de CETP en estos pacientes es ocasionada principalmente por dos mutaciones, una en el sitio de corte y empalme del intrón 14 y otra en el exón 15 (Hirano et al. 1993; Sakai et al. 1995). En población general, una de las variaciones genéticas más estudiadas es el polimorfismo TaqIB en el intrón 1, cuya variante alélica TaqIB, ha sido asociada con la disminución en la actividad de la proteína transferidora de ésteres de colesterol, así como a niveles incrementados de HDL y disminución del riesgo de enfermedad arterial coronaria (Boekholdt et al. 2003; Ritsch y Patsch 2003). La deficiencia de CETP fuera de la población japonesa es poco frecuente, sin embargo, se han descrito individuos con

hiperalfalipoproteinemia (HA) (niveles elevados de HDL) por deficiencia de CETP en población caucásica (Teh et al. 1998).

El efecto de la proteína transferidora de ésteres de colesterol sobre el desarrollo de la aterosclerosis en modelos animales no ha sido totalmente dilucidado aún, ya que existen reportes en modelos murinos que sugieren un aumento en el riesgo al desarrollo de aterosclerosis, debido a la sobre-expresión de CETP. Mientras que otros estudios indican aterosclerosis reducida en ratones con hipertrigliceridemia por la sobre-expresión de CETP (Plump et al. 1999; Hayek et al. 1995). Esto sugiere, que el efecto de la sobre-expresión de CETP sobre la aterosclerosis pudiera estar modulado por el metabolismo de las LDL y VLDL (Ritsch y Patsch 2003), y que en estos modelos animales la sobre-expresión de CETP es pro-aterogénica en casos de hipercolesterolemia o hiperlipidemia combinada pero podría ser anti-aterogénica en combinación con hipertrigliceridemia o hiperalfalipoproteinemia (Barter et al. 2003).

Por otro lado, existen reportes de individuos identificados con hiperalfalipoproteinemia debido a la deficiencia de CETP, con un aparente efecto anti-aterogénico (Moriyama et al. 1998). Para tratar de entender el impacto de la deficiencia de CETP sobre el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria en humanos, se realizó un amplio estudio epidemiológico con individuos heterocigotos para la deficiencia de CETP, que presentan una modesta elevación en los niveles de HDL. Este estudio sugiere asociación con un riesgo incrementado de enfermedad arterial coronaria (Zhong et al. 1996).

Lo ambiguo de la relación de CETP con la aterosclerosis puede ser explicado por dos líneas diferentes: a) efecto aterogénico; cuando la variación genética en CETP está acompañada de diferentes alteraciones en el metabolismo de lípidos (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, etc.); y b) CETP puede tener más de una función, por lo que dichas funciones pueden ser afectadas de formas diferentes por variantes genéticas distintas, explicando así el efecto pro- o anti-aterogénico observado en diversos estudios.

7.3. Receptor de las HDL

7.3.1. Receptor Basurero tipo B clase I (SR-BI)

En 1996, Acton y colaboradores identificaron a SR-BI, un receptor que forma parte de la familia de proteínas relacionadas a CD36. El receptor SR-BI es una proteína palmitoilada de superficie, que fija lipoproteínas como HDL y LDL, así como colesterol libre no asociado a lipoproteínas (Stangl et al. 1998). Esta proteína, ha sido considerada como el primer receptor activo de las HDL, siendo capaz de facilitar la captación selectiva de HDL, sin mediar su endocitosis ni degradación (Acton et al. 1996; Landschulz et al. 1996). El mecanismo de captación celular del colesterol de las HDL, es diferente al proceso de endocitosis de las lipoproteínas mediado por receptores de superficie celular. Por el contrario, las HDL se unen de manera saturable y con alta afinidad a la superficie celular. El colesterol de las HDL es transferido selectivamente al interior de las células. Las partículas de HDL sin colesterol se disocian de las células retornando al medio extracelular. Los mecanismos celulares y moleculares específicos, por medio de los cuales se lleva a cabo la captación selectiva del colesterol de las HDL, se desconocen aún (Trigatti et al. 2000; Siver y Tall 2001).

A través de estudios de inmunodetección, se analizó la distribución tisular del receptor SR-BI en ratones, encontrándose que este receptor se expresa principalmente en los tejidos más importantes para el metabolismo de las HDL, como son: hígado, glándulas suprarrenales y ovario (Kozarsky et al. 1997).

Estudios realizados en ratones con sobre-expresión hepática del receptor SR-BI, mostraron una disminución significativa de los valores plasmáticos de las HDL (Rogotti et al. 1997; Wang et al. 1998; Ueda et al. 1999). El proceso a través del cual disminuyen los niveles plasmáticos de HDL en este modelo murino se desconoce aún (Acton et al. 1996; Kozarsky et al. 1997).

En un modelo de ratón deficiente del receptor SR-BI, se evidenció un aumento del 120% del colesterol total plasmático, lo que pudiera ser explicado por el aumento del colesterol de las HDL, pero sin cambio evidente en los niveles de apo A-I (Varban et al. 1998). Además, este modelo permitió demostrar una disminución en la depuración selectiva del colesterol de las HDL, haciendo patente

la relevancia del receptor SR-BI en la etapa final del transporte reverso del colesterol.

En conjunto, estos estudios sugieren un efecto anti-aterogénico asociado a la sobre-expresión del receptor SR-BI en ratón, a pesar de los niveles reducidos de HDL (Krieger y Kozarsky 1999).

En un estudio reciente realizado por Tai y colaboradores (2003), en 77 pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigota, se identificaron 2 polimorfismos en el gen del receptor SR-BI asociados con la variación de triglicéridos y lipoproteínas (VLDL y LDL) en plasma, confirmando la importancia del receptor SR-BI en el metabolismo de estas lipoproteínas en humanos.

De confirmarse la relevancia fisiológica del receptor SR-BI en el metabolismo de las HDL en humanos, podría considerarse como un objetivo nuevo para la prevención y tratamiento de la aterosclerosis.

7.4 Otras proteínas asociadas a las HDL

7.4.1. *Paraoxonasa-1 (PON1)*

La paraoxonasa-1 es una proteína de 354 aminoácidos con una masa molecular relativa de 43 kDa (Primo-Parmo et al. 1996; Mackness et al. 1996). El gen de la paraoxonasa-1 está ubicado en el brazo largo del cromosoma 7 (q21.3-q22.1) (Hegele RA 1999). En plasma, la paraoxonasa-1 se encuentra casi exclusivamente localizada en las HDL. Esta proteína ha sido considerada como el componente más probable de las HDL, que explica la habilidad de éstas para metabolizar peróxidos de lípidos y proteger contra la oxidación a las LDL (LDL oxidadas) (Mackness et al. 1991; 1993). Estudios realizados con ratones deficientes de paraoxonasa-1 mostraron que las HDL carecían de efecto protector contra la oxidación de las LDL (Shih et al. 1998). Resultados similares fueron obtenidos con inhibidores de la paraoxonasa-1, sugiriendo la participación de esta proteína en el efecto anti-oxidante de las HDL (Aviram et al. 1998).

Estudios realizados en pacientes con enfermedad de Tangier (deficiencia del transportador ABCA1) y con enfermedad del ojo de pescado (deficiencia de

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Introducción

LCAT), mostraron niveles bajos de paraoxonasa-1 en plasma (Mackness et al. 1987; 1989). Numerosos estudios en humanos, han permitido identificar dos polimorfismos en el gen de la paraoxonasa-1 (M55L y R192Q) que afectan la actividad anti-oxidativa de las HDL. Homocigotos para estas variantes (homocigotos 92R y homocigotos 55L) muestran un riesgo aumentado de enfermedad arterial coronaria (Ruiz et al. 1995; Serrato et al. 1995; Sanghera et al. 1998; Salonen et al. 1999).

II. Planteamiento del problema

Se identificó una familia que presenta de manera conjunta dos alteraciones genéticas, hipercolesterolemia familiar (HF) e hiperalfalipoproteinemia (HA, niveles > 60mg/dL de HDL), ambas condiciones segregan de manera independiente y cada una de ellas muestra un patrón sugerente de herencia autosómica dominante. Resulta interesante que en los individuos de esta familia que presentan ambos rasgos (hipercolesterolemia familiar e hiperalfalipoproteinemia) se observa un efecto protector contra el desarrollo de enfermedad arterial coronaria prematura. En los individuos de la familia con hipercolesterolemia familiar sin hiperalfalipoproteinemia, la aterogenicidad del padecimiento se hizo evidente. Por lo que esta familia, constituye un modelo valioso para el estudio bioquímico y molecular de los defectos genéticos que condicionan a la enfermedad arterial coronaria o bien la protección contra el desarrollo de aterosclerosis.

En este trabajo se planteó identificar el locus responsable de la hipercolesterolemia familiar, así como el locus condicionante para el fenotipo de hiperalfalipoproteinemia. La estrategia propuesta consistió en evaluar la posible participación de genes candidatos a través de ligamiento genético, tanto para la hipercolesterolemia familiar, como para genes que participan en la regulación de los niveles de HDL. En caso de no encontrar ligamiento genético para ninguno de los genes candidatos conocidos, habría de realizarse un escrutinio del genoma, utilizando marcadores genéticos del tipo microsátélites distribuidos de manera uniforme en todos los autosomas.

La identificación del locus responsable de la hipercolesterolemia familiar en esta familia, contribuirá al conocimiento del mecanismo fisiopatológico asociado a la presencia de hipercolesterolemia y su efecto en el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria. Asimismo, la identificación del locus para la hiperalfalipoproteinemia, proporcionará elementos nuevos para elucidar algunas de las alteraciones en los mecanismos fisiológicos, que originan niveles plasmáticos elevados de HDL y su posible efecto cardioprotector.

III. HIPÓTESIS

Debido a la estructura genealógica de la familia en estudio, y la información clínica y bioquímica con la que se cuenta, es posible, a través de ligamiento genético la identificación tanto del locus causante de la hipercolesterolemia familiar, como del locus responsable de la hiperalfalipoproteinemia asociada al efecto protector anti-aterogénico que presentan los individuos diagnosticados con hipercolesterolemia familiar en esta familia.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Identificar el locus responsable de la hipercolesterolemia familiar, así como el locus condicionante para el fenotipo de hiperalfalipoproteinemia en la familia en estudio.

2. Objetivos Específicos

- Evaluar la participación de posibles genes candidatos para la hipercolesterolemia familiar, como son el gen del receptor LDL y el gen de la apo B, a través de ligamiento genético utilizando marcadores microsátélites ligados a cada uno de éstos genes.
- Analizar los niveles de proteína del receptor LDL, así como el proceso de endocitosis del mismo en individuos con hipercolesterolemia familiar de la familia.
- Evaluar la participación de posibles genes candidatos para la hiperalfalipoproteinemia, incluyendo principalmente los genes de las proteínas involucradas en el transporte reverso del colesterol.
- En caso de que ninguno de los genes candidatos sea el responsable de las alteraciones lipídicas en estudio (hipercolesterolemia familiar e hiperalfalipoproteinemia), realizar un escrutinio completo del genoma (autosomas).

V. SUJETOS Y MÉTODOS

1. Familia en estudio

1.1. Características clínicas

Hipercolesterolemia familiar heterocigota (HF) e hiperalfalipoproteinemia (HA).

Se estudió una familia con hipercolesterolemia familiar (familia CGZ) originaria de Mazatlán, Sinaloa, a partir de la identificación del caso índice, una mujer de 94 años de edad, cuya primer evaluación se le practicó a los 88 años. La propósitos fue remitida al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", donde fue diagnosticada con gastritis e hipertensión arterial. La paciente refirió hábitos de fumar de los 15-30 años. A la edad de 91 años sufrió episodios isquémicos transitorios. Un ultrasonido Doppler de las arterias carótidas mostró placas múltiples sobre ambos lados, especialmente sobre la arteria carótida izquierda. La lesión más grande causó un 50% de obstrucción de la luz arterial. Los síntomas desaparecieron después del tratamiento con dipiridamol. Se le diagnosticó hipercolesterolemia (425 mg/dL) y la paciente fue referida a la Clínica de Lípidos. Un examen físico mostró: un índice de masa corporal de 24.6 y una presión sanguínea de 140/80 mm Hg. Se detectaron, asimismo, xantomas en los tendones de Aquiles y arcus corneal simétrico, estos hallazgos fueron confirmados por ultrasonido. Los niveles de hormona estimulante de la tiroides en la paciente fueron normales. Un perfil de lípidos completo mostró los resultados siguientes: colesterol total de 395 mg/dL, LDL-C 220 mg/dL, HDL-C 98 mg/dL, apoA-I 190 mg/dL y triglicéridos 110 mg/dL. Se detectaron también niveles elevados de Lp(a) (136 mg/dL).

La paciente siguió de forma irregular en tratamiento con lovastatina (20 a 40 mg/día) y una dieta baja en grasas. Análisis de lípidos posteriores, mostraron los resultados siguientes: CT 281±21 mg/dL, LDL-C 179±18 mg/dL, HDL-C 90±8 mg/dL y TG 131±29 mg/dL.

La historia familiar fue compatible con el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar heterocigota (HF). El hermano de la probando (II3) presentó xantomas

tendinosos y un perfil de lípidos similar (Tabla 2). El probando (II2) tiene 3 hijos, su hijo mayor (III1) murió a los 52 años de edad debido a infarto al miocardio y su perfil de lípidos fue compatible con HF. Su segundo hijo (III3) y su hija (III4) están también afectados, de acuerdo a su perfil de lípidos y la presencia de xantomas.

Se estudiaron treinta y seis miembros de la familia (Tabla 2). Doce de ellos se consideraron como afectados con hipercolesterolemia familiar con base en los criterios propuestos por Kwiterovich (Kwiterovich et al. 1993). Todos los individuos afectados presentaron niveles de LDL-C > a la percentila 90 de acuerdo a edad y género en la población mexicana (Aguilar-Salinas et al. 2001).

El protocolo para la investigación con pacientes con hipercolesterolemia familiar y sus familiares fue aprobado por la Comisión de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Antes de efectuar este estudio se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes y familiares por medio de una carta de consentimiento (Anexo 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Sujetos y Métodos

Tabla 2. Características clínicas de los miembros de la familia

ID	Edad	Genero	HF	HA	EAC	CT	LDL	TG	HDL	apoA-I	Lp(a)	apoE	XANT	Comentarios
II2	94	F	1	1		289	220	94	84	210	136	3/3	+	Hipertensión
II3	84	M	1	1		323	185	170	77	199		3/3	+	
II5		M	1	1										Falleció (75 años)
III1		M	1	0	52								+	
III2	48	F	0	0		168	103	160	33				3/4	
III3	52	M	1	0	49	305	207	147	48				3/4	+
III4	57	F	1	1		284	185	110	77	156	5.8		3/3	+
III6	50	F	0	0		215	135	136	52				3/4	
III8	43	F	0	1		186	105	80	65				3/3	
III9	45	M	0	0		193	120	17	39				3/3	
III10	49	F	1	0		246	185	185	57				nd	+
III11	52	M	0	0		217	127	303	29				nd	
III12	45	F	0	1		216	134	80	66	166			3/4	
III13	41	F	0	0		251	129	394	43				nd	
III15	31	F	0	1		184	97	57	75	165			nd	
III16	49	F	0	1		247	172	105	69	218	50.1		3/4	
III18	49	M	1	1		274	214	86	62		82.8		nd	
III20	42	F	1	0		266	189	79	56		13		3/3	+
IV1	33	F	1	0		268	196	85	55	139	72.3		3/3	
IV2	30	F	1	0		244	165	110	57				3/3	
IV3	28	F	0	0		216	148	225	28	104			3/3	
IV4	16	F	1	0		226	132	276	40		14.5		2/3	
IV5	20	M	0	0									3/4	
IV6	18	M	0	0		158	98	90	42				3/3	
IV7	16	F	0	0		175	101	124	49				3/3	
IV8	21	F	0	0		178	95	192	44				3/3	
IV9	18	M	0	0		178	104	258	22	96			3/4	
IV10	17	M	0	0		210		460	30				3/3	
IV11	20	M	0	0		195	134	88	43				3/4	
IV12	17	F	0	0		186	121	62	52	141			3/4	
IV13	24	M	0	1		173	100	64	60	150	20.4		3/3	
IV14	22	M	0	0		172	108	102	44		16		3/3	
IV15	13	M	0	0		183	114	33	46				nd	
IV16	18	M	0	0		163	119	60	32				nd	
V1	9	F	1	0		203	131	144	43	113	98.3		3/3	
V2	8	F	0	0		158	103	164	22	136	59.5		3/3	

Niveles más recientes del perfil de lípidos (mg/dL) previos a medicación para bajar los niveles de lípidos. Abreviaciones: HF, hipercolesterolemia familiar; HA, Hiperalfalipoproteinemia; CT, colesterol total; LDL, LDL colesterol; TG, triglicéridos; HDL, HDL colesterol; Xant, Xantomas tendinosos.

Como se muestra en la figura 4, esta familia presenta dos rasgos fenotípicos distintos, como son la hipercolesterolemia familiar y la hiperalfalipoproteinemia, ambos segregando de manera independiente. Existen miembros con hipercolesterolemia familiar, con hiperalfalipoproteinemia o con ambas condiciones. Además del probando, otros 3 individuos (II3, 84 años; III4, 57 años y el III18, 49 años) exhibieron niveles elevados de colesterol total y LDL-C, pero sin evidencias de aterosclerosis prematura. El individuo II5 (hermano de la probando), murió de causa natural a los 75 años. De su progenie, una de sus hijas (III16) mostró el fenotipo de hiperalfalipoproteinemia, la otra (III20) presentó un fenotipo de hipercolesterolemia familiar y su hijo (III18) mostró ambos fenotipos, lo cual sugiere que este individuo (II5) también portaba ambos rasgos. Nueve miembros de la familia (incluyendo los 5 anteriormente mencionados) presentaron elevación de HDL. El criterio de hiperalfalipoproteinemia fue considerado para niveles de HDL >60mg/dL, ya que estos niveles han sido establecidos como capaces de conferir un efecto protector contra el desarrollo de enfermedad arterial coronaria (NCEP 1993; 1998; Wilson et al. 1998). Estos valores corresponden a una percentila > 90 de acuerdo a edad y género en la población mexicana (Aguilar-Salinas et al. 2001). El diagnóstico o estatus asignado a cada uno de los miembros de la familia fue cuidadosamente establecido. Los individuos con una sola medición de lípidos o niveles limítrofes de los mismos, fueron considerados con un estatus "desconocido" para el análisis de ligamiento genético.

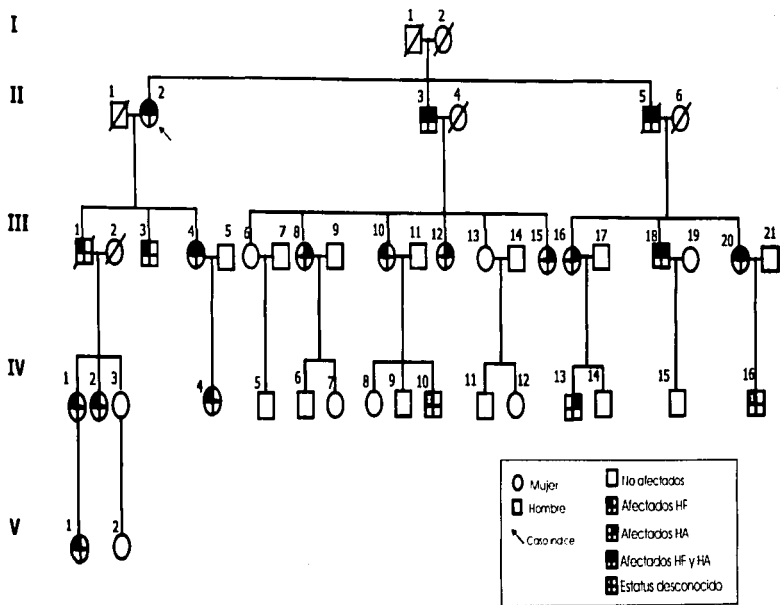


Figura 4. Árbol genealógico de la familia en estudio (CGZ) mostrando el fenotipo de hipercolesterolemia familiar (HIF) e hiperlipoproteinemia (HA).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2. Determinaciones bioquímicas

Las mediciones de laboratorio se realizaron en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El perfil de lípidos y la química sanguínea fueron realizados para los 33 muestras de individuos disponibles. Los análisis de laboratorio se realizaron a través de pruebas totalmente automatizadas con reactivos comerciales. Los niveles de CT y TG fueron determinados a través de métodos enzimáticos (Boehringer-Mannheim). Las partículas de LDL y HDL fueron caracterizadas por método de ultracentrifugación de gradiente de densidad (Martini et al. 1984). La concentración de apo A-I fue medida por inmunofelometría (Anderson et al. 1987). Los niveles de sitosterol fueron determinados por cromatografía capilar de gas-líquido (Beaty et al. 1986).

La distribución de las subclases de lipoproteínas de baja y alta densidad fue evaluada por medio de ultracentrifugación en gradientes de densidad (Lossow WJ. 1966).

2. Aislamiento de DNA genómico

La obtención de DNA genómico se realizó a partir de los leucocitos sanguíneos provenientes de enfermos y familiares de la familia CGZ, siguiendo un método previamente descrito (Kemper, 1992), además de un paso adicional con fenol. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3,500 rpm/15 min. Para separar las células blancas de la interfase se utilizó una pipeta Pasteur, los eritrocitos remanentes se eliminaron a través de lavados con un amortiguador para lisis de eritrocitos (TRIS 10mM pH 7.6, MgCl₂ 5mM y NaCl 10mM), se resuspendió vigorosamente y se centrifugó en las condiciones mencionadas previamente. La pastilla de células blancas resultante fue resuspendida en 2µl de NaCl 5mM y se le adicionaron 92µl de SDS al 10% para lisar las células. Esta mezcla se agitó por 5 min. Para precipitar las proteínas se le adicionaron 616µl de una solución saturada de NaCl y se centrifugó a 15,000 rpm/30 min. Se aisló el sobrenadante y se le realizaron extracciones fenólicas (Maniatis et al. 1989). El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto

frío (-20°C). El DNA se separó de la solución alcohólica y se lavó en un volumen de 800µl de solución TE (10mM TRIS pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0). La muestra se conservó para su análisis a -20 °C. A todas las muestras obtenidas se les realizó un análisis espectrofotométrico, mediante lecturas a 260 y 280 nm. La concentración de DNA se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}], (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260}) (\text{dilución}^{-1}) (0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l})$$

sabiendo que 0.05 µg/µl de DNA = 1 D.O.₂₆₀

La relación 260/280 indica la pureza del DNA obtenido. Se considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O.₂₆₀ son las óptimas.

Para determinar la calidad de las muestras de DNA obtenidas se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio [0.5µg/µl].

3. Marcadores microsatélites

La secuenciación del genoma humano han revelado la existencia de secuencias repetidas en tándem en muchos sitios a lo largo de todos los cromosomas. Estas secuencias varían dependiendo del número de veces que la unidad de repetición está presente (Jeffreys et al. 1985; Nakamura et al. 1987; Tautz et al. 1989; Weber JL 1989; 1990). Cuando la unidad repetitiva del marcador genético es corta, de 2 a 5 nucleótidos, se les denomina microsatélites, o STRs (por sus siglas en inglés, short tandem repeats), mientras que si la secuencia repetida es de 9 a 64 nucleótidos se les denomina minisatélites, también llamados VNTR (por sus siglas en inglés, variable number tandem repeat). En el genoma nuclear se han descrito miles de microsatélites multialélicos con un alto grado de heterocigocidad (>70%), para la mayoría de las poblaciones estudiadas (Edwards et al. 1991). Actualmente, se han identificado más de 10,000 marcadores microsatélites en el genoma humano, cuya localización precisa se conoce. Con una batería de entre 200-400 marcadores es posible tamizar todo el genoma con una distancia promedio de 15-25cM entre un marcador y otro. Sin embargo, es importante mencionar que para la mayoría de estos marcadores, se desconoce su frecuencia alélica en la población mexicana.

Los primeros mapas completos del genoma humano se elaboraron con base en marcadores dinucleótidos del consorcio francés GENETHON, con una resolución menor de 5cM (Weissenbach et al. 1992; Gyapay et al. 1994). Posteriormente, un mapa genético conteniendo 363 marcadores, principalmente tri- y tetranucleótidos (47 y 63% respectivamente), con una heterocigocidad de 79%, fue elaborado en el Centro de Genética Médica de la Fundación Marshfield para la Investigación Médica (Dubovsky et al. 1995). Estos hallazgos permiten en principio, el mapeo de cualquier gen causante de enfermedades hereditarias monogénicas o complejas (Armour et al. 1989).

A través de ligamiento genético, dos estrategias principales pueden ser utilizadas para la identificación de un gen (enfermedad monogénica) o los genes (poligénica) implicados en el desarrollo de una enfermedad:

- 1) Análisis de genes candidatos. En esta estrategia se evalúa la posible participación de genes cuya función se conoce.
- 2) Escrutinio del genoma. En esta estrategia se contempla la identificación de un locus que no ha sido previamente asociado al fenotipo de interés. En este estudio, se analiza el genoma completo utilizando marcadores genéticos distribuidos de manera uniforme en todos los cromosomas.

3.1. Análisis de marcadores radiactivos para genes candidatos

La posible participación de los diferentes genes candidatos tanto para hipercolesterolemia familiar, así como para la hiperalfalipoproteinemia, fue evaluada usando marcadores genéticos ligados a los diferentes genes candidatos de interés. Para la hipercolesterolemia familiar se analizaron los siguientes genes: el LDL y ApoB; y para la hiperalfalipoproteinemia: apoA-I, apoA-II/ApoC-III/apoA-IV, apoC-II, ApoE, ABCA1, PPAR γ , SR-BI, HNF4 α , CETP, LCAT, LH, LPL y Pon1.

Las secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación de los distintos marcadores microsatélites utilizados, fueron obtenidas de diferentes bases de datos (Genome data base, <http://www.qdb.org>; Genethon, <http://www.genethon.fr>; Centro de Genética Médica Marshfield; <http://research.marshfieldclinic.org>).

El análisis de marcadores microsátélites fue realizado a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En un volumen final de 15 μ l se mezclaron 50-100 ng de DNA genómico, 1.5 μ l de solución amortiguadora 10X, 1.2 μ l de la solución de dNTPs 2.5 mM, 1.5 μ l de una solución de dCTP 0.2mM, 15 pmoles de cada oligonucleótido, 0.2 μ l de [α -³²P]dCTP (2 μ Ci) y 1 unidad de Taq Gold (Perkin Elmer).

Las condiciones de amplificación fueron: una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C, 10 min, 35 ciclos de desnaturalización (94 °C, 45 seg), alineamiento (55 °C, 30 seg), extensión (72 °C, 1 min.) y una extensión final de 5 min. a 65 °C.

De los productos de la amplificación se tomó una alícuota de 5 μ l y se mezcló con medio volumen de buffer de corrida (98% de formamida, 10mM EDTA, 0.1% de azul de bromofenol y 0.1% de cinol xileno), la mezcla se calentó a 90°C durante 3 min y se sometió a electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 6%. El gel se secó y se expuso a una placa autorradiográfica, la cual se reveló y se analizó el patrón de bandas observadas en ella.

3.2. Escrutinio del genoma (marcadores fluorescentes)

Se utilizaron 238 marcadores del set Weber Versión 6 del Centro cooperativo para el ligamiento humano (CHLC, Cooperative Human Linkage Center). Este grupo de marcadores está constituido en su mayoría por marcadores microsátélites con repetidos de tri- o tetranucleótidos (93%), con un promedio de heterocigocidad del 78%. Los productos de la PCR fueron analizados en un secuenciador automático ABI377 (Applied Biosystem). El número asignado a cada alelo se determinó internamente y no corresponde necesariamente, a los números asignados en las distintas bases de datos.

4. Análisis de ligamiento genético

4.1. Simulación de ligamiento genético

Antes de iniciar un estudio de ligamiento es importante considerar si los árboles genealógicos disponibles para el estudio de ligamiento genético propuesto tienen posibilidades de dar suficiente información para demostrar ligamiento genético (Ploughman et al. 1989). La utilidad que puede tener cada árbol genealógico para el estudio de ligamiento se evalúa por medio de simulaciones, en las que se generan réplicas de cada árbol genealógico con genotipos de un marcador asignados al azar. La asignación se hace con las probabilidades dadas por la estructura de los árboles genealógicos estudiados, los fenotipos conocidos y datos del marcador y enfermedad (frecuencia de ambos, fracciones de recombinación y penetrancia de la enfermedad). Para obtener resultados significativos, el análisis de simulación requiere un número alto de réplicas (500 o más réplicas). Se utilizó el programa SLINK para las simulaciones y el programa MSIM para el análisis de éstas (Ott 1989).

4.2. Estudio de ligamiento genético

El análisis de ligamiento genético consiste en determinar la segregación de marcadores genéticos polimórficos con relación a un fenotipo clínico determinado. La probabilidad de co-segregación entre el fenotipo y un alelo determinado de un marcador se expresa como LOD score (logarithm of the odds), valores de LOD score ≥ 3 se consideran significativos de ligamiento y valores de LOD score ≤ 2 , se consideran de exclusión de ligamiento.

El estudio de ligamiento genético puede utilizarse para definir la posible participación de distintos genes de forma independiente, sin necesidad de estudiar la estructura (secuencia) completa de cada gen. Para ello, se utilizan marcadores intragénicos o cercanos a cada uno de los genes que se quiere analizar. Alternativamente, el estudio de ligamiento puede utilizarse para definir la participación de una determinada región cromosómica o bien tamizar el genoma completo en busca del locus o loci implicados en un determinado padecimiento.

Los resultados de genotipificación obtenidos para cada marcador en los miembros de la familia se integraron a los paquetes de análisis de ligamiento genético LINKAGE y FASTLINK (Ott et al. 1991; Schaffer et al. 1994), para determinar ligamiento de dos puntos, asumiendo un patrón de herencia autosómico dominante y una frecuencia del gen de 0.001. Debido a que la penetrancia completa puede dar falsas exclusiones y que se ha reportado penetrancia incompleta para estas etiologías, se asumió una penetrancia del 90% para los portadores del alelo mutado. Para el análisis de múltiples puntos (segregación de haplotipos), se utilizó el programa GENHUNTER-PLUS (Kong et al. 1997), este programa calcula un LOD score semi-paramétrico, que permite la identificación del locus más probable donde se encuentra el gen responsable. Este mismo programa de ligamiento, fue utilizado para realizar un análisis de múltiples puntos no-paramétrico (NPL), necesario cuando se tiene una forma de herencia incierta, como podría ser el caso de la HA, ya que estudios previos sugieren diferentes formas de herencia. Por lo que, los datos fueron analizados con un modelo libre a través de un método de alelos compartidos.

Para cada uno de los marcadores microsatélites empleados en la genotipificación de los miembros de esta familia, se determinaron sus frecuencias alélicas en una muestra de individuos sanos no relacionados de la población mexicana o bien en los miembros no relacionados de la familia.

5. Prueba para la identificación de las mutaciones más frecuentes en apo B-100

Tres miembros de la familia CGZ (II-3, II-3 y III-21) fueron analizados para el análisis de las mutaciones más frecuentes en apo B-100 (R3500Q, W3500R y R3531C), utilizando ensayos de restricción previamente descritos (Mamotte et al. 1993; Hansen PS. 1998).

6. Haplotipos de Apo E

Los genotipos de Apo E se determinaron por PCR-RFLP, utilizando oligonucleótidos que amplifican la secuencia que codifica para los aminoácidos de

las posiciones 112 y 158. El producto obtenido se digirió con la enzima HhaI (Tsukamoto et al. 1993).

7. Transformación de líneas celulares

Para la immortalización de linfocitos con el virus de Epstein-Barr (VEB), se tomó una muestra de 20 ml de sangre la cual se diluyó volumen/volumen 1:1 con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Posteriormente, se realizó un gradiente con Ficoll-Hipaque (densidad 1.077), centrifugando la muestra a 1800 rpm durante 25 minutos y se recuperó el anillo de linfocitos. Los linfocitos obtenidos se lavaron 2 veces en solución PBS y posteriormente se les realizó un segundo gradiente con Ficoll bajo las mismas condiciones de centrifugación y de lavado. Los linfocitos se contaron utilizando una cámara de Nuvauer, y una muestra de 1-1.5 millones de linfocitos fueron adicionados por pozo en una caja de cultivo celular de 24 pozos junto con 300-500 μ l de VEB. El volumen faltante para 1 ml. fue alcanzado con medio RPMI sin suero fetal bovino (SFB). La caja se incubó a 37°C en una cámara de incubación con 5% de CO₂, por toda la noche. El paso siguiente consistió en eliminar la mitad del medio y adicionar RPMI con SFB, el cual se mantuvo hasta la aparición de cúmulos, un hecho indicativo del éxito de la immortalización debido a la pérdida de la inhibición por contacto. Los linfoblastos fueron almacenados a -70°C hasta su uso (Reedman et al. 1973; Pattengale et al. 1973; Rosen et al. 1977; Crawford et al. 1986).

8. Determinación de los niveles del receptor LDL en linfoblastos de pacientes con hipercolesterolemia familiar a través de hibridación tipo Western.

Los linfocitos transformados de los pacientes II-2 y III-21 y de dos individuos normolipémicos se preincubaron de 16-18 horas en medio RPMI con suero deficiente de lipoproteínas (FDM) 10% V/V o con medio suplementado con suero de ternera (rico en lipoproteínas) (FMN). Los extractos celulares se fraccionaron sobre PAGE-SDS no reducido (50 μ g de proteína celular/por carril) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La membrana se incubó con un

anticuerpo de ratón conjugado con biotina (Research Diagnostics, Inc.) contra el receptor LDL humano (Norman et al.1999).

9. Citometría de flujo en linfoblastos de pacientes de la familia CGZ con hipercolesterolemia familiar

El análisis de citometría de flujo para la unión de las LDL a su receptor se realizó en los linfoblastos transformados de los pacientes II2 y III21. Los linfoblastos fueron preincubados de 16-18 horas en un medio con suero deficiente de lipoproteínas (SDL) 10% V/V (FDM) o con medio suplementado con suero de ternera (rico en lipoproteínas) (FMN). Posteriormente, los linfoblastos fueron lavados 2 veces con una solución de Puck (CaCl_2 0.5 mM y BSA 0.5 (P/V)) y resuspendidos en esta misma solución. Aproximadamente, 1×10^8 células fueron incubadas por 30 minutos con el complejo BODY-FL LDL (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Molecular Probes Inc.) en presencia o ausencia de un exceso de LDL humanas no marcadas (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Después de dos lavados con la solución de Puck fría, las células se fijaron con una solución con paraformaldehído al 2% (P/V). Las lecturas se realizaron en un citómetro de flujo (Becton Dickinson), tomándose para cada análisis un promedio 10, 000 eventos. El análisis fue realizado con el programa CellQuest (Becton Dickinson).

10. Secuenciación del gen de la IL-17 e IL-17F

Para el análisis de secuenciación automatizada, se realizaron los siguientes pasos: 1) una primera amplificación por PCR de las muestras de II2 y II3, portadores del fenotipo de HA (la secuencia de los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación utilizados se describen en el anexo 2), 2) Los productos obtenidos de la amplificación fueron purificados a través de columnas Qiagen (QIAquick PCR purification kit). 3) El producto obtenido se utilizó para una segunda PCR, en la cual se incorporaron nucleótidos fluorescentes del tipo Big Dye (Big Dye terminators v3.0, Applied Biosystem), las condiciones de amplificación utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante. 4) Se realizó una segunda purificación en columnas CentriSep (Applied Biosystems) y posteriormente, el producto se

**FALTA
PAGINA**

6|0

VI. RESULTADOS

1. Hipercolesterolemia familiar heterocigota (HF)

1.1. Resultados clínicos y de laboratorio (Realizado por el personal del laboratorio de lípidos del INCMNSZ)

Los resultados clínicos y de laboratorio obtenidos en la familia en estudio (CGZ), confirman el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar. Esto datos incluyen: niveles elevados de colesterol total y LDL, xantomas tendinosos, arco corneal, enfermedad arterial coronaria prematura y un patrón sugerente de herencia autosómico dominante. La posibilidad de sitosterolemia fue excluida debido a los niveles normales de sitosterol en la propórito (II2).

Para excluir la posibilidad de hiperlipidemia tipo IIb, III o IV en esta familia, se realizó en varias ocasiones la medición del perfil de lípidos en la mayoría de sus miembros y se determinaron así mismo, los genotipos de apo E, presentando la mayoría de los individuos analizados un genotipo 3/3, el cual no ha sido asociado a variaciones en los niveles de lípidos (Tabla 2).

En el caso índice (II2), el fenotipo de hipercolesterolemia con niveles elevados de LDL, fue ocasionado por el aumento de la subclase LDL₂, las cuales se caracterizan por ser pequeñas y densas [densidad (δ) 1.035-1.063].

1.2. Análisis de genes candidatos

Debido a que no todas las estructuras familiares presentan 3 generaciones de individuos disponibles que permitan obtener resultados significativos de ligamiento genético, se realizó un análisis de simulación de ligamiento genético para el fenotipo de hipercolesterolemia familiar en esta familia, mostrando un LOD score máximo esperado (Z_{max}) de 5.9 (el promedio de Z_{max} en 1000 réplicas fue de 2.1, con 57% >3.00), lo cual establece la utilidad de esta familia para estudios de ligamiento genético.

Se seleccionaron marcadores genéticos altamente polimórficos (tipo microsatélite) completamente ligados (menos de 1 cM o intragénicos) a los 2 genes conocidos como responsables de fenotipo de hipercolesterolemia familiar en humanos, lo que permitió evaluar a través de ligamiento genético la posible participación de los genes del receptor LDL y apo B como responsables de la hipercolesterolemia familiar en esta familia, obteniéndose resultados de ligamiento negativo concluyentes para cada uno de estos genes (Tabla 3).

Adicionalmente, en el caso índice (II2) y su hermano afectado (II3) se realizó la búsqueda de las tres mutaciones descritas para el gen apo B (R3500Q W3500R y R3531C), sin detectar ninguna de ellas.

Tabla 3. Resultados del análisis de ligamiento de 2-puntos para genes candidatos para HF

		LOD score a diferentes θ								
Gen	Marcador	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	Zmax	θ_{max}
apoB	Apo B	-2.67	-1.86	-1.11	-0.73	-0.33	-0.12	-0.02	-0.02	0.40
RLDL	D19S394	-5.51	-4.12	-2.26	-1.28	-0.37	-0.06	-0.05	-0.05	0.40
	D19S586	-5.98	-4.09	-2.67	-1.68	-0.68	-0.26	-0.11	-0.11	0.40

θ , Fracción de recombinación, HF, hipercolesterolemia familiar.

1.3. Escrutinio completo del genoma

Debido a los resultados negativos de ligamiento obtenidos para los genes candidatos para la HF (receptor LDL y apo B), se realizó un escrutinio del genoma (los 22 autosomas), para lo cual se genotificaron doscientos treinta y ocho marcadores microsatélites altamente informativos, que generan un mapa genético con una resolución aproximada de 25 cM. Los resultados del análisis de ligamiento de dos puntos para esta batería de marcadores mostraron una sola región con ligamiento positivo en la banda p32 del cromosoma 1, ligada al fenotipo de hipercolesterolemia familiar. En esta región el LOD score máximo obtenido fue de 2.94 ($\theta=0.05$) para el marcador D1S197. El análisis de marcadores adicionales en la región (D1S386, D1S1661, D1S417, D1S200 y D1S2867) cercanos a D1S197, permitió identificar resultados adicionales de ligamiento positivo a fracciones de recombinación de cero (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del análisis de ligamiento de 2-puntos para marcadores en el cromosoma 1 banda p32 (Familia completa).

Locus	Distancia ^a	LOD Score a diferentes θ								Zmax	θ max
		0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40			
D1S3721	72.59	-5.27	-4.26	-2.92	-2.00	-0.93	-0.35	-0.06	0.00	0.49	
D1S2134	75.66	-1.21	-0.27	0.51	0.85	0.99	0.79	0.38	1.00	0.18	
D1S197	76.27	-1.59	2.58	2.94	2.77	2.21	1.41	0.57	2.94	0.05	
D1S386	77.18	0.80	0.88	1.09	1.18	1.07	0.74	0.32	1.18	0.10	
D1S1661	78.25	1.82	1.79	1.66	1.50	1.16	0.79	0.41	1.82	0.00	
D1S417	79.80	-1.41	-1.19	-0.63	-0.23	0.09	0.14	0.08	0.14	0.30	
D1S200	82.41	-2.99	-1.17	-0.17	0.30	0.59	0.50	0.24	0.60	0.22	
D1S2867	85.68	-7.91	-3.71	-1.41	-0.54	0.02	0.12	0.07	0.12	0.30	

^a Distancia en Kosambi centiMorgans (cM) de pter. θ , Fracción de recombinación.

Debido a que el resultado de LOD score máximo se obtuvo a una fracción de recombinación mayor a cero ($\theta=0.05$), se realizó un análisis de ligamiento de 2 puntos incluyendo solamente a los individuos afectados. Este análisis mostró resultados de LOD score positivos mayores a 1 a una fracción de recombinación de cero ($\theta=0$), para 4 marcadores adyacentes (D1S197, D1S386, D1S1661, D1S417) (Tabla 5). Estos resultados sugieren una penetrancia incompleta cercana al 85% para el fenotipo de hipercolesterolemia familiar en esta familia.

Tabla 5. Resultados del análisis de ligamiento de 2-puntos para marcadores en el cromosoma 1 banda p32 (Sólo afectados).

Locus	Distancia ^a	LOD Score a diferentes θ								Zmax	θ max
		0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40			
D1S3721	72.59	-1.56	-0.78	-0.18	0.04	0.19	0.20	0.13	0.21	0.26	
D1S2134	75.66	0.25	0.98	1.44	1.50	1.29	0.90	0.42	1.50	0.10	
D1S197	76.27	1.68	1.65	1.50	1.32	0.94	0.56	0.23	1.68	0.00	
D1S386	77.18	2.41	2.37	2.18	1.94	1.42	0.87	0.34	2.41	0.00	
D1S1661	78.25	1.60	1.57	1.46	1.31	0.99	0.66	0.33	1.60	0.00	
D1S417	79.80	1.90	1.86	1.69	1.47	1.02	0.59	0.23	1.90	0.00	
D1S200	82.41	-0.23	0.75	1.23	1.28	1.05	0.68	0.29	1.28	0.10	
D1S2867	85.68	-1.00	-0.38	0.09	0.22	0.23	0.16	0.07	0.24	0.15	

^a Distancia en Kosambi centiMorgans (cM) de pter. θ , Fracción de recombinación

Asimismo, el análisis de ligamiento de múltiples puntos confirmó la evidencia de ligamiento previamente obtenida en esta región del cromosoma 1 con un LOD score máximo de 3.29 (Figura 5). Este mismo análisis permitió establecer los haplotipos de la región 1p32 en los miembros de la familia, definiendo un intervalo de 6.75 cM entre los marcadores D1S2134 y D1S200 (75.6 a 82.4 cM de pter).

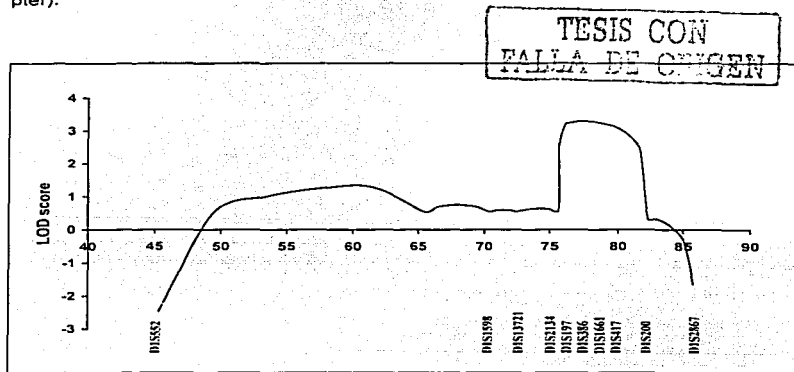


Figura 5. Análisis de múltiples puntos del cromosoma 1 (banda p32). El eje de las X representa la distancia relativa en centimorgans (cM) y el eje de las Y representa el LOD score paramétrico del análisis de ligamiento de múltiples puntos. Los marcadores están indicados abajo del eje de las X.

El intervalo crítico en la región fue definido por dos eventos de recombinación (Figura 6): 1) Límite centrómero, fue definido por la recombinación entre los marcadores D1S417 y D1S200 ocurriendo en el individuo III4, y 2) Límite telomérico, se definió por un evento de recombinación entre los marcadores D1S197 y D1S2134 en el individuo II3. Los 12 individuos

afectados comparten un haplotipo común entre los marcadores D1S197 y D1S417. Esta misma región fue compartida por 5 individuos (asintomáticos) con niveles normales de colesterol total y LDL, y por 2 individuos con estatus desconocido (con sólo una medición de lípidos). El análisis de los 21 autosomas restantes no mostró valores de LOD score > 0.5 (Anexo 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

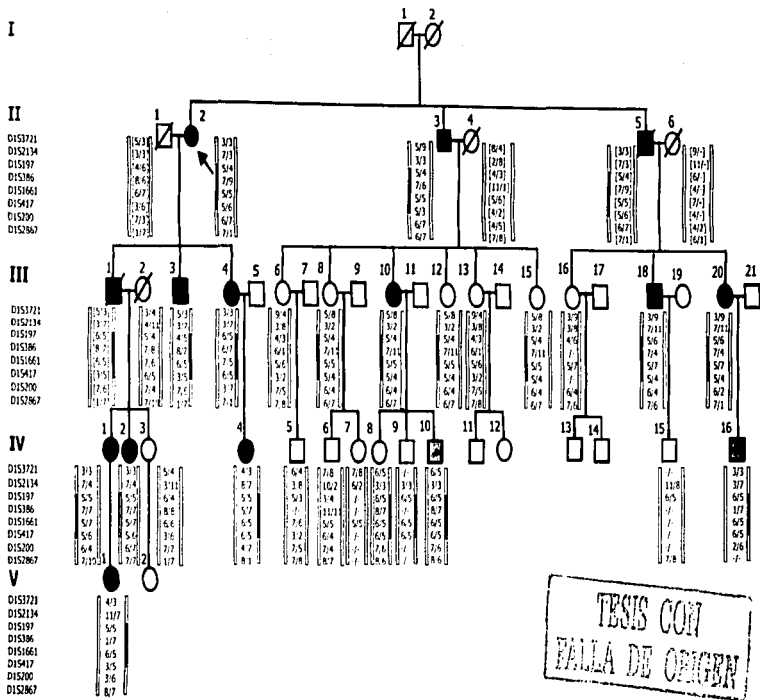


Figura 6. Haplotipo sugerido para el cromosoma 1 (banda p32) ligado al fenotipo de HF en la familia CGZ. Los símbolos vacío y llenos representan a individuos no-afectados y afectados, respectivamente; Símbolos en gris representan un estatus desconocido. Los haplotipos en paréntesis fueron deducidos. La región común compartida por todos los individuos afectados en la familia está indicada por la región en gris.

1.4. Resultados preliminares de ensayos funcionales en linfoblastos de pacientes con hipercolesterolemia familiar de la familia CGZ

Para obtener evidencia de la posible función del gen causante de la hipercolesterolemia familiar en esta familia (FH3), se analizó a través de hibridación tipo Western la expresión del receptor LDL en células (linfocitos transformados) de dos pacientes (II-2 y III-21) y dos controles normolipémicos.

Como se muestra en la figura 7, los niveles de proteína madura del RLDL son semejantes entre los individuos afectados y los controles, sugiriendo que la alteración que está condicionando el desarrollo de la hipercolesterolemia familiar, no afecta la expresión del gen del receptor LDL.

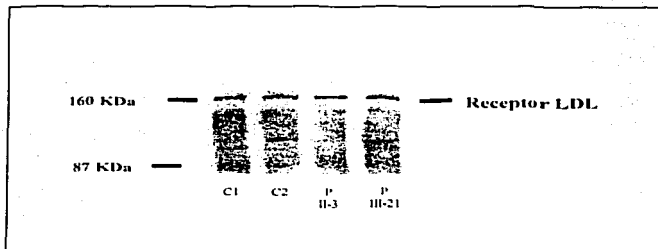


Figura 7. Detección de la proteína del receptor LDL por hibridación tipo Western en linfoblastos de pacientes. Células de individuos normolipémicos (C1 y C2), el caso índice de la familia CGZ (P II-2) y una sobrina afectada (P III-21). Las posiciones del marcador de peso molecular se presentan a la izquierda y la posición de la proteína del receptor LDL maduro se presenta a la derecha.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A través de citometría de flujo, se analizaron los niveles de receptor LDL en la membrana plasmática de dos pacientes con hipercolesterolemia familiar (II2 y III21). Los linfoblastos de los pacientes (II2 y III21) y un control normolipémico fueron incubados con LDL-BODIPY a 4 °C en presencia y ausencia de LDL humanas no marcadas. Las células de los pacientes (II2 y III21) presentaron una disminución del 30 y 18% en la fluorescencia relativa, respectivamente, comparadas con el control normolipémico (Figura 8).

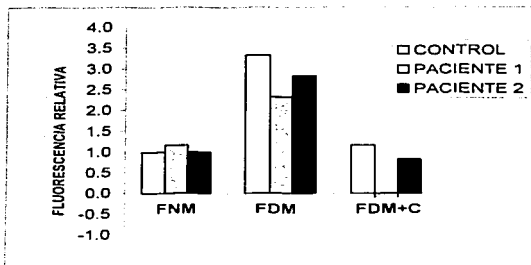


Figura 8. Análisis de la externalización y unión del receptor LDL a su ligando en linfoblastos de pacientes. Los linfoblastos de dos pacientes con HF [paciente 1 (caso índice II2) y paciente 2 (individuo III21)] y de un control normolipémico fueron incubados en un medio rico en lipoproteínas (FNM), en un medio deficiente de lipoproteínas (FDM) y en un medio con suero deficiente de lipoproteínas más LDL humanas frías (no marcadas). Todas fueron incubadas con LDL marcadas con BODIPY-FL. El análisis de citometría de flujo se detalla en los métodos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Hiperalfalipoproteinemia (HA)

2.1. Datos clínicos y de laboratorio (Trabajo realizado por el personal del laboratorio de lípidos del INCMNSZ)

A través de la evaluación clínica y de laboratorio, tanto del caso índice como del resto de la familia, se identificaron 10 individuos con niveles elevados de HDL-C (HA). Para el caso índice (II2), el fenotipo de hiperalfalipoproteinemia estuvo condicionado por el aumento en los niveles de la subclase HDL₂ [densidad (δ) 1.063-1.125], principalmente.

El estudio del árbol genealógico de la familia, sugiere un patrón de herencia autosómico dominante para este rasgo (hiperalfalipoproteinemia) y una segregación independiente a la hipercolesterolemia familiar observada en la familia (Figura 4).

2.2. Análisis de genes candidatos

El análisis de simulación para la hiperalfalipoproteinemia en esta familia, mostró un Zmax de 3.56 (el promedio de Zmax en 500 réplicas fue de 2.59, con 21% >3.00), lo que confirma la utilidad de esta familia para el mapeo del locus responsable de la elevación de las HDL.

Se seleccionaron marcadores microsatélites altamente polimórficos ligados a cada uno de los 13 genes candidatos, que codifican para proteínas implicadas directa o indirectamente en la regulación del metabolismo de las HDL: a) el gen de la proteína apoA-I, la principal proteína estructural de las HDL y el gen HNF4α (un regulador transcripcional positivo de apo A-I), b) genes que codifican para proteínas que intervienen en el transporte reverso del colesterol [el transportador ABCA1, la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), la proteína transferidora de ésteres del colesterol (CETP) y el receptor SR-B1], c) genes de las enzimas involucradas en el metabolismo de las HDL como la lipasa hepática (LH) y la lipasa lipoproteica (LPL), así como algunos de los reguladores de la actividad de esta última (apo C-II, apo C-III y apo A-IV), d) y finalmente, se incluyó el gen del

receptor PPAR γ , que participa en el metabolismo de las HDL y el gen de la paraoxonasa-1 (PON1), que codifica para una enzima involucrada en la disminución de la oxidación de las LDL y en el aumento de la vida media de las HDL.

El estudio de ligamiento de dos puntos para estos 13 genes candidatos, mostró resultados negativos de ligamiento (Tabla 6). Estos datos indican que la hiperalfalipoproteinemia en esta familia, no se debe a alteraciones en ninguno de los genes mencionados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 6. Resultados del análisis de ligamiento de 2-puntos para genes candidatos para HA.

Genes candidatos	Localización cromosomal	Marcadores	LOD score a diferentes θ			
			0.0	0.1	0.2	0.3
ApoA-I/C-III/A-IV	11q23	D11S1374	-7.01	-2.12	-0.97	-0.386
		D11S29	-7.73	-1.40	-0.73	-0.352
HNF 4 α	20q12-q13.1	D20S471	-6.19	-2.12	-1.00	-0.44
Apo CII	19q13.2	Intragénico	-5.96	-0.39	-0.07	0.16
		D19S178	-7.8	-0.17	0.30	0.33
Apo AII	1q21-q23	D1S104	-7.78	-1.95	-0.84	-0.32
		D1S1653	-13.12	-1.24	-0.27	0.03
Apo E	19q13.2	D19S223	-6.34	-2.16	-0.99	-0.41
		D19S178	-7.8	-0.17	0.30	0.33
SR-BI	12	D12S342	-5.40	-1.40	-0.56	-0.16
		D12S395	-0.77	-0.54	-0.37	-0.22
CETP/LCAT	16q21	D16S496	-4.41	-0.98	-0.39	-0.13
		D16S3253	-6.98	-1.62	-0.71	-0.28
LH	15q21-q23	D15S998	-7.38	-1.21	-0.31	-0.008
		D15S643	-7.32	-2.11	-0.94	-0.37
LPL	8p22	Intragénico	-8.99	-1.03	-0.30	-0.08
ABCA1	9q22-q31	D9S930	-3.19	-0.54	-0.12	0.03
PPAR α	22q12-q13.1	D22S689	-4.17	-1.23	-0.59	-0.25
PON	7q21.3	D7S479	-7.49	-3.06	-1.59	-0.77
		D7S820	-4.67	-0.40	0.01	0.10

0. Fracción de recombinación

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

2.3. Escrutinio completo del genoma

Los datos de los 238 marcadores genotificados en el escrutinio del genoma, se utilizaron para el análisis de ligamiento genético en relación al fenotipo hiperalfalipoproteinemia. El análisis de ligamiento de múltiples puntos mostró un sólo locus con resultados estadísticamente significativos. Esta región ubicada en el cromosoma 6 (p12.3-q13) presentó un Z_{max} de 3.17 y un score máximo no-paramétrico (NPL) de 3.78 ($P=0.0009$) entre los marcadores D6S1280 y D6S1275 (Figura 9).

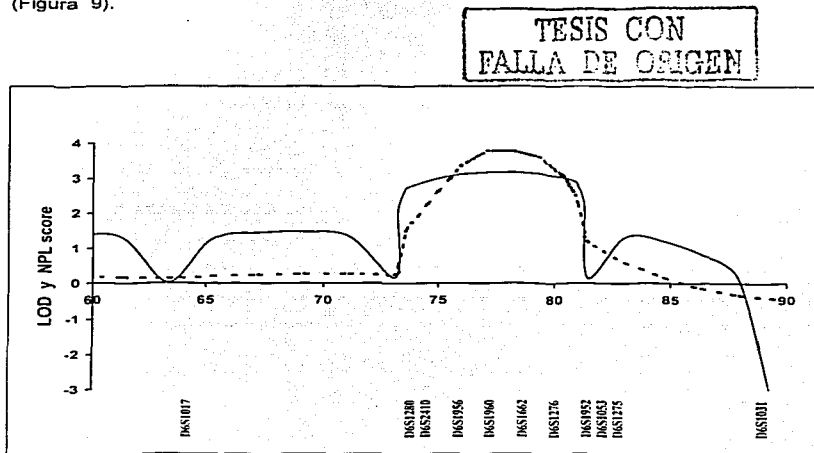


Figure 9. Análisis de ligamiento de múltiples puntos para el fenotipo de HA con marcadores sobre el cromosoma 6 en la banda p12.13-q13. El eje de las X representa la distancia relativa en centimorgans (cM) y el eje de la Y representa el LOD score (línea continua) y el NPL (línea punteada) del análisis de ligamiento de múltiples puntos paramétrico y no-paramétrico, respectivamente. Los marcadores analizados para la región de interés se indican abajo del eje de las X.

El LOD score y el NPL máximo obtenido para el análisis de 2-puntos en esta región fue de 3.05 y 3.08 ($P=0.004$) respectivamente, para el marcador D6S1662 (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de ligamiento de 2 puntos para marcadores en el cromosoma 6 (banda p12.3-q13) en relación al fenotipo de hiperalfalipoproteinemia.

LOD score a diferentes θ

Locus	Distancia*	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	Zmax	θ max
D6S1280	73.13	-0.55	0.68	1.63	1.92	1.83	1.36	0.65	1.95	0.13
D6S2410	73.13	1.53	1.52	1.45	1.32	0.97	0.54	0.14	1.53	0.00
D6S1956	75.45	1.58	1.54	1.40	1.19	0.86	0.49	0.17	1.58	0.00
D6S1960	76.62	1.50	1.78	2.15	2.21	1.92	1.34	0.60	2.21	0.10
D6S1662	77.78	3.05	3.03	2.89	2.67	2.09	1.39	0.60	3.05	0.00
D6S1276	78.85	2.20	2.21	2.16	2.02	1.60	1.05	0.43	2.21	0.01
D6S1053	80.45	1.92	1.88	1.71	1.50	1.06	0.61	0.21	1.92	0.00
D6S1275	80.45	-1.86	-0.74	0.12	0.47	0.60	0.45	0.17	0.61	0.18
D6S1031	88.63	-7.35	-3.11	-1.25	-0.43	0.14	0.23	0.12	0.23	0.30

* Distancia en Kosambi centiMorgans (cM) de pter, θ , Fracción de recombinación.

Se obtuvo un haplotipo compartido entre los marcadores D6S2410 y D6S1053 entre los 10 individuos con el fenotipo de hiperalfalipoproteinemia. El límite centromérico de este intervalo fue definido por un evento de recombinación entre los marcadores D6S1053 y D6S1275 en el individuo II2 y el límite telomérico está definido por un evento de recombinación entre los marcadores D6S1280 y D6S2410 en el individuo II3 (figura 10). Estas recombinaciones, permitieron definir un intervalo de 7.32 cM localizado entre 73.1 y 80.4 cM de pter, como la región más probable donde se ubica el gen responsable de la hiperalfalipoproteinemia en la familia. El análisis de los 21 autosomas restantes no mostró valores de LOD score > 0.5 (Anexo 5).

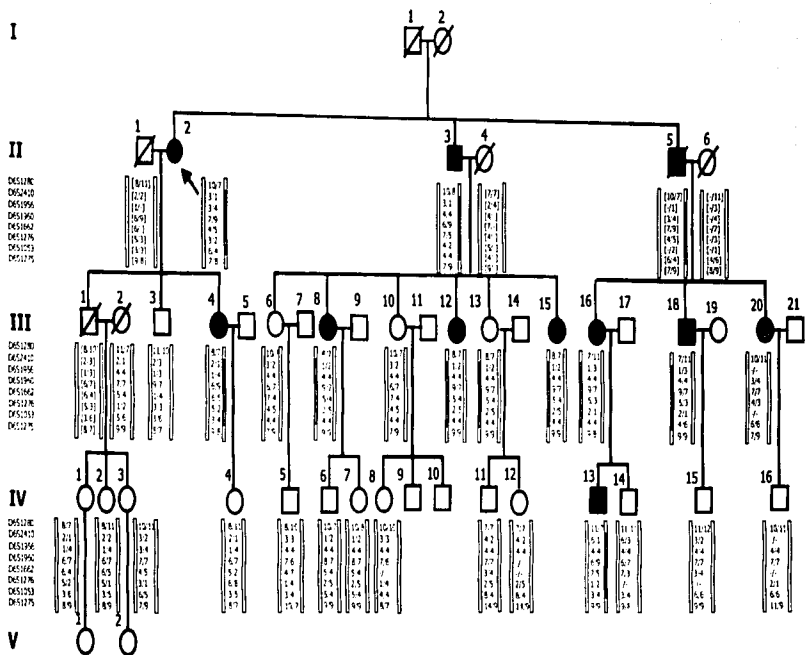


Figura 10. Haplotipo sugerido para el cromosoma 6 (banda p12.13-q13) ligado al fenotipo de HA en la familia CGZ. Los símbolos vacíos y llenos representan a individuos no-afectados y afectados, respectivamente; Símbolos en gris representan un estatus desconocido. Los haplotipos en paréntesis fueron deducidos. La región común compartida por todos los individuos afectados en la familia está indicada por la región en gris.

2.4. Genes candidatos para la hiperalfalipoproteinemia ubicados en el cromosoma 6p12.3-q13

En la región de interés existen aproximadamente 70 genes, aunque ninguno de ellos es un candidato obvio vinculado directamente en el metabolismo de las HDL. Sin embargo, en dicha región están ubicados dos genes de citocinas pro-inflamatorias: la interleucina 17 (IL-17) y la interleucina 17F (IL-17F). Estudios previos han sugerido que citocinas pro-inflamatorias pudieran estar implicadas en la regulación de las concentraciones plasmática de las HDL en humanos (Khovidhunkit et al. 2001a; 2001b; Hardardottir et al. 1996).

El análisis de la secuencia de todos los exones (2 exones para IL-17 y 3 exones para IL-17F) incluyendo las regiones de unión exón-intrón y 1 Kb de la región promotora de cada uno de estos genes, permitió identificar 2 polimorfismos en la región promotora del gen de la IL-17 (-742C/T y -152G/A) y un polimorfismo en el exón 3 (E126G) de IL-17F. Sin embargo, ninguno de estos cambios de nucleótido co-segrega con el fenotipo de HDL elevadas observado en la familia (Figura 11).

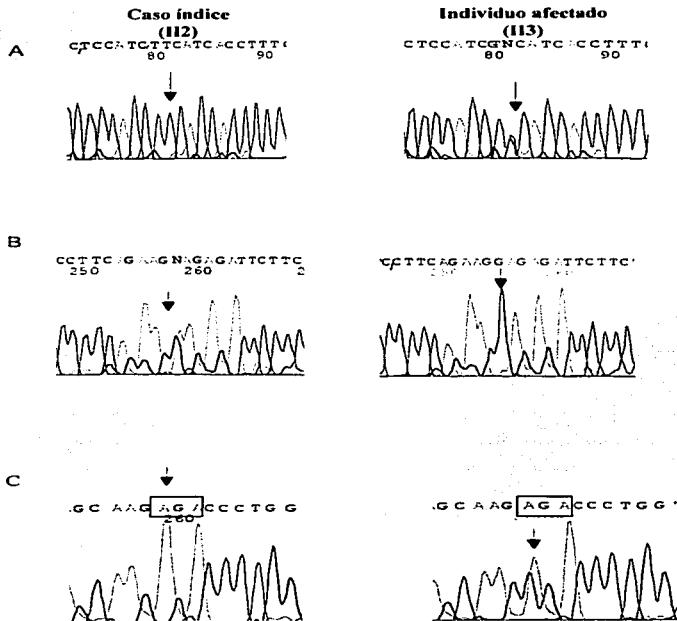


Figura 11. Electroferogramas de los cambios de nucleótidos encontrados en los genes de las IL-17 e IL-17F. A) Polimorfismo en la región promotora del gen de la IL-17 (-742C/T) identificado en el individuo afectado II3, pero no en el caso índice. B) Polimorfismo en la región promotora del gen de la IL-17 (-152G/A) identificado en el caso índice (II2), no así en el individuo II3 con el mismo fenotipo. C) Polimorfismo en el exón 3 del gen de la IL-17F que provoca cambio de aminoácido (E126G) en el individuo afectado II3, pero no en la probando.

VII. DISCUSIÓN

La enfermedad arterial coronaria constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad en la mayoría de las poblaciones, independientemente de su origen étnico (Murray et al. 1997). Uno de los principales factores de riesgo cardiovascular es la modificación de los niveles de lípidos plasmáticos, los cuales en su mayoría son transportados por tres familias de lipoproteínas: VLDL, LDL y HDL. Las dos primeras lipoproteínas (VLDL y LDL) son potencialmente aterogénicas y en consecuencia están implicadas en el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria. Mientras que para la tercera (HDL), existen evidencias cada vez mayores de que ejerce un papel protector frente a la formación de la placa aterosclerótica (Kwiterovich et al. 2002b; Hegele et al. 2001).

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial en la que intervienen una gran variedad de factores genéticos y ambientales (Lusis 2000). En el primer rubro se encuentran desórdenes en el metabolismo de lípidos asociados al riesgo incrementado de la enfermedad arterial coronaria. Algunos de los ejemplos mejor estudiados son la hipercolesterolemia familiar, ocasionada por alteraciones en los genes del receptor LDL y apo B, y caracterizada por un incremento pronunciado en los niveles de LDL (Goldstein et al. 1995). Otro ejemplo, es la hipobetalipoproteinemia familiar (enfermedad de Tangier), caracterizada por una disminución casi total de los niveles de HDL, debido a mutaciones en el gen del transportador ABCA1 (Myant 1993; Lawn et al. 1999). Existen asimismo, estudios realizados en gemelos monocigóticos que sustentan la importancia de los factores genéticos en los procesos que conllevan al desarrollo de aterosclerosis (Scheuner et al. 2001; Austin et al. 1996; Koskenvuo et al. 1992). En el segundo rubro (factores ambientales), es bien conocido el papel de la dieta, el tabaquismo, la vida sedentaria, entre otros factores exógenos capaces de influenciar la expresión de esta patología (Hegele et al. 2001). Además, diversos estudios sugieren un riesgo mayor de enfermedad arterial coronaria dependiendo de la edad y el género del paciente (Grundy et al. 2002).

1. Evidencias clínicas y de laboratorio de la resistencia al desarrollo de aterosclerosis en la familia CGZ

En este trabajo se describió una familia con hipercolesterolemia familiar, cuyo diagnóstico fue realizado de acuerdo a criterios clínicos ya establecidos (Williams et al. 1993), como son: concentraciones elevadas de LDL en los pacientes (>240 mg/dL), la presentación familiar con un patrón de herencia autosómico dominante y la presencia de xantomas tendinosos.

La hipercolesterolemia presentada por el caso índice de esta familia fue condicionada principalmente por el aumento de las LDL, en particular las pequeñas y densas (LDL₂). Existen estudios epidemiológicos que sugieren que la predominancia de las partículas LDL pequeñas y densas está asociada a un riesgo incrementado de enfermedad arterial coronaria (Austin et al. 1988; St-Pierre et al. 2001; Kwiterovich et al. 2002). El efecto aterogénico aumentado de las LDL₂, podría deberse a un mayor tiempo de residencia de estas lipoproteínas en plasma, debido a un menor reconocimiento por el receptor LDL (Millar et al. 1998; Packard et al. 2000; Galeano et al. 1994). Además, esta subclase de LDL parece ser más susceptible a oxidación, ya sea por su residencia prolongada en plasma como se mencionó anteriormente, y/o al contenido disminuido de antioxidantes, como son la vitamina E y el ubiquinol-10 (de Graaf et al. 1991; Dejager et al. 1993; Goulinet et al. 1997; Tribble et al. 2001). Por lo anterior, se ha sugerido que los niveles de la subclase LDL₂ pequeñas y densas, son un buen indicador para el desarrollo de la aterosclerosis en pacientes con hipercolesterolemia familiar (Hulthe et al. 2000; Liu et al. 2002).

Algunos miembros de la familia presentaron otros factores de riesgo cardiovascular (niveles elevados de Lp(a) y/o triacilglicérols e hipertensión), además de la hipercolesterolemia (Tabla 2). Sin embargo, a pesar de la presencia de estos factores de riesgo altamente aterogénicos, el caso índice (II2) y su hermano afectado (II3), no presentaron evidencias claras de desarrollo de aterosclerosis. Por lo que sugerimos, que el desarrollo de aterosclerosis asociado comúnmente a la hipercolesterolemia familiar, parece estar modulado

por la interacción de un segundo rasgo genético (niveles elevados de HDL, HA), transmitido de forma independiente en la familia estudiada.

La elevación de las HDL en el caso índice se debió principalmente al incremento de la subclase HDL₂. El efecto anti-aterogénico de esta subclase de HDL, ha sido evidenciado a través de diferentes estudios caso-control, en los cuales se ha sugerido un riesgo disminuido para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria, cuando la relación de la subfracción HDL₂ aumenta con respecto a las subfracciones HDL_{3b} y HDL_{3c}. (Wilson et al. 1990; Johansson et al. 1991; Cheung et al. 1991). Estos datos sugieren, que el efecto protector de las HDL podría estar dado por subfracciones específicas de esta lipoproteína, lo que explicaría por qué no en todos los casos, los niveles elevados de HDL protegen contra el desarrollo de aterosclerosis.

Interesantemente, los pacientes con Hipercolesterolemia familiar de la familia analizada, en los cuales co-existe la condición de concentraciones altas de HDL no presentan complicaciones vasculares. De hecho, el caso índice (II2) y su hermano afectado (II3) alcanzaron edades avanzadas (94 y 84 años, respectivamente). La ausencia de síntomas de la enfermedad arterial coronaria en estos individuos es totalmente atípica. Algunos estudios muestran que la edad promedio de fallecimiento por enfermedad arterial coronaria en hombres y mujeres con hipercolesterolemia familiar heterocigota oscila entre los 55 y 64 años, respectivamente (Wilson et al. 1998; Goldstein et al. 1995).

En contraparte, en nuestra familia los individuos con hipercolesterolemia familiar y niveles de HDL normales o bajos, la aterogenicidad de la enfermedad se hizo evidente, tal es el caso del individuo III1 (hijo mayor del caso índice), el cual falleció a los 52 años por un infarto al miocardio. El diagnóstico de hipercolesterolemia familiar para este individuo se confirmó por su expediente clínico y la transmisión del padecimiento en dos generaciones sucesivas. Estos datos confirman la aterogenicidad de la hipercolesterolemia familiar en esta familia, cuando no se está en presencia del factor de protección anti-aterogénico que es la hiperalfalipoproteinemia.

Existen en la literatura, reportes de individuos con hipercolesterolemia familiar (no relacionados o de una misma familia) que presentan una misma mutación en el receptor LDL, pero interesantemente, en algunos de ellos no se observaron síntomas clínicos de la enfermedad arterial coronaria, a pesar de su edad avanzada. Estos hallazgos sugirieron, que existen factores que atenúan el desarrollo de aterosclerosis aún en un fondo genético altamente aterogénico, caracterizado por niveles elevados de LDL (Kotze et al. 1993; Murano et al. 1993). En estos pacientes no se estableció la participación de ningún factor genético o ambiental, que pudiera modular la expresión del fenotipo de la hipercolesterolemia familiar. Por lo que la familia estudiada en este trabajo, representa el primer modelo humano descrito, en el cual de manera natural se tiene un proceso aterogénico (generado por la hipercolesterolemia familiar) y un evidente efecto protector anti-atерogénico relacionado a la elevación de las HDL.

La mayoría de los estudios epidemiológicos han confirmado una fuerte asociación entre los niveles elevados de HDL y protección contra el desarrollo de aterosclerosis (Gordon et al. 1977; Gordon et al. 1989; Mahaney et al. 1995). En el estudio de Framingham, se mostró que los individuos con concentraciones de HDL de 1.5mmol/L (60 mg/dL) o más elevadas están protegidos contra el desarrollo de EAC, aún en presencia de niveles elevados de LDL, uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis (Wilson et al. 1988). En el estudio de PROCAM, se mostró que el incremento particular de la subclase HDL₂ (<45%) está asociado con una frecuencia disminuida de eventos ateroscleróticos (Assman et al. 1992). Un meta-análisis de cuatro estudios (Framingham Herat Study, Lipid Research Clinic, Prevalence Mortality Follow-up Study, Coronary Primary Prevention Trial Control Group) demostró que por cada mg/dL de incremento en los valores de HDL existía una reducción del 2-3% de riesgo cardiovascular en hombres y mujeres, respectivamente (Gordon et al. 1989).

Asimismo, estudios en modelos animales han reafirmado la función cardioprotectora de las HDL. En el modelo de conejo Watanabe con hipercolesterolemia natural heredable, la sobre-expresión apo A-I humana (la

principal proteína estructural de las HDL) se asocia a la reducción en la formación de las placas ateroscleróticas (Duverger et al. 1996). En el modelo de ratón C57BL/6 con una dieta alta en grasas, la sobre-expresión de apo A-I humana incrementa los niveles de HDL >150 mg/dL y reduce en un 95% las placas ateroscleróticas (Rubin et al. 1994). Otra evidencia del efecto protector de las HDL, es la movilización del material lipídico acumulado en las lesiones arteriales en ratones deficientes de apo E, a través de la administración de cantidades elevadas de la variante proteica apo A-I Milano recombinante (Shah et al. 2001). Recientemente, se ha descrito un efecto anti-aterogénico ocasionado por la administración oral de un péptido-mimético de apo A-I, en ratones deficientes de apo E (Navab et al. 2002).

2. Ligamiento al cromosoma 1 banda p32 para la hipercolesterolemia familiar (locus FH3)

Para establecer la alteración genética que condiciona al desarrollo de la hipercolesterolemia familiar en la familia en estudio, se evaluó a través de ligamiento genético la participación del gen del receptor LDL y del gen que codifica para apo B-100. La información obtenida de este análisis nos permitió excluir de manera inequívoca la participación de estos genes como responsables del fenotipo de la hipercolesterolemia familiar en la familia. Estos resultados sugerían la participación de un tercer locus para la hipercolesterolemia familiar (FH3), no descrito en el inicio experimental de este trabajo.

Estudios de simulación de ligamiento genético permitieron reconocer a esta familia como una entidad útil para el escrutinio completo del genoma. Por lo que a través del escrutinio de los 22 autosomas (por tratarse de una enfermedad autosómica), se identificó la ubicación del gen para la hipercolesterolemia familiar en el cromosoma 1 en la banda p32, una región previamente ligada al fenotipo de la hipercolesterolemia familiar en 2 estudios separados que incluían familias de origen francés, español y caucásico (Utha, EUA) (Varret et al. 1999; Hunt et al. 2001).

El escrutinio del genoma en nuestra familia mostró ligamiento a una región que comprendía un intervalo inicial de 16.9 cM, entre los marcadores D1S2134 y D1S1596 con un Z_{max} de 1.12, para el análisis de ligamiento de múltiples puntos. A través del mapeo fino con marcadores adicionales en la región, el intervalo crítico fue delimitado a 6.75 cM entre los marcadores D1S2134 y D1S200 con un Z_{max} de 3.29, para el análisis de ligamiento de múltiples puntos. Nuestra región ligada al fenotipo de HF fue definida por dos eventos de recombinación en dos individuos afectados (II3 y III4) (Figura 6).

En la familia estudiada, se observó que además de los 12 individuos afectados que comparten un haplotipo común de 4 marcadores, 7 individuos aparentemente asintomáticos para el fenotipo de hipercolesterolemia familiar comparten la misma región. De estos, 5 son individuos con niveles normales de colesterol total y LDL, y 2 son individuos con niveles limitrofes para estos lípidos, sugiriendo una penetrancia incompleta de casi 80%.

El análisis de ligamiento de 2-puntos utilizando solo-afectados mostró 4 marcadores consecutivos con valores de LOD score máximo a una fracción de recombinación de cero ($\theta=0$) (Tabla 5), a diferencia de lo observado al analizar la familia completa, donde se obtuvieron valores de LOD score máximo para la mayoría de estos marcadores a fracciones de recombinación mayores de cero ($\theta>0$), lo que es consistente con la penetrancia incompleta observada en la familia. Estos resultados podrían explicar por qué no se alcanzó el Z_{max} esperado (LOD score 5.3), de acuerdo al análisis de simulación de ligamiento realizado.

Penetrancia incompleta para este locus (FH3), ha sido previamente reportada para una familia francesa y en familias españolas (Varret et al. 1999), aunque en nuestra familia la penetrancia es más baja. Este hallazgo podría ser explicado por la participación de loci adicionales modulando el fenotipo de hipercolesterolemia. Existen evidencias de diferentes polimorfismos en los genes del transportador ABCA1, de la lipasa lipoproteica (LPL) y de la proteína transferidora de triglicéridos microsomales (MTP) (Wittekoek et al. 1998; Lundahl et al. 2000; Cenarro et al. 2003).

La integración de los marcadores y recombinantes genéticas obtenidas en nuestro estudio, así como los datos de los dos reportes previos para esta región (Varret et al. 1999; Hunt et al. 2000), permitió obtener un mapa genético con un intervalo común de aproximadamente 0.61 cM, flanqueado por los marcadores D1S2134 y D1S197 (figura 12). El límite telomérico de esta región sugerido por el estudio de Varret y col. (1999), fue definido por una recombinante entre el marcador D1S2722 y D1S197 en un individuo aparentemente afectado, con un perfil de lípidos discordante al presentado por otros miembros de la familia con HF. Por lo que es posible, que el intervalo delimitado en el presente trabajo, entre los marcadores D1S2134 y D1S200 que comprende 6.75 cM, corresponde a la región con mayor probabilidad de ubicación del gen FH3 causante de la HF (Figura 12). Este intervalo, representa en el mapa físico una región de 7.7 Megabases (Mb). En esta región, se encuentran 85 genes conocidos en función de los criterios de diferentes bases de datos (Swiss-prot, TrEMBL, mRNA y RefSeq), cuya información ha sido concentrada por diferentes instituciones, tal es el caso del Instituto Sanger (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/) y la de la Universidad de California, Santa Cruz (<http://www.genome.ucsc.edu>). De los genes conocidos ubicados en la región de interés, 8 codifican para proteínas interesantes de acuerdo a su participación metabolismo de lípidos: EPS15 (sustrato de la ruta del receptor del factor de crecimiento epidermal-15), implicado en la ruta de endocitosis mediada por receptor (Wong et al. 1994); OSBP19 (proteína de unión a oxisterol-9), es un miembro de la familia de proteínas OSBP de receptores de lípidos intracelulares (Lehto et al. 2001); DHCR24 (dihidrocolesterol reductasa-24), esta enzima participa en la biosíntesis de colesterol (Waterham et al. 2001); SCP2 (proteína transportadora de esteroides-2), participa en el transporte de lípidos, principalmente colesterol y fosfolípidos (Ohba et al. 1994); PRKAA2 (proteína cinasa activada por AMP, subunidad catalítica $\alpha 2$), esta proteína tiene una función importante en la regulación de los ácidos grasos y el metabolismo del colesterol (Steinberg 2003); DAB1 (proteína adaptadora-1), contiene un dominio de unión a fosfotirocinas (PTB) que le permite interactuar con diferentes miembros de la familia de receptores LDL, incluyendo al receptor LDL (Trommsdorff et al. 1998) y

RAB3B (proteína asociada a RAS 3b), algunos miembros de la familia RAB están involucrados en el transporte y homeostasis del colesterol (Holttä-Vuori et al. 2002).

Recientemente, el gen responsable de la hipercolesterolemia familiar ubicado en el cromosoma 1 banda p32 fue identificado por el grupo francés de Abifalel y colaboradores (2003), primero en reportar ligamiento para esta región (Varret et al. 1999). Este grupo de investigación identificó 2 mutaciones en el gen PCSK9 (por sus siglas en inglés, proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) en 3 familias con hipercolesterolemia familiar ligadas a la región 1p32. Este gen codifica para una proteína convertasa (NARC-1, por sus siglas en inglés, neural apoptosis regulated convertase 1), perteneciente a la familia de las subtilasas, las cuales tienen una función clave en la homeostasis del colesterol a través del procesamiento de proteínas de unión de elementos de respuesta a esteroides (SREBPs) (Brown y Goldstein 1999). Aunque la participación de NARC-1 en la homeostasis del colesterol se desconoce aún, se cree que tiene una función importante, ya que en humanos las alteraciones en este gen provocan el fenotipo de hipercolesterolemia familiar.

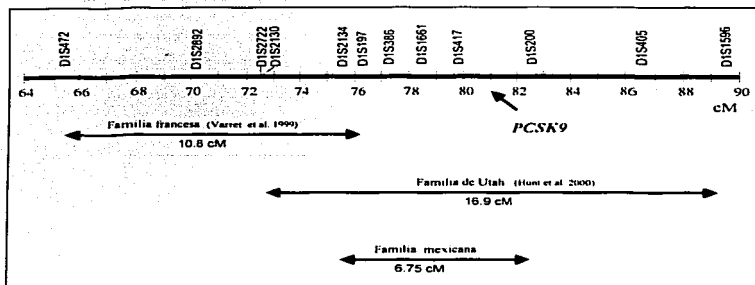


Figura 12. Recombinantes de la región p32 del cromosoma 1 conteniendo el gen FH3 (PCSK9). Se realizó una comparación de los tres diferentes estudios (incluyendo el nuestro), para los cuales la hipercolesterolemia familiar está ligada al cromosoma 1p32. En la figura se indica la ubicación del gen PCSK9. cM, centiMorgans.

Para tratar de identificar alguna mutación en el gen PCSK9 en nuestra familia, se ha establecido una colaboración con el grupo del Dr. Boileau y Dr. Rabès, en Francia. En una primera etapa, se realizará la búsqueda de alguna alteración puntual en los 12 exones que constituyen la región codificante del gen, así como posibles rearrreglos mayores (eliminaciones o duplicaciones) a través de hibridación tipo Southern. De igual forma, se analizará la región promotora de este gen, ya que la familia estudiada presenta una penetrancia baja para el fenotipo de hipercolesterolemia familiar, lo que podría ser explicado por alguna variación en esta región.

3. Efecto funcional del locus FH3 en pacientes de la familia CGZ

Aún cuando el gen FH3 (PCSK9) ya fue identificado, se desconoce el mecanismo molecular que condiciona al desarrollo de la enfermedad, por lo que en este trabajo, se trató de identificar algún posible defecto en la regulación de la expresión del receptor LDL, así como en el transporte del mismo. De acuerdo a

nuestros datos preliminares, la expresión del gen del receptor LDL no se ve alterada en células linfoblásticas de 2 pacientes con hipercolesterolemia familiar, con respecto a los controles normolipémicos. Por lo que es poco probable, que el defecto causante de la hipercolesterolemia familiar en esta familia, se deba a la alteración en la expresión del receptor LDL. Por otro lado, los resultados iniciales del estudio de citometría de flujo muestran una disminución de los niveles de receptor LDL en la membrana plasmática de los pacientes analizados (II2 y III21), lo que pudiera sugerir un posible defecto en el transporte del receptor, particularmente en su externalización. Estos hallazgos no nos permiten concluir aún, sobre un posible defecto en el transporte del RLDL, ya que es necesario un número mayor de ensayos de citometría de flujo, para tener elementos suficientes que nos permitan sugerir de forma más confiable, si existe un defecto en el transporte de las LDL en nuestra familia.

4. Ligamiento al cromosoma 6 para hiperalfalipoproteinemia

A través de ligamiento genético se excluyeron los principales genes implicados en el transporte reverso del colesterol, así como algunos genes que regulan la expresión de las diferentes proteínas involucradas en este mismo proceso (Tabla 6). Estos resultados sugerían la participación de un locus no descrito para la modulación de los niveles de HDL en humanos.

A través del escrutinio de los 22 autosomas, identificamos el locus para la hiperalfalipoproteinemia en el cromosoma 6 banda p12.3-q12, en un intervalo inicial de 15.5 cM entre los marcadores D6S1280 y D6S1031 con un Z_{max} de 1.9 para el análisis de múltiples puntos. A través del análisis de mapeo fino en la región utilizando marcadores adicionales, se delimitó el intervalo crítico a 7.32 cM entre los marcadores D6S1280 y D6S1275, con un Z_{max} de 3.17. Nuestra región ligada al fenotipo de hiperalfalipoproteinemia fue definida por dos eventos de recombinación en los individuos afectados con HA (II2 y II3).

Un haplotipo común de 6 marcadores fue compartido por todos los individuos con hiperalfalipoproteinemia y por 1 individuo (III13) con niveles normales de HDL (Figura 10), implicando una penetrancia alta pero incompleta del 90% para el rasgo de hiperalfalipoproteinemia en la familia.

Nuestra región en el cromosoma 6 en la banda p12.3-q12 (73.13 a 80.45 cM de pter), traslapa otras regiones previamente identificadas asociadas con la variación de los niveles de lípidos en humanos, tal es el caso de la región descrita por Knoblauch y colaboradores (2000), que influencia los niveles de LDL en una familia árabe con HF y en una muestra de gemelos monocigóticos y dicigóticos caucásicos alemanes. Esta misma región también ha sido asociada a la variación de la relación TG/HDL en un estudio de población caucásica de EUA (Kios et al. 2001). Asimismo, se identificó una región muy cercana a nuestro intervalo crítico asociada a la variación de los niveles de triacilglicérols (LOD score 1.73 en el 71.3 cM) en familias afro-americanas (estudio de HyperGen) (Coon et al. 2001).

Estos datos sugieren que el locus mapeado en el cromosoma 6 responsable de fenotipo de la hiperalfalipoproteinemia y del efecto protector anti-aterogénico en nuestra familia, podría también modificar las concentraciones de diversos lípidos y lipoproteínas (TG, LDL y HDL) en otras poblaciones.

El intervalo crítico definido en la familia, comprendido entre los marcadores D6S1280 y D6S1275 corresponde en el mapa físico a 18.57 Mb. En este intervalo se encuentran aproximadamente 70 genes conocidos, con base en los criterios de diferentes bases de datos (Swiss-prot, TrEMBL, mRNA y RefSeq) obtenidas del Instituto Sanger (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/) y de la Universidad de California, Santa Cruz (<http://www.genome.ucsc.edu>).

4.1. Interleucinas 17 y 17F, genes candidatos para la HA

De los genes conocidos ubicados en este intervalo crítico, ninguno es un gen candidato obvio de acuerdo a su función. Aunque, antecedentes recientes permiten proponer a dos citocinas (interleucina 17 e interleucina 17F) como genes candidatos interesantes. Diversos estudios, muestran que algunos de los genes participantes en el metabolismo de las HDL, como el gen del receptor SR-BI

(principal receptor de las HDL) y el gen de la LCAT (enzima importante en el transporte reverso del colesterol), presentan elementos de respuesta específicos para diferentes rutas de señalización de citocinas (interleucina-6, interleucina-1 β , entre otras) (Hullinger et al. 2001; Feister et al. 2002).

La IL17 e IL17F son citocinas pro-inflamatorias producidas principalmente por linfocitos T activados, a la cuales se les han atribuido distintas funciones, entre ellas, regular la proliferación de otras citocinas como IL6, IL12, TFG β y la proteína quimioatrayente de monocitos en las células endoteliales (Starnes et al. 2001; Aggarwal et al. 2002).

El análisis de la secuencia de estos genes (IL17 e IL17F) incluyendo 1Kb de su región promotora, no mostró evidencia alguna de su participación en el fenotipo de HA en la familia. Los polimorfismos identificados (-472C7T, -152G/A y E126G) en los genes de la IL17 e IL17F, no presentan co-segregación con el fenotipo de HA, por lo que ninguno de estos 2 genes parece ser el responsable de los niveles elevados de HDL y del efecto protector anti-aterogénico observado en la familia.

Interesantemente, el análisis de estos 3 polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) como un haplotipo en nuestra familia, permitió delimitar la región crítica en el mapa físico de 18.57 a 13.36 Mb. Por lo que, la identificación de SNPs informativos en los diferentes genes ubicados en la región, constituye una estrategia de mapeo aún más fino que el realizado con marcadores microsatélites, permitiendo además de reducir el intervalo crítico, excluir si es el caso el gen analizado.

La eventual identificación del gen responsable de la hiperalfalipoproteinemia y del efecto protector contra el desarrollo de la aterosclerosis en esta familia, permitirá tener un mejor conocimiento de los factores genéticos capaces de regular los niveles de HDL, así como la identificación de posibles blancos terapéuticos contra la enfermedad arterial coronaria, que sigue constituyendo la principal causa de morbi-mortalidad en diferentes poblaciones, incluyendo la nuestra.

VIII. CONCLUSIONES

A) Se identificó una familia multigeneracional en la cual co-existen dos alteraciones, una altamente aterogénica como es la hipercolesterolemia familiar (HF) y otra condicionada por niveles elevados de HDL (hiperalfalipoproteinemia, HA). Esta última confiriendo un efecto protector contra el desarrollo de aterosclerosis en la familia. Por lo que, esta familia constituye el primer modelo descrito en humanos, en el cual se evidencia un efecto anti-aterogénico, con una aparente forma de herencia autosómica dominante.

B) Este estudio representa el primer esfuerzo en México, para determinar a través de ligamiento genético las causas moleculares que condicionan el desarrollo de la hipercolesterolemia familiar. Este análisis permitió excluir los genes del receptor LDL y apo B, como responsables del fenotipo de hipercolesterolemia familiar en la familia estudiada. Por lo que a través de un escrutinio completo del genoma se evidenció la participación de un locus nuevo en el cromosoma 1p32 (FH3), confirmando una mayor heterogeneidad genética a la sugerida para esta enfermedad.

C) Un gen nuevo para la hipercolesterolemia familiar ligada al cromosoma 1p32 fue recientemente descrito. Este gen (PCSK9) codifica para una proteína convertasa (NARC-1), perteneciente a una familia de convertasas involucradas en la homeostasis del colesterol. Aunque ya se conoce la alteración genética causante del fenotipo de HF ligada a 1p32, se desconoce aún el mecanismo bioquímico y molecular que pudiera estar afectado. Nuestros estudios preliminares realizados en linfoblastos de dos pacientes con hipercolesterolemia pertenecientes a la familia analizada, parecen sugerir que el defecto metabólico podría involucrar el transporte del receptor de las LDL.

D) Interesantemente, esta familia presentó un efecto protector (niveles elevados de HDL) contra el desarrollo de aterosclerosis prematura. A través de ligamiento genético se excluyó la posible participación de una gran variedad de genes candidatos involucrados principalmente en el transporte reverso del colesterol, como responsables de la hiperalfalipoproteinemia en esta familia. Para identificar el gen responsable de esta condición (HA), se realizó un escrutinio completo del genoma (22 autosomas), el análisis de ligamiento genético evidenció un locus en el cromosoma 6 en la banda p12.3-q13, como la región más probable donde se ubica el gen que confiere el efecto anti-aterogénico en esta familia.

E) A través de la secuenciación directa de los genes de la interleucina-17 e interleucina-17F, se descartó su participación como responsables del fenotipo de hiperalfalipoproteinemia en la familia estudiada.

F) La eventual identificación del gen responsable de la hiperalfalipoproteinemia en la familia analizada, contribuirá al entendimiento del metabolismo de las HDL y permitirá en un futuro, la posible aplicación de estos conocimientos en el desarrollo de posibles blancos terapéuticos.

IX. PERSPECTIVAS

Con base en las evidencias presentadas en esta tesis, el trabajo realizado permite sugerir una serie de perspectivas:

- La caracterización molecular de este gen nuevo (PCSK9) asociado a la hipercolesterolemia familiar, en una muestra de población mexicana. Para lo cual se está realizando una búsqueda de familias con hipercolesterolemia familiar ligadas al cromosoma 1p32, habiendo identificado hasta el momento 2 familias en las que no se pudo excluir el ligamiento a esta región, por lo que estas familias son candidatas para la identificación de nuevas mutaciones en el gen PCSK9. De igual forma, es de gran interés evaluar la participación de este gen en formas poligénicas de hipercolesterolemia, las cuales representan la mayor proporción de las hipercolesterolemias observadas en las distintas poblaciones.
- Los datos obtenidos de los ensayos funcionales en linfoblastos de dos pacientes con hipercolesterolemia familiar, sugieren un posible defecto en el transporte del receptor LDL como el mecanismo responsable de la hipercolesterolemia familiar. Para confirmar estos resultados será necesario realizar ensayos adicionales tanto en el linfoblastos de pacientes con hipercolesterolemia pertenecientes a la familia analizada, como en pacientes de otras familias también ligada al cromosoma 1p32. El conocimiento de las alteraciones bioquímicas y moleculares que condicionan al fenotipo de la hipercolesterolemia familiar, permitirá identificar posibles blancos regulables, capaces de reducir los niveles de colesterol, y por lo tanto, disminuir el desarrollo de aterosclerosis, una de las principales complicaciones derivadas de esta dislipidemia.

- Para la identificación del gen responsable de la hiperalfalipoproteinemia, que confiere un efecto anti-aterogénico se plantea evaluar alrededor de 70 genes candidatos posicionales ubicados en la región de interés, a través de haplotipos constituidos de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs).
- La importancia del locus identificado en el cromosoma 6 asociado a hiperalfalipoproteinemia en la regulación de los niveles de HDL en la población mexicana, será establecida a través de ligamiento genético en familias que presenten variaciones en los niveles de HDL; ya sea $>$ a la percentila 90 ó $<$ a la percentila 10.
- La identificación del gen asociado a la hiperalfalipoproteinemia, permitirá como ya se comentó, contribuir en el conocimiento del metabolismo de las HDL, así como en el desarrollo de posibles estrategias nuevas para el tratamiento y prevención contra la aterosclerosis.

X. REFERENCIAS

- Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derre A, Villegier L, Farnier M, Beuclet I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003; 34(2):154-156.
- Acton S, Rigotti A, Landschutz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271(5248):518-520.
- Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 2002; 71(1):1-8.
- Aguiar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Gomez Perez FJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepulveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001; 42(8):1298-1307.
- Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, Coskran T, Haghpassand M, Francone OL. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(4):630-637.
- Albers JJ, Chen CH, Adolphson JL. Lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) mass: its relationship to LCAT activity and cholesterol esterification rate. *J Lipid Res* 1981; 22(8):1206-1213.
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Group L, Lander ES. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2000; 26(1):76-80.
- Anderson RJ, Stember JC. A rate nephelometer for immunoprecipitin measurement of specific serum proteins. En Ritchie RF, ed. Automated immunoanalysis. New York, NY: Marcel Dekker; 1987:410-469.
- Angelin B, Parini P, Eriksson M. Reverse cholesterol transport in man: promotion of fecal steroid excretion by infusion of reconstituted HDL. *Atheroscler Suppl* 2002; 3(4):23-30.
- Armour JA, Wong Z, Wilson V, Royle NJ, Jeffreys AJ. Sequences flanking the repeat arrays of human minisatellites: association with tandem and dispersed repeat elements. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(13):4925-4935.
- Arnold KS, Balestra ME, Krauss RM, Curtiss LK, Young SG, Innerarity TL. Isolation of allele-specific, receptor-binding-defective low density lipoproteins from familial defective apolipoprotein B-100 subjects. *J Lipid Res* 1994; 35(8):1469-1476.
- Assman G, Eckardstein A, Brewer HB Jr. Familial alpha lipoproteinemia: Tangier disease. en Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): The metabolic bases of inherited disease, ed 7. McGraw-Hill Book Co, New York, 1995, pp 2937-2960.
- Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1988; 260(13):1917-1921.
- Austin MA. Genetic epidemiology of dyslipidaemia and atherosclerosis. *Ann Med* 1996; 28(5):459-463.
- Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Erogul J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulphydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(10):1617-1624.

- Barter PJ, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(2):160-167.
- Basso F, Freeman L, Knapper CL, Remaley A, Stonik J, Neufeld EB, Tansey T, Amar MJ, Fruchart-Najib J, Duverger N, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrathecal cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res* 2003;44(2):296-302.
- Beatty TH, Kwitnerovich PO Jr, Khoury MJ, White S, Bachorik PS, Smith HH, Teng B, Sniderman A. Genetic analysis of plasma sitosterol, apoprotein B, and lipoproteins in a large Amish pedigree with sitosterolemia. *Am J Hum Genet* 1986; 38(4):492-504.
- Beaumont V, Jacotot B, Beaumont JL. Ischaemic disease in men and women with familial hypercholesterolaemia and xanthomatosis. A comparative study of genetic and environmental factors in 274 heterozygous cases. *Atherosclerosis* 1976; 24(3):441-450.
- Bednarska-Makaruk M, Bisko M, Pulawska MF, Hoffman-Zacharska D, Rodo M, Roszczyzno M, Solik-Tomassi A, Broda G, Polakowska M, Pytlak A, Wehr H. Familial defective apolipoprotein B-100 in a group of hypercholesterolaemic patients in Poland. Identification of a new mutation Thr3492Ile in the apolipoprotein B gene. *Eur J Hum Genet* 2001; 9(11):836-842.
- Benoit P, Emmanuel F, Caillaud JM, Bassinet L, Castro G, Gallix P, Fruchart JC, Brunellec D, Deneffe P, Duverger N. Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation* 1999; 99(1):105-110.
- Berard AM, Foger B, Remaley A, Shamburek R, Vaisman BI., Talley G, Paigen B, Hoyt RF Jr, Marcovina S, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesterol acyltransferase. *Nat Med* 1997; 3(7):744-749.
- Berryman DE, Bensadoun A. Heparan sulfate proteoglycans are primarily responsible for the maintenance of enzyme activity, binding, and degradation of lipoprotein lipase in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1995; 270(41):24525-24531.
- Bielicki JK, Oda MN. Apolipoprotein A-I(Milano) and apolipoprotein A-I(Paris) exhibit an antioxidant activity distinct from that of wild-type apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 2002; 41(6):2089-2096.
- Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcummez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Luckner KJ, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 1999; 22(4):347-351.
- Boekholdt SM, Thompson JF. Natural genetic variation as a tool in understanding the role of CETP in lipid levels and disease. *J Lipid Res* 2003; publicacion electrónica Mar 16.
- Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(2):168-175.
- Boren J, Ekstrom U, Agren B, Nilsson-Ehle P, Innerarity TL. The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *J Biol Chem* 2001; 276(12):9214-9218.
- Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest* 1998;101(5):1084-1093.

- Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 1998; 101(12):2658-2664.
- Bos CR, Shank SL, Snider MD. Role of clathrin-coated vesicles in glycoprotein transport from the cell surface to the Golgi complex. *J Biol Chem* 1995; 270(2):665-671.
- Breslow JL. Genetic markers for coronary heart disease. *Clin Cardiol* 2001;24(7 Suppl):II-14-17.
- Brewer HB Jr, Fairwell T, LaRue A, Ronan R, Houser A, Bronzert TJ. The amino acid sequence of human APOA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 80(3):623-630.
- Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem* 1993; 268(19):14490-14496.
- Brinton EA. Oral estrogen replacement therapy in postmenopausal women selectively raises levels and production rates of lipoprotein A-I and lowers hepatic lipase activity without lowering the fractional catabolic rate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(3):431-440.
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouellete BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Hayden MR, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22(4):336-345.
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232(4746):34-47.
- Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(20):11041-11048.
- Brown MS, Goldstein JL. Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. *Cell* 1976;9(4 PT 2):663-674.
- Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974a; 71(3):788-792.
- Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science* 1974b; 185(4145):61-63.
- Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor and HMG-CoA reductase--two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. *Curr Top Cell Regul* 1985; 26:3-15.
- Brown MS, Kovnan PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981; 212(4495):628-635.
- Brunzell JD, Deeb SS. Familial lipoprotein lipase deficiency, apo C-II deficiency, and hepatic lipase deficiency. en Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The metabolic bases of inherited disease*, ed 8. McGraw-Hill Book Co, New York, 2001, pp 2789-2816.
- Busch SJ, Barnhart RL, Martin GA, Fitzgerald MC, Yates MT, Mao SJ, Thomas CE, Jackson RL. Human hepatic triglyceride lipase expression reduces high density lipoprotein and aortic cholesterol in cholesterol-fed transgenic mice. *J Biol Chem* 1994; 269(23):16376-16382.

- Castelli WP.** Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med* 1984;76(2A):4-12.
- Cenarro A, Artieda M, Castillo S, Mozas P, Reyes G, Tejedor D, Alonso R, Mata P, Pocovi M, Civeira F.** Spanish FH group. A common variant in the ABCA1 gene is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet* 2003; 40(3):163-168.
- Chen SH, Yang CY, Chen PF, Setzer D, Tanimura M, Li WH, Gotto AM Jr, Chan L.** The complete cDNA and amino acid sequence of human apolipoprotein B-100. *J Biol Chem.* 1986;261(28):12911-12921.
- Chen PF, Marcel YL, Yang CY, Gotto AM Jr, Milne RW, Sparrow JT, Chan L.** Primary sequence mapping of human apolipoprotein B-100 epitopes. Comparisons of trypsin accessibility and immunoreactivity and implication for apoB conformation. *Eur J Biochem* 1988;175(1):111-118.
- Cheung MC, Brown BG, Wolf AC, Albers JJ.** Altered particle size distribution of apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in subjects with coronary artery disease. *J Lipid Res* 1991; 32(3):383-394.
- Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra JP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B.** PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001; 7(1):53-58.
- Choong ML, Koay ES, Khoo KL, Khaw MC, Sethi SK.** Denaturing gradient-gel electrophoresis screening of familial defective apolipoprotein B-100 in a mixed Asian cohort: two cases of arginine3500-->tryptophan mutation associated with a unique haplotype. *Clin Chem* 1997;43(6 Pt 1):916-923.
- Christensen M, Horder M.** Familial hypercholesterolemia. A study of 152 members of 26 families. *Dan Med Bull* 1971; 18:100-104.
- Ciccarese M, Pacifico A, Tonello G, Pintus P, Nikoshkov A, Zuliani G, Fellin R, Luthman H, Maioli M.** A new locus for autosomal recessive hypercholesterolemia maps to human chromosome 15q25-q26. *Am J Hum Genet* 2000;66(2):453-460.
- Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Nolte RT, Atkinson D, Zannis VI.** The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *EMBO J* 1986;5(13):3495-34507.
- Claudel T, Leibowitz MD, Fievet C, Tailleux A, Wagner B, Repa JJ, Torpier G, Lobaccaro JM, Paterniti JR, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Auwerx J.** Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(5):2610-2615.
- Clee SM, Zhang H, Bissada N, Miao L, Ehrenborg E, Benlian P, Shen GX, Angel A, LeBoeuf RC, Hayden MR.** Relationship between lipoprotein lipase and high density lipoprotein cholesterol in mice: modulation by cholesteryl ester transfer protein and dietary status. *J Lipid Res* 1997; 38(10):2079-2089.
- Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ.** High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(11):1987-1994.
- Cohen JC, Vega GL, Grundy SM.** Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10(3):259-267.
- Coleman T, Seip RL, Gimble JM, Lee D, Maeda N, Semenkovich CF.** COOH-terminal disruption of lipoprotein lipase in mice is lethal in homozygotes, but heterozygotes have elevated triglycerides and impaired enzyme activity. *J Biol Chem* 1995; 270(21):12518-12525.

- Coon H, Leppert MF, Eckfeldt JH, Oberman A, Myers RH, Peacock JM, Province MA, Hopkins PN, Heiss G. Genome-wide linkage analysis of lipids in the Hypertension Genetic Epidemiology Network (HyperGEN) Blood Pressure Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(12):1969-1976.
- Crawford DH, Mulholland N, Iliescu V, Hawkins R, Powles R, Epstein-Barr virus infection and immunity in bone marrow transplant recipients. *Transplantation* 1986;42(1):50-54.
- Davis CG, Goldstein JL, Sudhof TC, Anderson RG, Russell DW, Brown MS. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 1987;326(6115):760-765.
- Dawson PA, Hofmann SL, van der Westhuyzen DR, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-dependent repression of low density lipoprotein receptor promoter mediated by 16-base pair sequence adjacent to binding site for transcription factor Sp1. *J Biol Chem* 1988; 263(7):3372-3379.
- de Graaf J, Hak-Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb* 1991; 11(2):298-306.
- Dejager S, Bruckert E, Chapman MJ. Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 1993; 34(2):295-308.
- deLemos AS, Wolfe ML, Long CJ, Sivapackianathan R, Rader DJ. Identification of genetic variants in endothelial lipase in persons with elevated high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation* 2002; 106(11):1321-1326.
- Dubovsky J, Sheffield VC, Duyk GM, Weber JL. Sets of short tandem repeat polymorphisms for efficient linkage screening of the human genome. *Hum Mol Genet* 1995; 4(3):449-452.
- Duriez P, Fruchart JC. High-density lipoprotein subclasses and apolipoprotein A-I. *Clin Chim Acta* 1999; 286(1-2):97-114.
- Duval C, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Staels B. The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2002; 8(9):422-430.
- Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G, Tailleux A, Fievet C, Fruchart JC, Houdebine LM, Denelle P. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation* 1996; 94(4):713-717.
- Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G, Tailleux A, Fievet C, Fruchart JC, Houdebine LM, Denelle P. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation* 1996; 94(4):713-717.
- Eden ER, Naoumova RP, Burden JJ, McCarthy MI, Soutar AK. Use of homozygosity mapping to identify a region on chromosome 1 bearing a defective gene that causes autosomal recessive homozygous hypercholesterolemia in two unrelated families. *Am J Hum Genet* 2001; 68(3):653-660.
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991; 49(4):746-756.
- Ek J, Urhanmer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O. Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 1999; 42(7):892-895.

- Elkhalil L, Majd Z, Bakir R, Perez-Mendez O, Castro G, Poulain P, Lacroix B, Duhail N, Fruchart JC, Luc G. Fish-eye disease: structural and in vivo metabolic abnormalities of high-density lipoproteins. *Metabolism* 1997; 46(5):474-483.
- Emi M, Fujiwara Y, Nakamura Y. A primary genetic linkage map of 14 polymorphic loci for the short arm of human chromosome 8. *Genomics* 1993; 15(3):530-534.
- Erkelens DW, Sherwood LM. Familial hypercholesterolemia, tendinous xanthomas, and Frans Hals. *JAMA* 1989;262(15):2092.
- Fagge CH. Diseases, etc. of the skin I; General xanthelasma or vitiligoidea. *Trans Pathol Soc* 1873; 24:242-250.
- Fan J, Wang J, Bensadoun A, Lauer SJ, Dang Q, Mahley RW, Taylor JM. Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(18):8724-8728.
- Fass D, Blacklow S, Kim PS, Berger JM. Molecular basis of familial hypercholesterolemia from structure of LDL receptor module. *Nature* 1997; 388(6643):691-693.
- Feister HA, Auerbach BJ, Cole LA, Krause BR, Karathanasis SK. Identification of an IL-6 response element in the human LCAT promoter. *J Lipid Res* 2002; 43(6):960-970.
- Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995;36(2):211-228.
- Flavell DM, Jamshidi Y, Hawe E, Pineda Torra I, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesaniemi YA, Pasternack A, Staels B, Miller G, Humphries SE, Talmud PJ, Svanne M. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene variants influence progression of coronary atherosclerosis and risk of coronary artery disease. *Circulation* 2002; 105(12):1440-1445.
- Fox TC. A case of xanthelasma multiplex. *Lancet* 1879; 2:688-689.
- Francke U, Brown MS, Goldstein JL. Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81(9):2826-2830.
- Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10(5):245-257.
- Fuernkranz HA, Wang Y, Karathanasis SK, Mak P. Transcriptional regulation of the apoA1 gene by hepatic nuclear factor 4 in yeast. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(25):5665-5671.
- Fuster V, Badimon JJ, Badimon L. Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression. *Circulation* 1992; 86(6 Suppl):III1-11.
- Gaffney D, Reid JM, Cameron IM, Vass K, Caslake MJ, Shepherd J, Packard CJ. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15(8):1025-1029.
- Galeano NF, Al-Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC, Deekelbaum RJ. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity. *J Lipid Res* 1998; 39(6):1263-1273.

- Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, Calandra S, Bertolini S, Cossu F, Grishin N, Barnes R, Cohen JC, Hobbs HH. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* 2001;292(5520):1394-1398.
- Genest J Jr, Marcil M, Denis M, Yu L. High density lipoproteins in health and in disease. *J Investig Med* 1999;47(1):31-42.
- Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, Schaefer EJ. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1991; 67(15): 1185-1189.
- Ginsburg GS, Ozer J, Karathanasis SK. Intestinal apolipoprotein A1 gene transcription is regulated by multiple distinct DNA elements and is synergistically activated by the orphan nuclear receptor, hepatocyte nuclear factor 4. *J Clin Invest* 1995; 96(1):528-538.
- Glomset JA, Janssen ET, Kennedy R, Dobbins J. Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *J Lipid Res* 1966;7(5):638-648.
- Glomset JA, Mitchell CD, King WC, Applegate KA, Forte T, Norum KR, Gjone E. In vitro effects of lecithin:cholesterol acyltransferase on apolipoprotein distribution in familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Am N Y Acad Sci* 1980;348:224-243.
- Gofman JW, Delalla O, Glazier F, Freeman NK, Lindgren FT, Nichols AV, Strisower B, Tamplin AR. The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease. *Plasma* 1954; 2:413-484.
- Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 1996; 37(4):693-707.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1985;1:1-39.
- Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 1974;249(16):5153-5162.
- Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial hypercholesterolemia, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, ed 7. McGraw-Hill Book Co, New York, 1995, pp 1981-2030.
- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79(1):8-15.
- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79(1):8-15.
- Gordon DJ. Factors affecting high-density lipoproteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27(3):699-709.
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62(5):707-714.
- Gotto AM Jr. Impact of multiple risk factors on coronary artery disease: beyond total cholesterol. Introduction. *Am J Cardiol* 1998;82(9A):1Q-2Q.

- Goulinet S, Chapman MJ. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(4):786-796.
- Groenemeijer BE, Hallman MD, Reymer PW, Gagne E, Kuivenhoven JA, Bruin T, Jansen H, Lie KI, Bruschke AV, Boerwinkle E, Hayden MR, Kastelein JJ. Genetic variant showing a positive interaction with beta-blocking agents with a beneficial influence on lipoprotein lipase activity, HDL cholesterol, and triglyceride levels in coronary artery disease patients. The Ser447-stop substitution in the lipoprotein lipase gene. REGRESS Study Group. *Circulation* 1997; 95(12):2628-2635.
- Grundy SM, Cleeman JI, Rifkind BM, Kuller LJ. Cholesterol lowering in the elderly population. Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. *Arch Intern Med* 1999;159(15):1670-1678.
- Grundy SM, Garber A, Goldberg R, Havas S, Holman R, Lamendola C, Howard WJ, Savage P, Sowers J, Vega GL. Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: Writing Group IV: lifestyle and medical management of risk factors. *Circulation* 2002; 105(18):e153-58.
- Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J. The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet* 1994;7(2):246-339.
- Haddad L, Day IN, Hunt S, Williams RR, Humphries SE, Hopkins PN. Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia. A non-LDLR, non-APOB kindred. *J Lipid Res* 1999;40(6):1113-1122.
- Haghighassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest* 2001; 108(9):1315-1320.
- Hamann A, Munzberg H, Bultron P, Busing B, Hinney A, Mayer H, Siegfried W, Hebebrand J, Greten H. Missense variants in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene in lean and obese subjects. *Eur J Endocrinol* 1999; 141(1):90-92.
- Hamon Y, Brocardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslus S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D, Chimini G. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* 2000; 2(7):399-406.
- Hansen PS, Norgaard-Petersen B, Meinertz H, Jensen HK, Hansen AB, Klausen IC, Gerdes LU, Faergeman O. Incidence of the apolipoprotein B-3500 mutation in Denmark. *Clin Chim Acta* 1994; 230(1):101-104.
- Hansen PS. Familial defective apolipoprotein B-100. *Dan Med Bull* 1998; 45(4):370-382.
- Hara H, Yokoyama S. Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J Biol Chem* 1991;266(5):3080-3086.
- Hasstedt SJ, Albers JJ, Cheung MC, Jorde LB, Wilson DE, Edwards CQ, Cannon WN, Ash KO, Williams RR. The inheritance of high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteins A-I and A-II. *Atherosclerosis* 1984; 51(1):21-29.
- Havel RJ, Fielding CJ, Olivecrona T, Shore VG, Fielding PE, Egelrud T. Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources. *Biochemistry* 1973; 12(9):1828-1833.
- Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JL, Tall AR. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest* 1995; 96(4):2071-2074.

- Hedrick CC, Castellani LW, Wong H, Lusis AJ. In vivo interactions of apoA-II, apoA-I, and hepatic lipase contributing to HDL structure and antiatherogenic functions. *J Lipid Res* 2001; 42(4):563-570.
- Hegle RA. Monogenic dyslipidemias: window on determinants of plasma lipoprotein metabolism. *Am J Hum Genet* 2001;69(6):1161-1177.
- Hegle RA. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med* 1999; 31(3):217-224.
- Heiberg a, Berg K. The inheritance of hypercholesterolemia with xanthomatosis. A study of 132 kindreds. *Clin Genet* 1976; 9:203-233.
- Heller DA, de Faire U, Pedersen NL, Dahlen G, McClearn GE. Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. *N Engl J Med* 1993; 328(16):1150-1156.
- Hirano K, Yamashita S, Funahashi T, Sakai N, Menju M, Ishigami M, Hiraoka H, Kameda-Takemura K, Tokunaga K, Hoshino T, et al. Frequency of intron 14 splicing defect of cholesteryl ester transfer protein gene in the Japanese general population—relation between the mutation and hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1993; 100(1):85-90.
- Hirata K, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Quintana L, Kronmal GS, Cooper AD, Quertermous T. Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem* 1999; 274(20):14170-14175.
- Ho YK, Brown MS, Goldstein JL. Hydrolysis and excretion of cytoplasmic cholesteryl esters by macrophages: stimulation by high density lipoprotein and other agents. *J Lipid Res* 1980;21(4):391-398.
- Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 1990; 24:133-170.
- Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Berard AM, Cornhill JF, Herderick EE, Feldman SH, Haudenschild CC, Vaisman BL, Hoyt RF Jr, Demosky SJ Jr, Kauffman RD, Hazel CM, Marcovina SM, Brewer HB Jr. Overexpression of lecithin:cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(21):11448-11453.
- Hokanson JE. Functional variants in the lipoprotein lipase gene and risk cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10(5):393-399.
- Holttä-Vuori M, Tanhuanpää K, Moberg W, Somerharju P, Ikonen E. Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol Biol Cell* 2002; 13(9):3107-3122.
- 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(5):547-553.
- Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Maeda N, Assmann G. A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(5):1834-1838.
- Hullinger TG, Panek RL, Xu X, Karathanasis SK. p21-activated kinase-1 (PAK1) inhibition of the human scavenger receptor class B, type 1 promoter in macrophages is independent of PAK1 kinase activity, but requires the GTPase-binding domain. *J Biol Chem* 2001; 276(50):46807-46814.
- Hulthe J, Wiklund O, Bondjers G, Wikstrand J. LDL particle size in relation to intima-media thickness and plaque occurrence in the carotid and femoral arteries in patients with hypercholesterolaemia. *J Intern Med* 2000; 248(1):42-52.

- Hunt SC, Hopkins PN, Bulka K, McDermott MT, Thorne TL, Wardell BB, Bowen BR, Ballinger DG, Skolnick MH, Samuels ME. Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(4):1089-1093.
- Ikwaki K, Rader DJ, Sakamoto T, Nishiwaki M, Wakimoto N, Schaefer JR, Ishikawa T, Fairwell T, Zech LA, Nakamura H, et al. Delayed catabolism of high density lipoprotein apolipoproteins A-I and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest* 1993; 92(4):1650-1658.
- Inazu A, Brown ML, Hessler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, Maruhama Y, Mabuchi H, Tall AR. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 1990; 323(18):1234-1238.
- Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM, Friedl W, Davignon J, McCarthy BJ. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1990; 31(8):1337-1349.
- Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(19):6919-6923.
- Ishida T, Choi S, Kundu RK, Hirata K, Rubin EM, Cooper AD, Quertermous T. Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *J Clin Invest* 2003; 111(3):347-355.
- Jacobs DR Jr, Mebane IL, Bangdiwala SI, Criqui MH, Tyröler HA. High density lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in men and women: the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study. *Am J Epidemiol* 1990; 131(1):32-47.
- Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader DJ. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 1999; 21(4):424-428.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Biotechnology* 1992; 24:467-472.
- Jensen J, Blankenhorn DH, Komerup V. Coronary disease in Familial Hypercholesterolemia. *Circulation* 1967; 36:77-82.
- Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391(6662):82-86.
- Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb* 1991; 11(1):174-182.
- Kempter B. Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG* 1992; 8:7-8.
- Khachadurian AK, Uthman SM. Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutr Metab* 1973; 15(1):132-140.
- Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med* 1964; 37:402-407.
- Khoo KL, van Acker P, Defesche JC, Tan H, van de Kerkhof L, Heijnen-van Eijk SJ, Kastelein JJ, Deslypere JP. Low-density lipoprotein receptor gene mutations in a Southeast Asian population with familial hypercholesterolemia. *Clin Genet* 2000; 58(2):98-105.

- Klos KL, Kardia SL, Ferrell RE, Turner ST, Boerwinkle E, Sing CF. Genome-wide linkage analysis reveals evidence of multiple regions that influence variation in plasma lipid and apolipoprotein levels associated with risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(6):971-978.
- Knoblauch H, Bauerfeind A, Krahenbuhl C, Daury A, Rohde K, Hejannin S, Essioux L, Schuster H, Luft FC, Reich JG. Common haplotypes in five genes influence genetic variance of LDL and HDL cholesterol in the general population. *Hum Mol Genet* 2002; 11(12):1477-1485.
- Knoblauch H, Muller-Myhsok B, Busjahn A, Ben Avi L, Bähring S, Baron H, Heath SC, Uhlmann R, Faulhaber HD, Shpitzen S, Aydin A, Reshef A, Rosenthal M, Eliav O, Muhl A, Lowe A, Schurr D, Harats D, Jeschke E, Friedländer Y, Schuster H, Luft FC, Leitersdorf E. A cholesterol-lowering gene maps to chromosome 13q. *Am J Hum Genet* 2000; 66(1):157-166.
- Knopp RH. Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med* 1999; 341(7):498-511
- Knott TJ, Wallis SC, Powell LM, Pease RJ, Lusic AJ, Blackhart B, McCarthy BJ, Mahley RW, Levy-Wilson B, Scott J. Complete cDNA and derived protein sequence of human apolipoprotein B-100. *Nucleic Acids Res* 1986; 14(18):7501-7503.
- Koivisto UM, Hubbard AL, Mellman I. A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of LDL receptor. *Cell* 2001; 105(5):575-585.
- Kong A, Cox NJ. Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet* 1997; 61(5):1179-1188.
- Koskenvuo M, Kaprio J, Romanov K. Twin studies in metabolic diseases. *Ann Med* 1992; 24(5):379-381.
- Kotze MJ, De Villiers WJ, Steyn K, Kriek JA, Marais AD, Langenhoven E, Herbert JS, Graadt Van Roggen JF, Van der Westhuyzen DR, Coetzee GA. Phenotypic variation among familial hypercholesterolemias heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations. *Arterioscler Thromb* 1993; 13(10):1460-8
- Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edelman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 1997; 387(6631):414-417.
- Krieger M, Kozarsky K. Influence of the HDL receptor SR-BI on atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10(6):491-497.
- Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, Kastelein J. The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res* 1997; 38(2):191-205.
- Kuusi T, Ehnholm C, Viikari J, Harkonen R, Vartiainen E, Puska P, Taskinen MR. Postheparin plasma lipoprotein and hepatic lipase are determinants of hypo- and hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1989; 30(8):1117-1126.
- Kwiterovich PO Jr. Identification and treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia in children and adolescents. *Am J Cardiol* 1993; 72(10):30D-37D.
- Kwiterovich PO Jr. Lipoprotein heterogeneity: diagnostic and therapeutic implications. *Am J Cardiol* 2002a; 90(8A):1i-10i.
- Kwiterovich PO Jr. Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol* 2002b; 90(8A):30i-47i.
- Kwiterovich PO Jr, Levy RI, Fredrickson DS. Neonatal diagnosis of familial type-II hyperlipoproteinaemia. *Lancet* 1973; 1:118-122.

- Kwiterovich PO, Fredrickson DS, Levy RI. Familial hypercholesterolemia (one form of familial type II hyperlipoproteinemia). A study of its biochemical, genetic, and clinical presentation in childhood. *J Clin Invest* 1974; 53:1237-1249.
- Laegrot L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1215(3):209-236.
- Lambert G, Chase MB, Dugi K, Bensadoun A, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. *J Lipid Res* 1999;40(7):1294-1303.
- Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M, Hobbs HH. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest* 1996; 98(4):984-995.
- Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebsch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257(1):29-33.
- Law SW, Lackner KJ, Hospattankar AV, Anchors JM, Sakaguchi AY, Naylor SL, Brewer HB Jr. Human apolipoprotein B-100: cloning, analysis of liver mRNA, and assignment of the gene to chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(24):8340-8344.
- Law SW, Grant SM, Higuchi K, Hospattankar A, Lackner K, Lee N, Brewer HB Jr. Human liver apolipoprotein B-100 cDNA: complete nucleic acid and derived amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(21):8142-8146.
- Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 1999; 104(8):R25-31.
- Lehto M, Laitinen S, Chinetti G, Johansson M, Ehnholm C, Staels B, Ikonen E, Olkkonen VM. The OSBP-related protein family in humans. *J Lipid Res* 2001; 42(8):1203-1213.
- Levak-Frank S, Hofmann W, Weinstock PH, Radner H, Sattler W, Breslow JL, Zechner R. Induced mutant mouse lines that express lipoprotein lipase in cardiac muscle, but not in skeletal muscle and adipose tissue, have normal plasma triglyceride and high-density lipoprotein-cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(6):3165-3170.
- Levak-Frank S, Weinstock PH, Hayek T, Verdery R, Hofmann W, Ramakrishnan R, Sattler W, Breslow JL, Zechner R. Induced mutant mice expressing lipoprotein lipase exclusively in muscle have subnormal triglycerides yet reduced high density lipoprotein cholesterol levels in plasma. *J Biol Chem* 1997; 272(27):17182-17190.
- Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Wilson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 106(4):523-531.
- Li D, Weng S, Yang B, Zander DS, Saldeen T, Nichols WW, Khan S, Mehta JL. Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(2):378-383.
- Li H, Reddick RL, Maeda N. Lack of apoA-I is not associated with increased susceptibility to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb* 1993; 13(12):1814-1821.

- Lingenhel A, Kraff HG, Kotze M, Peeters AV, Kronenberg F, Kruse R, Utermann G. Concentrations of the atherogenic Lp(a) are elevated in FII. *Eur J Hum Genet* 1998;6(1):50-60.
- Liu J, Ahlborn TE, Briggs MR, Kraemer FB. Identification of a novel sterol-independent regulatory element in the human low density lipoprotein receptor promoter. *J Biol Chem* 2000; 275(7):5214-5221.
- Liu ML, Ylitalo K, Vakkilainen J, Nuotio I, Valkonen M, Lahdenperä S, Viikari J, Taskinen MR. Susceptibility of LDL to oxidation in vitro and antioxidant capacity in familial combined hyperlipidemia: comparison of patients with different lipid phenotypes. *Ann Med* 2002; 34(1):48-54.
- Lossow WJ, Shah SN, Chaikoff IL. Isolation of cholesterol-esterifying activity in rat serum by ultracentrifugal flotation. *Biochim Biophys Acta* 1966; 116(1):172-174.
- Lundahl B, Leren TP, Ose L, Hamsten A, Karpe F. A functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein (MTP -493G/T) influences lipoprotein phenotype in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(7):1784-1788.
- Luoma PV. Gene activation, apolipoprotein A-I/high density lipoprotein, atherosclerosis prevention and longevity. *Pharmacol Toxicol* 1997;81(2):57-64.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233-241.
- Lutucuta S, Ballantyne CM, Elghannam II, Gotto AM Jr, Marian AJ. Novel polymorphisms in promoter region of atp binding cassette transporter gene and plasma lipids, severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy. *Circ Res* 2001; 88(9):969-973.
- Mabuchi H, Tamami R, Haba T, Ueda K, Ueda R, Kametani T, Itoh S, Koizumi J, Oota M, Miyamoto S, Takeda R, Takeshita H. Homozygous familial hypercholesterolemia in Japan. *Am J Med* 1978; 65(2):290-297.
- Mackness MI, Arrol S, Abbott CA, Durrington PN. Is paraoxonase related to atherosclerosis. *Chem Biol Interact* 1993; 87(1-3):161-171.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286(1-2):152-154.
- Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7(2):69-76.
- Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner J, Lusis AJ, Navab M, Shih D, Fonarow GC. Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1998;9(4):319-324.
- Mackness MI, Peuchant E, Dumon MF, Walker CH, Clerc M. Absence of "A"-esterase activity in the serum of a patient with Tangier disease. *Clin Biochem* 1989; 22(6):475-478.
- Mackness MI, Walker CH, Carlson LA. Low A-esterase activity in serum of patients with fish-eye disease. *Clin Chem* 1987; 33(4):587-588.
- Mahaney MC, Blangero J, Rainwater DL, Comuzzie AG, VandeBerg JL, Stern MP, MacCluer JW, Hixson JE. A major locus influencing plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in the San Antonio Family Heart Study. Segregation and linkage analyses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(10):1730-1739.
- Mamotte CD, van Bockxmeer FM. A robust strategy for screening and confirmation of familial defective apolipoprotein B-100. *Clin Chem* 1993; 39(1):118-121.

- Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1994;330(15):1041-1046.
- Margolis B, Borg JP, Straight S, Meyer D. The function of PTB domain proteins. *Kidney Int* 1999; 56(4):1230-1237.
- Martini S, Baggio G, Baroni L, Enzi GB, Fellin R, Baiocchi MR, Crepaldi G. Evaluation of HDL2 and HDL3 cholesterol by a precipitation procedure in a normal population and in different hyperlipidemic phenotypes. *Clin Chim Acta* 1984; 137(3):291-298.
- Marz W, Baumstark MW, Schrnagl H, Ruzicka V, Buxbaum S, Herwig J, Pohl T, Russ A, Schaaf L, Berg A, et al. Accumulation of "small dense" low density lipoproteins (LDL) in a homozygous patients with familial defective apolipoprotein B-100 results from heterogenous interaction of LDL subfractions with the LDL receptor. *J Clin Invest* 1993; 92(6):2922-2933.
- McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Røyer LJ, de Wet J, Brocardo C, Chimini G, Francone OL. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(8):4245-4250.
- Mehta KD, Chang R, Norman J. Chilosecyllium plagiiosum low-density lipoprotein receptor: evolutionary conservation of five different functional domains. *J Mol Evol* 1996; 42(2):264-272.
- Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 2002; 43(12):1997-2006.
- Mertens A, Verhamme P, Bielicki JK, Phillips MC, Quarek R, Verreth W, Stengel D, Ninio E, Navab M, Mackness B, Mackness M, Holvoet P. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation* 2003;107(12):1640-1646.
- Mezdour H, Jones R, Dengremont C, Castro G, Maeda N. Hepatic lipase deficiency increases plasma cholesterol but reduces susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Biol Chem* 1997;272(21):13570-13575.
- Miccioni R, Bertolotto A, Navalesi R, Odoguardi L, Boni A, Wessling J, Funke H, Wiebusch H, Eckardstein A, Assmann G. Compound heterozygosity for a structural apolipoprotein A-I variant, apo A-I(L141R)Pisa, and an apolipoprotein A-I null allele in patients with absence of HDL cholesterol, corneal opacifications, and coronary heart disease. *Circulation* 1996; 94(7):1622-1628.
- Miettinen TA, Gylling H. Mortality and cholesterol metabolism in familial hypercholesterolemia. Long-term follow-up of 96 patients. *Arteriosclerosis* 1988; 8(2):163-167.
- Millar JS, Packard CJ. Heterogeneity of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins: what we have learnt from kinetic studies. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9(3):197-202.
- Milne R, Theolis R Jr, Maurice R, Pease RJ, Weech PK, Rassart E, Fruchart JC, Scott J, Marcel YL. The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. *J Biol Chem* 1989; 264(33):19754-19760.
- Moll PP, Sing CF, Williams RR, Mao SJ, Kottke BA. The genetic determination of plasma apolipoprotein A-I levels measured by radioimmunoassay: a study of high-risk pedigrees. *Am J Hum Genet* 1986; 38(3):361-372.
- Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med* 2001; 7(1):41-47.

- Moriyama Y, Okamura T, Inazu A, Doi M, Iso H, Mouri Y, Ishikawa Y, Suzuki H, Iida M, Koizumi J, Mabuchi H, Komachi Y. A low prevalence of coronary heart disease among subjects with increased high-density lipoprotein cholesterol levels, including those with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Prev Med* 1998; 27(5 Pt 1):659-667.
- Müller C. Angina pectoris in hereditary xanthomatosis. *Arch Intern Med* 1939; 64:675-700.
- Müller C. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. *Acta Med Scand* 1938; 89(suppl):75-84.
- Murano S, Shinomiya M, Shirai K, Saito Y, Yoshida S. Characteristic features of long-living patients with familial hypercholesterolemia in Japan. *J Am Geriatr Soc* 1993; 41(3):253-257.
- Myant NB. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1993; 104(1-2):1-18.
- Nakamura Y, Julier C, Wolfi R, Holm T, O'Connell P, Leppert M, White R. Characterization of a human 'mid-satellite' sequence. *Nucleic Acids Res* 1987; 15(6):2537-2547.
- Navab M, Anantharamatah GM, Hama S, Garber DW, Chaddha M, Hough G, Lallone R, Fogelman AM. Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation* 2002; 105(3):290-292.
- Ng DS, Francone OL, Forte TM, Zhang J, Haghpassand M, Rubin EM. Disruption of the murine lecithin:cholesterol acyltransferase gene causes impairment of adrenal lipid delivery and up-regulation of scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem* 1997; 272(25):15777-15781.
- Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 2002; 161(1):1-16.
- Norman D, Sun XM, Bourbon M, Knight BL, Naoumova RP, Soutar AK. Characterization of a novel cellular defect in patients with phenotypic homozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1999; 104(5):619-628.
- Ohba T, Rennett H, Pfeifer SM, He Z, Yamamoto R, Holt JA, Billheimer JT, Strauss JF 3rd. The structure of the human sterol carrier protein X sterol carrier protein 2 gene (SCP2). *Genomics* 1994; 24(2):370-374.
- Ott J. Analysis of human genetics linkage. Rev ed. Baltimore, Md/London, UK: The Johns Hopkins University Press; 1991.
- Ott J. Computer-simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(11):4175-4178.
- Packard C, Caslake M, Shepherd J. The role of small, dense low density lipoprotein (LDL): a new look. *Int J Cardiol* 2000; 74 Suppl 1:S17-22.
- Pak YK, Kanuck MP, Berrios D, Briggs MR, Cooper AD, Ellsworth JL. Activation of LDL receptor gene expression in HepG2 cells by hepatocyte growth factor. *J Lipid Res* 1996; 37(5):985-998.
- Paszy C, Maeda N, Verstuyft J, Rubin EM. Apolipoprotein AI transgene corrects apolipoprotein E deficiency-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 1994; 94(2):899-903.
- Patel DD, Soutar AK, Knight BL. A mutation and an antibody that affect chemical cross-linking of low-density lipoprotein receptors on human fibroblasts. *Biochem J* 1993; 289 (Pt 2):569-573.

- Pattengale PK, Smith RW, Gerber P. Selective transformation of B lymphocytes by E.B. virus. *Lancet* 1973; 2(7820):93-94.
- Peacock JM, Arnett DK, Atwood LD, Myers RH, Coon H, Rich SS, Province MA, Heiss G. Genome scan for quantitative trait loci linked to high-density lipoprotein cholesterol: The NHLBI Family Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(11):1823-1828.
- Perret B, Mabille L, Martinez L, Terce F, Barbaras R, Collet X. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation. *J Lipid Res* 2002; 43(8):1163-1169.
- Pietzsch J, Wiedemann B, Julius U, Nitzsche S, Gehrlich S, Bergmann S, Leonhardt W, Jaross W, Hanefeld M. 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(10):2074-2087.
- Pineda Torra I, Gervois P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10(2):151-159.
- Ploughman LM, Roehnk M. Estimating the power of a proposed linkage study for a complex genetic trait. *Am J Hum Genet* 1989; 44(4):543-551.
- Plump AS, Masucci-Magoulas L, Bruce C, Bisgaier CL, Breslow JL, Tall AR. Increased atherosclerosis in ApoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(4):1105-1110.
- Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(20):9607-9611.
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33(3):498-507.
- Pullinger CR, Gaffney D, Gutierrez MM, Malloy MJ, Schumaker VN, Packard CJ, Kane JP. The apolipoprotein B R3531C mutation. Characteristics of 24 subjects from 9 kindreds. *J Lipid Res* 1999; 40(2):318-327.
- Pullinger CR, Hakamata H, Duchateau PN, Eng C, Aouizerat BE, Cho MH, Fielding CJ, Kane JP. Analysis of hAHC1 gene 5' end: additional peptide sequence, promoter region, and four polymorphisms. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271(2):451-455.
- Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, Frost PH, Malloy MJ, Schumaker VN, Kane JP. Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. *J Clin Invest* 1995;95(3):1225-1234.
- Rabes JP, Varet M, Devillers M, Aegeter P, Vileger L, Krempf M, Junien C, Boileau C. R3531C mutation in the apolipoprotein B gene is not sufficient to cause hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(10):E76-E82.
- Rader DJ, Ikwaki K. Unravelling high density lipoprotein-apolipoprotein metabolism in human mutants and animal models. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7(3):117-123.
- Reedman BM, Klein G. Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV)-associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. *Int J Cancer* 1973; 11(3):499-520.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391(6662):79-82.

- Ridker PM, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Plutzky J, Zee RY. Alanine for Proline Substitution in the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma-2 (PPARG2) Gene and the Risk of Incident Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(5):859-863.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 1998;97(5):425-428.
- Rigotti A, Trigatti B, Babitt J, Penman M, Xu S, Krieger M. Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8(3):181-188.
- Ritsch A, Patsch JR. Cholesteryl ester transfer protein: gathering momentum as a genetic marker and as drug target. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14(2):173-179.
- Robles-Osorio L, Ordonez ML, Aguilar-Salinas CA, Auron-Gomez M, Tusie-Luna MT, Gomez-Perez FJ, Rull-Rodrigo JA. Familial hypercholesterolemia due to ligand-defective apolipoprotein b100. First case report in a mexican family. *Arch Med Res* 2003; 34(1):70-75.
- Rosen A, Gergely P, Jondal M, Klein G, Britton S. Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of human lymphocytes in vitro. *Nature* 1977; 267(5607):52-54.
- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2):115-126.
- Rubba P, Mercuri M, Facecchia F, Iannuzzi A, Irace C, Strisciuglio P, Gnasso A, Tang R, Andria G, Bond MG, et al. Premature carotid atherosclerosis: does it occur in both familial hypercholesterolemia and homocystinuria? Ultrasound assessment of arterial intima-media thickness and blood flow velocity. *Stroke* 1994;25(5):943-950.
- Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyf JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991; 353(6341):265-267.
- Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyf JG, Clift SM. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991; 353(6341):265-267.
- Ruddling M, Norstedt G, Olivecrona H, Reihner E, Gustafsson JA, Angelin B. Importance of growth hormone for the induction of hepatic low density lipoprotein receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(15):6983-6987.
- Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, Cohen N, Morabia A, Passa P, Froguel P. Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346(8979):869-872.
- Russell DW. Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism. *Cell* 1999;97(5):539-542.
- Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denefle P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999; 22(4):352-355.
- Sakai N, Yamashita S, Hirano K, Menju M, Arai T, Kobayashi K, Ishigami M, Yoshida Y, Hoshino T, Nakajima N, et al. Frequency of exon 15 missense mutation (442D:G) in cholesteryl ester transfer protein gene in hyperalphalipoproteinemic Japanese subjects. *Atherosclerosis* 1995; 114(2):139-145.
- Salonen JT, Malin R, Tuomainen TP, Nyyssonen K, Lakka TA, Lehtimaki T. Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. *BMJ* 1999; 319(7208):487-489.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Sanchez HB, Yieh L, Osborne TF. Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 1995; 270(3):1161-1169.
- Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998; 62(1):36-44.
- Santamarina-Fojo S, Haudenschild C, Amar M. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9(3):211-219.
- Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C, Qiu Y, Freeman L, Cheng JF, Osorio J, Remaley A, Yang XP, Haudenschild C, Prades C, Chimini G, Blackmon E, Francois T, Duverger N, Rubin EM, Rosier M, Deneffe P, Fredrickson DS, Brewer HB Jr. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(14):7987-7992.
- Schaefer JR, Rader DJ, Ikewaki K, Fairwell T, Zech LA, Kindt MR, Davignon J, Gregg RE, Brewer HB Jr. In vivo metabolism of apolipoprotein A-I in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1992; 12(7):843-848.
- Schaefer JR, Scharnagl H, Baumstark MW, Schweer H, Zech LA, Seyberth H, Winkler K, Steinmetz A, Marz W. Homozygous familial defective apolipoprotein B-100. Enhanced removal of apolipoprotein E-containing VLDLs and decreased production of LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(2):348-353.
- Schaefer JR, Winkler K, Schweer H, Hoffmann MM, Soufi M, Scharnagl H, Maisch B, Wieland H, Steinmetz A, Marz W. Increased production of HDL ApoA-I in homozygous familial defective ApoB-100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(7):1796-1799.
- Schaffer AA, Gupta SK, Shriram K, Cottingham RW Jr. Avoiding recomputation in linkage analysis. *Hum Hered* 1994; 44(4):225-237.
- Scheuner MT. Genetic predisposition to coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2001; 16(4):251-260.
- Schmidt HH, Stuhmann M, Shamburek R, Schewe CK, Ehardt M, Zech LA, Buttner C, Wendi M, Beisiegel U, Brewer HB Jr, Manns MP. Delayed low density lipoprotein (LDL) catabolism despite a functional intact LDL-apolipoprotein B particle and LDL-receptor in a subject with clinical homozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(6):2167-2174.
- Schrott HG, Goldstein JL, Hazzard WR, Megoodwin MM, Motulsky AG. Familial hypercholesterolemia in a large kindred. Evidence for a monogenic mechanism. *Ann Intern Med* 1972; 76:711-720.
- Secretaria de Salud. 2001. Direccion General de Epidemiologia. Mexico
- Seftel HC, Baker SG, Sandler MP, Forman MB, Joffe BI, Mendelsohn D, Jenkins T, Mienv CJ. A host of hypercholesterolaemic homozygotes in South Africa. *Br Med J* 1980; 281(6241):633-636.
- Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(3):928-933.
- Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96(6):3005-3008.
- Shah PK, Yano J, Reyes O, Chyu KY, Kaul S, Bisgaier CL, Drake S, Cercek B. High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque destabilization. *Circulation* 2001; 105(25):3047-3050.

- Shen Y, Lookene A, Nilsson S, Olivecrona G. Functional analyses of human apolipoprotein CII by site-directed mutagenesis: identification of residues important for activation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 2002; 277(6):4334-4342.
- Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998 ; 394(6690):284-287.
- Shimada M, Ishibashi S, Inaba T, Yagyu H, Harada K, Osuga JI, Ohashi K, Yazaki Y, Yamada N. Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(14):7242-7246.
- Silver DL, Tall AR. The cellular biology of scavenger receptor class B type I. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12(5):497-504.
- Smilde TJ, van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet* 2001; 357(9256):577-581.
- Smilde TJ, van Wissen S, Wollersheim H, Trip MD, Kastelein JJ, Stalenhoef AF. Effect of aggressive versus conventional lipid lowering on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolaemia (ASAP): a prospective, randomised, double-blind trial. *Lancet* 2001; 357(9256):577-581.
- Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 1990; 265(4):2306-2310.
- Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(2):587-591.
- Soro A, Pajukanta P, Lilja HE, Ylitalo K, Heikkilä T, Perola M, Cantor RM, Viikari JS, Taskinen MR, Peltonen L. Genome scans provide evidence for low-HDL-C loci on chromosomes 8q23, 16q24.1-24.2, and 20q13.11 in Finnish families. *Am J Hum Genet* 2002;70(5):1333-1340.
- Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, Kirchgessner TG, Komaromy MC, Mohandas T, Schotz MC, Lusis AJ. Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. *Genomics* 1987; 1(2):138-144.
- Sprecher DL, Schaefer EJ, Kent KM, Gregg RE, Zech LA, Hoeg JM, McManus B, Roberts WC, Brewer HB Jr. Cardiovascular features of homozygous familial hypercholesterolemia: analysis of 16 patients. *Am J Cardiol* 1984;54(1)20-30.
- Stangl H, Cao G, Wayne KL, Hobbs HH. Scavenger receptor, class B, type I-dependent stimulation of cholesterol esterification by high density lipoproteins, low density lipoproteins, and nonlipoprotein cholesterol. *J Biol Chem* 1998; 273(47):31002-31008.
- Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, Hromas R. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* 2001; 167(8):4137-4140.
- Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999; 144(2):285-301.
- Steinberg GR, Rush JW, Dyck DJ. AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284(3):E648-E654.

- Stopeck AT, Nicholson AC, Mancini FP, Hajjar DP. Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268(23):17489-17494.
- Si-Pierre AC, Ruel IL, Cantin B, Dagenais GR, Bernard PM, Despres JP, Lamarche B. Comparison of various electrophoretic characteristics of LDL particles and their relationship to the risk of ischemic heart disease. *Circulation* 2001; 104(19):2295-2299.
- Streicher R, Kotzka J, Muller-Wieland D, Siemeister G, Munck M, Avel H, Krone W. SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem* 1996; 271(12):7128-7133.
- Sudhof TC, Van der Westhuyzen DR, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 1987;262(22):10773-10779.
- Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA* 1993; 269(23):3015-3023.
- Sviridov D, Hoang A, Huang W, Sasaki J. Structure-function studies of apoA-I variants: site-directed mutagenesis and natural mutations. *J Lipid Res* 2002; 43(8):1283-1292.
- Tai DY, Pan JP, Lee-Chen GJ. Identification and haplotype analysis of apolipoprotein B-100 Arg3500-->Trp mutation in hyperlipidemic Chinese. *Clin Chem* 1998;44(8 Pt 1):1659-1665.
- Tai ES, Ordovas JM, Corella D, Deurenberg-Yap M, Chan E, Adiconis X, Chew SK, Loh LM, Tan CE. The TaqIB and -629C>A polymorphisms at the cholesteryl ester transfer protein locus: associations with lipid levels in a multiethnic population. The 1998 Singapore National Health Survey. *Clin Genet* 2003; 63(1):19-30.
- Tall AR, Wang N. Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. *J Clin Invest* 2000; 106(10):1205-1207.
- Tall AR. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl A:A31-A35.
- Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies. *J Intern Med* 1995; 237(1):5-12.
- Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 1990; 86(2):379-384.
- Tall AR. Plasma lipid transfer proteins. *J Lipid Res* 1986; 27(4):361-367.
- Tan KC, Shiu SW, Pang RW, Kung AW. Effects of testosterone replacement on HDL subfractions and apolipoprotein A-I containing lipoproteins. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48(2):187-194.
- Tashiro J, Endo M, Bujo H, Shinomiya M, Morisaki N, Saito Y. New type of the internalization-defective low-density lipoprotein receptor owing to two-nucleotide deletion (2199delCA or 2201delCA) in Japanese patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(9):712-719.
- Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 1989;17(16):6463-6471.
- Teh EM, Dolphin PJ, Breckenridge WC, Tan MH. Human plasma CETP deficiency: identification of a novel mutation in exon 9 of the CETP gene in a Caucasian subject from North America. *J Lipid Res* 1998; 39(2):442-456.

Teisberg P, Gjone E. Probable linkage of LCAT locus in man to the alpha haptoglobin locus on chromosome 16. *Nature* 1974; 249(457):550-551.

Thannhauser DJ, Magendanz H. The different clinical groups of xanthomatous diseases: A clinical physiological study of 22 cases. *Ann Intern Med* 1938; 11:1662-1746.

Tordjman K, Bernal-Mizrachi C, Zemany L, Weng S, Feng C, Zhang F, Leone TC, Coleman T, Kelly DP, Semenkovich CF. PPARalpha deficiency reduces insulin resistance and atherosclerosis in apoE-null mice. *J Clin Invest* 2001; 107(8):1025-1034.

Tribble DL, Rizzo M, Chait A, Lewis DM, Blanche PJ, Krauss RM. Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low-density lipoproteins. *Am J Med* 2001; 110(2):103-110.

Trigatti B, Rigotti A, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11(2):123-131.

Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J. Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 1998; 273(50):33556-33560.

Tsukamoto K, Watanabe T, Matsushima T, Kinoshita M, Kato H, Hashimoto Y, Kurokawa K, Teramoto T. Determination by PCR-RFLP of apo E genotype in a Japanese population. *J Lab Clin Med* 1993; 121(4):598-602.

Tybaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr P, Nordestgaard BG. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1998; 338(22):1577-1584.

Ueda Y, Royer L, Gong E, Zhang J, Cooper PN, Francone O, Rubin EM. Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J Biol Chem* 1999; 274(11):7165-7171.

Umans-Eckenhausen MA, Sijbrands EJ, Kastelein JJ, Defeseche JC. Low-density lipoprotein receptor gene mutations and cardiovascular risk in a large genetic cascade screening population. *Circulation* 2002; 106(24):3031-3036.

van Driel IR, Davis CG, Goldstein JL, Brown MS. Self-association of the low density lipoprotein receptor mediated by the cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 1987;262(33):16127-16134.

van Eck M, Bos IS, Kaminski WE, Orso E, Rothe G, Twisk J, Botcher A, Van Amersfoort ES, Christiansen-Weber TA, Fung-Leung WP, Van Berkel TJ, Schmitz G. Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(9):6298-6303.

Varban ML, Riminger F, Wang N, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Gosselin ML, Dixon KL, Deeds JD, Acton SL, Tall AR, Huszar D. Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(8):4619-4624.

Varret M, Rabes JP, Saint-Jore B, Cenarro A, Marinoni JC, Civeira F, Devillers M, Krempf M, Coulon M, Thiar R, Kotze MJ, Schmidt H, Buzzi JC, Kostner GM, Bertolini S, Pocovi M, Rosa A, Farnier M, Martinez M, Junien C, Boileau C. A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet* 1999; 64(5):1378-1387.

Vega GL, Grundy SM. In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary, moderate hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1986; 78(5):1410-1414.

- Villegier L, Abifadel M, Allard D, Rabes JP, Thiart R, Kotze MJ, Beroud C, Junien C, Boileau C, Varret M. The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database. *Hum Mutat* 2002; 20(2):81-87.
- von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(1):13-27.
- Wang N, Arai T, Ji Y, Rinninger F, Tall AR. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J Biol Chem* 1998; 273(49):32920-32926.
- Wang X, Paigen B. Quantitative trait loci and candidate genes regulating HDL cholesterol: a murine chromosome map. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(9):1390-1401.
- Waterham HR, Koster J, Romeijn GJ, Hennekam RC, Vreken P, Andersson HC, FitzPatrick DR, Kelley RI, Wanders RJ. Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J Hum Genet* 2001; 69(4):685-694.
- Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44(3):388-396.
- Weber JL. Informativeness of human (dC-dA)n(dG-dT)n polymorphisms. *Genomics* 1990; 7(4):524-530.
- Weinstock PH, Bisgaier CL, Aalto-Setälä K, Radner H, Ramakrishnan R, Levak-Frank S, Essenberg AD, Zechner R, Breslow JL. Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. *J Clin Invest* 1995; 96(6):2555-2568.
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millsseau P, Vaysseix G, Lathrop M. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992; 359(6398):794-801.
- Weng W, Brandenburg NA, Zhong S, Halkias J, Wu L, Jiang XC, Tall A, Breslow JL. ApoA-II maintains HDL levels in part by inhibition of hepatic lipase. Studies in apoA-II and hepatic lipase double knockout mice. *J Lipid Res* 1999; 40(6):1064-1070.
- Whitfield JB, Martin NG. Plasma lipids in twins. Environmental and genetic influences. *Atherosclerosis* 1983;48(3):265-277.
- Williams PT, Vranizan KM, Austin MA, Krauss RM. Associations of age, adiposity, alcohol intake, menstrual status, and estrogen therapy with high-density lipoprotein subclasses. *Arterioscler Thromb* 1993; 13(11):1654-1661.
- Wilson HM, Patel JC, Skinner ER. The distribution of high-density lipoprotein subfractions in coronary survivors. *Biochem Soc Trans* 1990; 18(6):1175-1176.
- Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis* 1988; 8(6):737-741.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97(18):1837-1847.
- Wijlund KR, Yi M, Campagna F, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Ho YK, Garcia JV, Hobbs HH, Cohen JC. Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet* 2002;11(24):3019-3030.

TESIS C.A.
FALLA DE ORIGEN

- Wittekoek ME, Moll E, Pimstone SN, Trip MD, Lansberg PJ, Defeseche JC, van Doormaal JJ, Hayden MR, Kastelein JJ. A frequent mutation in the lipoprotein lipase gene (D9N) deteriorates the biochemical and clinical phenotype of familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(11):2708-2713.
- Wittekoek ME, Pimstone SN, Reymer PW, Feuth L, Botma GJ, Defeseche JC, Prins M, Hayden MR, Kastelein JJ. A common mutation in the lipoprotein lipase gene (N291S) alters the lipoprotein phenotype and risk for cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 97(8):729-735.
- Wong WT, Kraus MH, Carlomagno F, Zelano A, Druck T, Croce CM, Huebner K, Di Fiore PP. The human *eps15* gene, encoding a tyrosine kinase substrate, is conserved in evolution and maps to 1p31-p32. *Oncogene* 1994; 9(6):1591-1597.
- Yamashita S, Hui DY, Wetterau JR, Sprecher DL, Harmony JA, Sakai N, Matsuzawa Y, Tarui S. Characterization of plasma lipoproteins in patients heterozygous for human plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency: plasma CETP regulates high-density lipoprotein concentration and composition. *Metabolism* 1991;40(7):756-763.
- Yeagle PL. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta* 1985;822(3-4):267-287.
- Young SG, Fielding CJ. The ABCs of cholesterol efflux. *Nat Genet* 1999; 22(4):316-318.
- Young SG. Recent progress in understanding apolipoprotein B. *Circulation* 1990;82(5):1574-1594.
- Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs JH, Shauf PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-B1 activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001;7(7):853-857.
- Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000; 149(2):251-266.
- Zambon A, Deeb SS, Paultetto P, Crepaldi G, Brunzell JD. Hepatic lipase: a marker for cardiovascular disease risk and response to therapy. *Curr Opin Lipidol* 2003;14(2):179-189.
- Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, Tall AR. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996; 97(12):2917-2923.
- Zuliani G, Arca M, Signore A, Bader G, Fazio S, Chianelli M, Bellosta S, Campagna F, Montali A, Maioli M, Pacifico A, Ricci G, Fellin R. Characterization of a new form of inherited hypercholesterolemia: familial recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(3):802-809.
- Zuliani G, Vigna GB, Corsini A, Maioli M, Romagnoni F, Fellin R. Severe hypercholesterolaemia: unusual inheritance in an Italian pedigree. *Eur J Clin Invest* 1995;25(5):322-331.
- Zwarts KY, Clee SM, Zwiderman AH, Engert JC, Singaraja R, Loubser O, James E, Roomp K, Hudson TJ, Jakema JW, Kastelein JJ, Hayden MR. ABCA1 regulatory variants influence coronary artery disease independent of effects on plasma lipid levels. *Clin Genet* 2002; 61(2):115-125.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XI. ANEXOS

ANEXO I.

CONSIDERACIONES ÉTICAS Y CARTA DE CONSENTIMIENTO. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO: Búsqueda de los genes involucrados en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular en familias con hipercolesterolemia familiar.

La siguiente información describe el protocolo y su papel como participante.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO: El propósito del estudio es identificar los defectos genéticos asociados al desarrollo de aterosclerosis en pacientes con hipercolesterolemia familiar.

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR:

Su participación requiere de la toma de una muestra de sangre (40 ml) y del llenado de un cuestionario para evaluar su historia médica.

Deberá asistir en una ocasión en ayunas (por la mañana), al Departamento de Endocrinología y Metabolismo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". La cantidad total de sangre obtenida no implica riesgos para su salud. Los exámenes no tendrán ningún costo para usted.

CONFIDENCIALIDAD Los datos obtenidos de su persona son absolutamente confidenciales, no pueden ser utilizados con otro fin. Usted será informado de cualquier hallazgo obtenido en esta investigación.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

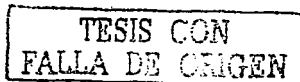
Yo _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en este estudio y es de mi conocimiento que puedo retirarme de éste en cualquier momento si así lo deseo. También puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio. En caso de que decidiera retirarme, la atención que recibo como paciente no se verá afectada. Recibiré, si así lo solicito, los resultados de mi participación. Debo informar, tan pronto como sea posible, a los investigadores, de cualquier cambio importante que ocurra en mi estado de salud, incluyendo el consumo de medicamentos, suspensión o inicio de algún hábito (ej. tabaquismo) o cambio de domicilio. Las muestras obtenidas sólo podrán ser utilizadas para los fines de este estudio.

He comprendido el contenido de esta carta de consentimiento, mis dudas han sido resueltas y voluntariamente acepto participar en este estudio.

Firma del investigador y fecha

Firma del paciente y fecha

Firma del testigo, parentesco y fecha



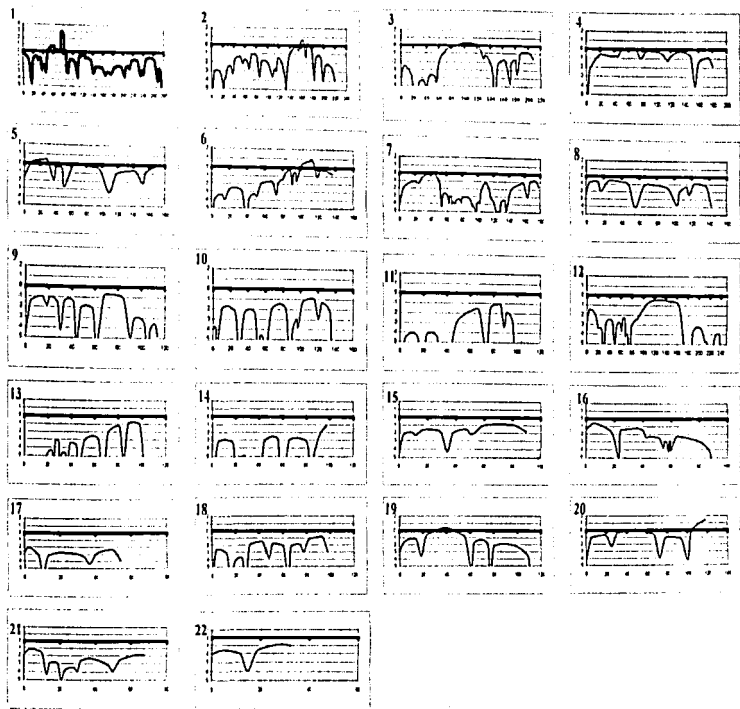
ANEXO 2. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes de las IL17 e IL17F

Región amplificada	Oligonucleótidos en dirección 5' → 3' ^a	Temperatura de alineamiento (°C)	Producto amplificado (pb)
Interleucina 17 (IL17)			
Promotor parte 3	S-TCCTCCAATTCCTTTGGC A-GATGGAGAAAAAGGGGGGCG	58	502
Promotor parte 2	S-CAGAGAAAAAACCCTAACTCC A-TATTTATGAACATATGTACAGCTGCC	54	531
Promotor parte 1	S-GAATTGTCTCCACAACACCTGGC A-AGCGTTTCATGCCACGGTC	56	587
Exón 1	S-TCACCCCTGAACCCACTGGC A-GGATCTCCATAGTCAGAACCAGC	57	270
Exón 2	S-TCCAACCTCTCTCTCTTCCC A-TGGAGATCCAAAGGTGAGGTGG	56	237
Exón 3	S-TTCTGTTTTATTTCTTTCCC A-TGAGGGTTCCCTGAGGGGCTG	58	379
Interleucina 17F (IL17F)			
Promotor parte 3	S-CAAGCCTAATCAAACCTCAAGCG A-CTCATCCTTAGAGGAGCCTTGG	55	525
Promotor parte 2	S-CACCACTAGGAGTCTAACCATGGG A-CCGGAGTTACTGACGAATGCAG	55	480
Promotor parte 1 y exón 1	S-GTGGGCAATGGGGGTGGAAG A-ATTCTGTTTCTGAAATCCTAGGC	56	394
Exón 2	S-CTCTTGCTAGTAGGTGAGGCGAG A-TTTCATTTGTTAAGAGGATTTCCC	55	401

^a S= oligonucleótido sentido, A= oligonucleótido antisentido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

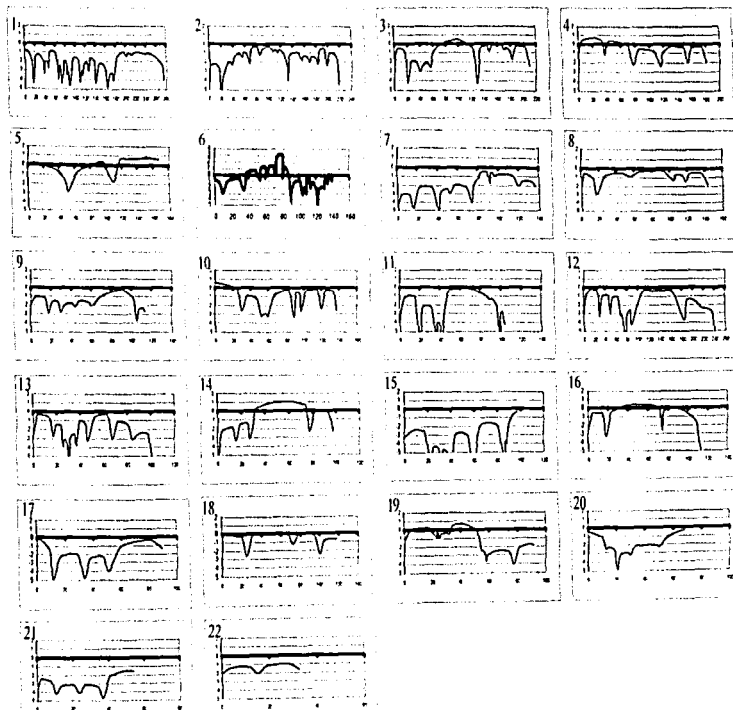
ANEXO 3. Gráficas del análisis de ligamiento de múltiples puntos para los 22 autosomas (hipercolesterolemia familiar)



TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

Anotaciones. El número ubicado en la parte de arriba a la derecha de cada una de las gráficas corresponde a cada uno de los cromosomas. El eje de las X representa la distancia relativa en centimorgans y el eje de las Y representa el LOD score paramétrico del análisis de ligamiento de múltiples puntos.

ANEXO 4. Gráficas del análisis de ligamiento de múltiples puntos para los 22 autosomas (hiperfalioproteíemia)



Anotaciones. El número ubicado en la parte de arriba a la derecha de cada una de las gráficas corresponde a cada uno de los cromosomas. El eje de las X representa la distancia relativa en centimorgans y el eje de las Y representa el LOD score paramétrico del análisis de ligamiento de múltiples puntos.

TESIS CON
 FALTA DE
 PAGEN

ANEXO 5. Artículo publicado

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**Locus on Chromosome 6p Linked to Elevated HDL
Cholesterol Serum Levels and to Protection Against
Premature Atherosclerosis in a Kindred With
Familial Hypercholesterolemia**

Samuel Canzales-Quintero, Carlos A. Aguilar-Salinas, Eduardo Reyes-Rodríguez, Laura Riba,
Maribel Rodríguez-Lories, Salvador Ramírez-Jiménez, Adriana Huertas-Vázquez,
Verónica Fragoso-Intiveros, Alejandro Zentella-Dehesa, José L. Ventura-Gallegos,
Gerardo Vega-Hernández, Angelina López-Estrada, Moisés Amador-Gómez,
Francisco Gómez-Pérez, Juan Rull, Nancy J. Cox, Giacomo I. Bell, María Teresa Juste-Luna

Circulation Research, 2003; 92:569-576.

Clinical Research

Locus on Chromosome 6p Linked to Elevated HDL Cholesterol Serum Levels and to Protection Against Premature Atherosclerosis in a Kindred With Familial Hypercholesterolemia

Samuel Canizales-Quinteros, Carlos A. Aguilar-Salinas, Eduardo Reyes-Rodríguez, Laura Riba, Maribel Rodríguez-Torres, Salvador Ramírez-Jiménez, Adriana Huertas-Vázquez, Verónica Fragos-Ontiveros, Alejandro Zentella-Dehesa, José L. Ventura-Gallegos, Gerardo Vega-Hernández, Angelina López-Estrada, Moisés Aurón-Gómez, Francisco Gómez-Pérez, Juan Rull, Nancy J. Cox, Graeme I. Bell, María Teresa Tusie-Luna

Abstract—Heterozygous familial hypercholesterolemia (FH) is a highly atherogenic genetic disorder leading to premature coronary heart disease (CHD), usually before 60 years of age. We studied an extended multigenerational kindred with FH linked to chromosome 1p32 in which atherosclerotic complications were either delayed or prevented in individuals with elevated HDL cholesterol (HDL-C) levels or hyperalphalipoproteinemia (HA). Premature CHD was observed in FH individuals without HA. The study of this family established that the HA trait in the family also followed an autosomal dominant mode of inheritance with a pattern of segregation independent from FH. We identified a locus on chromosome 6 linked to elevated HDL-C levels (HA) in this family. Haplotype analysis refined the localization to a 7.32-cM interval (73 to 80 cM from pter) flanked by markers D6S1280 and D6S1275. Parametric 2-point and multipoint analyses yielded maximum LOD scores of 3.05 and 3.17, respectively. This finding was confirmed with a nonparametric multipoint score of 3.78 ($P < 0.0009$). We propose that this locus, linked to elevated HDL-C levels, confers protection against premature CHD within an FH context. (*Circ Res*. 2003;92:569-576.)

Key Words: LDL cholesterol • HDL cholesterol • genetics • familial hypercholesterolemia • hyperalphalipoproteinemia

Epidemiological studies have associated elevated LDL cholesterol (LDL-C) levels with an increased risk for coronary heart disease (CHD). Familial hypercholesterolemia (FH) was the first entity directly associated with the development of premature atherosclerosis and CHD.

FH (see Mendelian inheritance in Man [MIM]:143890, which can be accessed online [OMIM] at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), also referred to as autosomal dominant hypercholesterolemia or ADHL, is an inherited metabolic disorder characterized by an autosomal dominant pattern of transmission, high LDL-C levels, which give rise to tendon xanthomas and arcus corneae, and premature atherosclerosis and early death from cardiovascular complications. It is also often referred to as familial heterozygous hypercholesterolemia because of its

dose-dependent effect, ie, homozygous individuals exhibit a more severe clinical phenotype than do heterozygotes. The prevalence of the latter in the majority of populations is 1/500, making this disorder one of the most prevalent dyslipidemias associated with CHD. Several studies in FH individuals support the high atherogenicity associated with the disease. In England, the prevalence of CHD in men is 85% by age 60 years and 75% in women by age 70 years. Another study in Norway showed that the mean ages of death for male and female FH heterozygotes were 55 and 64 years, respectively.

In addition to high cholesterol and LDL-C levels, several other factors have been associated with an elevated risk for cardiovascular disease, including hypertension, apoB 3/4 or 4:4 genotypes, and high levels of lipoprotein(a).¹⁻³

Original received August 21, 2002; resubmission received December 17, 2002; revised resubmission received February 14, 2003; accepted February 14, 2003.

From Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica (S-C-Q, L-R, M-R-T, S-R-J, A-H-V, V-L-D, M-T-L-E), Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Departamento de Sistemas Biológicos (S-C-Q), Universidad Autónoma Metropolitana-Neohitómicos, Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lipidos (L-A-K-S, F-R-R, A-J, M-A-G, J-G-P, J-B), Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, and Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular (A-Z, D, J-L-V-G), and Dirección General de Servicios de Computo Académico (G-V-H), Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México, and the Howard Hughes Medical Institute (G-I-H) and Departments of Biochemistry and Molecular Biology (G-I-H) and Medicine and Human Genetics (N-J-C, G-I-H), The University of Chicago, Chicago, Ill.

Correspondence to: María Teresa Tusie-Luna, MD, PhD, Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15 Colonia Sección 16, Tlalpan 14000, México DF. E-mail: tusiel@servidor.unam.mx © 2003 American Heart Association, Inc.

FH is genetically heterogeneous with mutations in different genes affecting different families. The most common cause is mutations in the LDL receptor (LDLR)⁶ on chromosome 19 (19p13), with >800 mutations reported to date (LDLR Mutation Database, <http://www.ucl.ac.uk/fh> and <http://www.umid.nckerr.fr> are databases exclusive for LDLR mutations). A less common cause is mutations in the apoB gene on chromosome 2p23-p24 (FH), MIM 1444010, with only 3 reported mutations.⁷⁻⁹ Finally, genetic studies have identified a third locus on chromosome 1p34-132.¹⁰⁻¹²

As opposed to hypercholesterolemia, increased levels of HDL cholesterol (HDL-C) or hyperalphalipoproteinemia (HA, MIM 143470) (>60 mg/dL) are inversely correlated with CHD.¹³⁻¹⁵ High levels of HDL-C are usually associated with late onset of atherosclerosis and longevity.¹⁶ Specifically, HDL₂ cholesterol levels are inversely correlated with the incidence of CHD and are considered the HDL-C particle subclass, with the most prominent effect against the development of atherosclerosis.¹⁷

Up to 70% of the variation in HDL-C levels in humans is genetically determined. Segregation analyses have found evidence of a major gene-type influence affecting high HDL levels under both mendelian and nonmendelian models.¹⁸⁻²⁰ So far, there are 10 published reports of genome-wide scans for the identification of quantitative trait loci that determine HDL levels in humans. These studies have shown evidence of linkage with 22 different loci on 14 chromosomes.²¹

Genes that influence the concentration and nature of lipid content in HDL-C particles have an important effect on its role on overall lipid metabolism.²² In humans, a mutation in the gene encoding apoA-I, the major component of the HDL-C particle, results in increased stability (Milano mutation) and confers protection against cardiovascular disease.²³

The mechanisms by which elevated HDL-C levels reduce cardiovascular risk are not completely understood. This effect is probably mediated mostly through its induction of cellular antioxidant effect and reverse cholesterol transport from peripheral tissue to the liver.²⁴⁻²⁶ HDL-C has additional beneficial antithrombotic effects, such as inhibition of LDL particle oxidation,²⁷ inhibition of cytokine-induced expression of adhesion molecules by endothelial cells,²⁸ and the activation of endothelial NO synthase.²⁹

We identified a kindred (CGZ) with FH and HA, in which both traits exhibit an autosomal dominant pattern of inheritance and segregate independently. Atherosclerotic complications were either delayed or prevented in members of the family affected with FH who also exhibited elevated HDL-C levels, whereas premature coronary disease was observed in 2 individuals with FH but no evidence of HA. We have mapped the FH trait in this family to markers on chromosome 19p32, a region identified as the third locus for FH.¹⁰⁻¹² Through a whole genome scan, we identified a novel locus for the HA trait on chromosome 6p.

Materials and Methods

Subjects and Clinical Features

The proband is a 94-year-old woman first evaluated at 88 years. She was admitted to the Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, where she was diagnosed with gastritis and arterial

hypertension. The patient smoked from age 15 to 30 years. At age 91 years, she suffered transient ischemic episodes. A Doppler ultrasound of the carotid arteries showed a large plaque on both sides, especially on the left carotid artery. The largest lesion caused a 50% obstruction of the vessel lumen. The symptoms disappeared after dipyridamol treatment. An ECG showed a left bundle branch blockade. Hypercholesterolemia was diagnosed (425 mg/dL), and the patient was referred to the lipid clinic. On physical examination, she had a body mass index of 24.6 and blood pressure of 140/80 mm Hg. Pulses at the lower limbs were normal. Symmetrical aortic calcification of the abdominal aorta and iliac arteries were detected and confirmed by ultrasound. Blood chemistry and thyroid-stimulating hormone concentrations were normal. A complete lipid profile revealed the following: total cholesterol level 395 mg/dL, LDL-C 220 mg/dL, HDL-C 98 mg/dL, apoA-I 190 mg/dL, and triglycerides (TGs) 110 mg/dL. The LDL-C accumulation was mainly explained by increased concentrations of the smaller and denser LDL-C particles. The HDL-C elevation was mainly due to the HDL₂ subclass, which represented 52% of the total. Increased lipoprotein(a) concentrations were also detected (136 mg/dL).

A low-fat low-cholesterol diet and lovastatin (20 to 40 mg/d) treatment were prescribed but were followed irregularly. A lipid profile during the follow-up was as follows: cholesterol 281.2 mg/dL, LDL-C 179.9 mg/dL, HDL-C 90.8 mg/dL, and TGs 131.29 mg/dL. The family history is consistent with FH. Her brother (H3) had a similar lipid profile and tendinous xanthomas (see online Table, available at <http://www.circresaha.org>). The proband (H2) had 2 sons and 1 daughter. Her oldest son (H1) died at 52 years of age of a myocardial infarction, and his lipid and clinical profiles were consistent with FH. Her second son (H3) and her daughter (H4) are also affected, according to their lipid profiles and the presence of tendinous xanthomas.

Forty members of the family were studied (all available subjects gave informed consent). Of these, 12 were diagnosed as affected according to the criteria outlined by Kwiterovich³⁰; 7 of these exhibited tendinous xanthomas. All affected individuals showed LDL-C levels above the 90th percentile of the Mexican population.³¹ As shown in Figure 1, the FH and HA phenotypes are consistent with an autosomal dominant pattern of transmission and independent segregation.

Besides the proband, 3 other individuals (H3, aged 84 years, H4, aged 57 years, and H1), aged 49 years exhibited elevated total cholesterol and LDL-C levels but no evidence of premature CHD. Individual H5 (proband's brother) died of natural causes at 75 years of age. Of 4 other first-degree relatives of the proband, one (H6) phenotype, another (H12) had the FH phenotype, and his son had both phenotypes, which would support the assumption that this individual also carried both traits. A closer examination of the lipid profiles of the entire family led us to the observation that several members of the family had high levels of serum HDL-C. These data are available in the online data supplement, which can be found at <http://www.circresaha.org>. The criteria for HA were defined as HDL-C >60 mg/dL because this level has been established in center population against CHD.¹³⁻¹⁵ This value corresponds to the 90th percentile (according to age and sex) in the Mexican population.³¹

Biochemical Determinations

Plasma lipid and blood chemistry were performed in 33 available individuals through fully automated tests with commercially available reagents. Serum cholesterol concentrations of total cholesterol and TGs were determined by enzymatic methods (Boehringer-Mannheim). The LDL-C and HDL-C particle distributions were characterized through density gradient ultracentrifugation as described.³² The double precipitation method was used to measure the HDL-C subclasses as described.³³ ApoA-I was measured by immunophotometry.³⁴ Sitosterol levels were determined by capillary-gas-liquid chromatography.³⁵

The diagnosis or status assignment for all family members was carefully established. Members with a single measurement of lipid

1 3
 TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

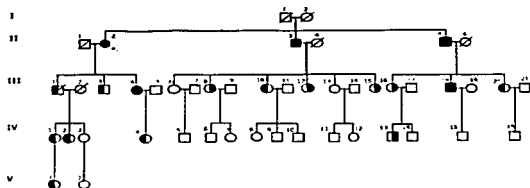


Figure 1. Family drawing of FH and HA kindred CGZ. Open symbols indicate unaffected individuals; half-filled left symbols, FH-affected individuals; half-filled right symbols, HA-affected individuals; and filled symbols, FH- and HA-affected individuals. Gray symbols represent unknown status.

levels or borderline lipid values were considered as "unknown" for linkage analysis.

Analysis of Candidate Genes

DNA was extracted from whole blood using a phenol-free extraction protocol adapted from Rutledge and Darlington.¹⁵ Analysis of microsatellite markers was performed by polymerase chain reaction amplification using end-labeled (32 P)dCTP primers. The role of different candidate genes in the expression of FH and HA was evaluated using genetic markers closely linked to these genes selected from various databases (Center for Medical Genetics, available at <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>, and Genome Database, available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Candidate genes analyzed were as follows: LDLR and apoB for FH and apoA1, apoA-II, apoC-III, apoA-IV, cluster, apoC-II, apoE, ATP-binding cassette A type I, peroxisome proliferator activated receptor- α , scavenger receptor class B type I, hepatocyte nuclear factor-4 α , cholesterol ester transfer protein, lecithin:cholesterol acyltransferase, hepatic lipase, lipoprotein lipase, and paraoxonase 1 for HA. In addition, apoB haplotyping was performed as described.¹⁶

Genomewide Scan

Thirty-four family members were genotyped with a set of 248 autosomal markers (average spacing of 15 to 20 cM). Most markers used were triallelic or tetraallelic repeats. Polymerase chain reaction products were analyzed on an ABI 377 sequencer through standard methods. Allele numbers were internally assigned and do not refer to allele numbers in public databases.

Linkage Analysis

A model assuming an autosomal dominant pattern of inheritance was used with a gene frequency of 0.001 and 80% penetrance. The maximum expected LOD score for this family was estimated through SIMULINK (LINKAGE software using 1000 replicates).¹⁷ Two-point LOD scores were calculated with the use of FASTLINK.¹⁸ Allele frequencies for all markers were calculated from unrelated individuals from the Mexican population. Parametric multipoint analysis was performed with the use of GENHUNT/REPLUS.¹⁹ To avoid any potential uncertainty in the exact mode of inheritance of HA, the data were analyzed with the model-free multipoint allele-sharing method implemented in this same program. Haplotypes were obtained with this same program and adjusted manually.

Results

Mapping of the FH Locus

We identified a kindred (CGZ) displaying all clinical characteristics of FH, including high total cholesterol and LDL-C, tendon xanthomatosis, arcus cornea, and premature CHD. We estimated the power of the family for linkage analysis through simulation. With the use of 1000 replicates, a

maximum expected Z_{max} of 5.9 was obtained (the average expected Z_{max} was 2.1, with 57% >3.00).

Through linkage analysis, both LDLR and the apoB genes were ruled out as the underlying cause of this condition. For the apoB gene, screening for the 2 most frequent mutations (R350Q and R353C) was also performed for the proband and an affected brother. The possibility of sitosterolemia was excluded by direct sitosterol measurement in the proband.

A genomewide scan (chromosomes 1 to 22) was performed with 238 markers. Positive pairwise LOD scores were obtained for adjacent markers on chromosome 1. The maximum pairwise LOD score obtained was 2.94 at $\theta=0.05$ for marker D1S197. Further analysis with a higher density of markers in this region showed positive LOD scores at $\theta=0.0$ for 2 additional markers closely linked to D1S197 (D1S386 and D1S1661) (Table 1). We also analyzed the data set under an "affecteds-only" model (Table 1). Multipoint analysis gave a maximum 1 LOD score of 3.29 between markers D1S2134 and D1S200 (Figure 2). Haplotype reconstruction showed that all 12 affected individuals for FH share a common haplotype encompassing markers D1S197 through D1S417. The centromeric boundary of this interval was defined by a recombination event between markers D1S417 and D1S200 in individual III4, and the telomeric boundary was defined by a recombination event between markers D1S197 and D1S2134 in individual III3 (Figure 3). This interval corresponds to a 0.75-cM region located 75.6 to 82.4 cM from pter. Five asymptomatic individuals and 2 with unknown affection status also share this same haplotype, implying incomplete penetrance.

TABLE 1. Pairwise LOD Scores for Chromosome 1p32 Markers and HF

Locus	Distance*	Whole Family		Affecteds Only			
		$H=0.00$	Z_{max}	$H=0.00$	Z_{max}		
D1S3721	72.59	-5.27	0.00	0.49	-1.56	0.21	0.26
D1S2134	75.66	-1.21	1.00	0.18	0.25	1.50	1.10
D1S197	76.27	-1.59	2.94	0.05	1.68	1.68	0.00
D1S386	77.18	0.80	1.18	0.10	2.41	2.41	0.00
D1S1661	78.25	1.82	1.82	0.00	1.60	1.60	0.00
D1S417	79.80	-1.41	0.14	0.30	1.90	1.90	0.00
D1S200	82.41	-2.99	0.60	0.22	-0.23	1.28	0.10
D1S2867	85.68	-7.91	0.12	0.30	-1.00	2.24	0.15

*Distance in Kosambi centimorgans (cM) from pter

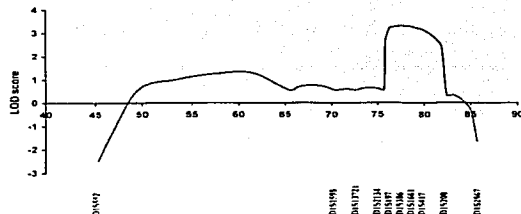


Figure 2. Multipoint LOD scores for chromosome 1p32 and HF. Markers are indicated below the x-axis.

Mapping of the HA Locus

On further clinical evaluation of the proband and other family members, we identified 10 individuals with elevated levels of HDL-C. Examination of the extended family led to the observation that HA segregated as an independent trait with an autosomal dominant pattern of inheritance and independent of FH (Figure 1). Thus, we tested the hypothesis that a locus associated with elevated HDL-C levels is present in this family.

Thirteen candidate genes were examined through linkage analysis to evaluate their possible contribution to the HA phenotype, including genes for several apolipoproteins, cholesteryl ester transfer protein, the scavenger receptor class B type I, and transcription factors, such as hepatocyte nuclear factor- α and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (see Materials and Methods). No evidence of linkage was found to any of the analyzed genes.

Genome-wide multipoint analysis showed a single statistically significant locus, with a maximum LOD score of 3.17 and a maximum nonparametric (NPL) score of 3.78 ($P=0.0009$) between markers D6S1280 and D6S1275. The maximum 2-point LOD score and NPL values in this region were 3.05 and 3.08 ($P=0.004$), respectively, for the marker D6S1662 (Figure 4 and Table 2).

All 10 individuals with HA shared a common haplotype encompassing markers D6S2410 and D6S1053 (Figure 5). The centromeric boundary of this interval is defined by a recombination event between markers D6S1053 and D6S1275 in individual II2, and the telomeric boundary is defined by a recombination event between markers D6S1280 and D6S2410 in individual III3, defining a 7.32-cM interval on chromosome 6p located 73.1 to 80.4 cM from pter. There are no obvious candidate genes that directly regulate HDL metabolism in this region.

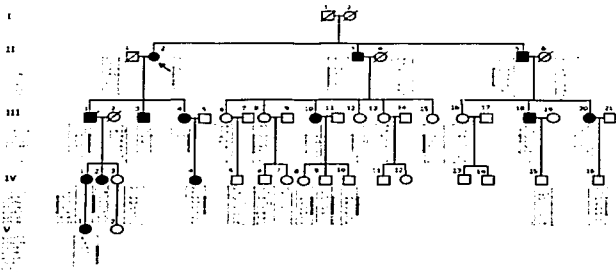


Figure 3. Suggested haplotypes of chromosome 1p32 linked to FH in the CGZ family. Open and filled symbols represent unaffected and affected individuals, respectively; gray symbols represent unknown status. The haplotypes in brackets were deduced. The common region shared in affected individuals in the family is indicated by gray bars.

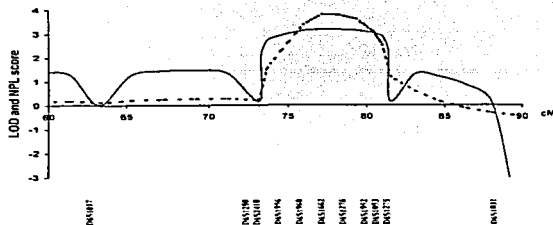


Figure 4. Multipoint linkage analysis of HA to markers on chromosome 6p12-13-q13. The x-axis represents the relative distance in centimorgans, and the y-axis represents the multipoint LOD (solid line) and NPL (broken line) scores from parametric and nonparametric linkage analyses, respectively. Markers are indicated below the x-axis.

However, there are two proinflammatory cytokine genes in this interval: interleukin-17 (IL-17) and interleukin-17F (IL-17F).^{40,41} Several proinflammatory cytokines have been implicated in the overall regulation of plasma HDL-C concentrations.⁴²⁻⁴⁴ Sequence analysis identified two polymorphisms in the promoter region of the IL-17 gene and one polymorphism (E126G) in exon 3 of IL-17F. None of these nucleotide changes cosegregates with elevated HDL levels in this family.

Discussion

Atherosclerosis is a multifactorial entity in which genetics and environmental factors play a role in the pathophysiology of the disease.⁴⁵ Mutations in genes associated with FH, as well as mutations in genes that lower HDL-C levels, such as ABC1, are known to cause accelerated atherosclerosis.^{7,46,47} On the other hand, factors such as cigarette smoking, arterial hypertension and dietary cholesterol consumption are associated with an increased risk of CHD.^{48,49}

Several epidemiological and genetic studies confirm the association between elevated HDL-C levels and protection against atherosclerosis.^{5,50-52} In the Framingham Heart Study, individuals with HDL-C concentrations of 1.5 mmol/L (60 mg/dL) or higher are protected against the development of

CHD even in the presence of elevated LDL-C serum levels.⁵³⁻⁵⁵ In a different study, an association was found between an increase of HDL-C >45% and a decreased frequency of atherosclerosis.⁵²

In addition, animal models have demonstrated the role of HDL-C as cardioprotective particles. For instance, hypercholesterolemic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits overexpressing the apoA-I protein showed a reduction in the formation of atherosclerotic plaques.⁵⁶ Furthermore, overexpression of human apoA-I in transgenic mice led to an increase in HDL-C levels >150 mg/dL and a 95% reduction of the atherosclerotic plaques in C57BL/6 mice on a high-fat diet.⁵⁷

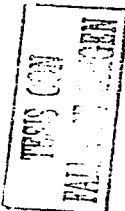
We identified an FH kindred in which elevated HDL-C levels (HA) are displayed as an independent trait within the family. Finding concurrent expression of FH and HA within a family is highly unusual because elevated LDL-C levels are generally inversely correlated with HDL-C levels.^{58,59} Therefore, this kindred provides a unique opportunity to dissect the genetic component underlying the HA trait in a background of atherogenesis.

A striking feature found in this family is that 2 affected individuals aged >80 years (proband II2, aged 94 years, and her brother II3, aged 84 years) do not display the expected

TABLE 2. Pairwise LOD Scores for Chromosome 6p Markers and HAL

Locus	Distance*	LOD Score at r								Z _{max}	P _{max}
		0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40			
D6S1280	73 13	-0.55	0.68	1.63	1.92	1.83	1.36	0.65	1.95	0.13	
D6S2410	73 13	1.53	1.52	1.45	1.32	0.97	0.54	0.14	1.53	0.00	
D6S1956	75 45	1.58	1.54	1.40	1.19	0.86	0.49	0.17	1.58	0.00	
D6S1960	76 62	1.50	1.78	2.15	2.21	1.92	1.34	0.60	2.21	0.10	
D6S1662	77 78	3.05	3.03	2.89	2.67	2.09	1.39	0.60	3.05	0.00	
D6S1276	78 85	2.20	2.21	2.16	2.02	1.60	1.05	0.43	2.21	0.01	
D6S1952	79 92	0.39	0.38	0.34	0.30	0.22	0.14	0.07	0.39	0.00	
D6S1053	80 45	1.92	1.88	1.71	1.50	1.06	0.61	0.21	1.92	0.00	
D6S1275	80 45	-1.86	-0.74	0.12	0.47	0.60	0.45	0.17	0.61	0.18	
D6S1031	88 63	-7.35	-3.11	-1.25	-0.43	0.14	0.23	0.12	0.23	0.30	

*Distance in Kosambi centimorgans (cM) from p1er



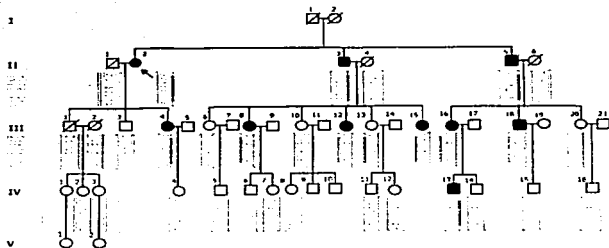


Figure 5. Suggested haplotypes of chromosome 6p12.13-q13 linked to HA in the CGZ family. Open and filled symbols represent unaffected and affected individuals, respectively; gray symbols represent unknown status. The haplotypes in brackets were deduced. The common region shared in affected individuals in the family is indicated by gray bars.

atherosclerotic manifestations associated with this condition in spite of their elevated total cholesterol and LDL-C levels and additional risk factors [hypertension, elevated Lp(a), or hypertriglyceridemia]. The absence of symptomatic CHD in these individuals is in stark contrast to the observed incidence of CHD in FH heterozygotes aged >60 years.¹⁷

The observed protection against premature CHD in these 2 individuals is correlated with a concurrent elevation of their HDL-C levels. Conversely, there are 2 documented affected FH individuals with premature CHD: (1) individual III-3, who does not have the HA trait or the haplotype associated with it and has presented with several ischemic episodes since 52 years of age, and (2) individual III-1, who died at 52 years of age as a result of myocardial infarction. Even though HDL-C levels were not available for the latter individual, he did not have the haplotype linked to HA (this haplotype was unequivocally inferred). Also, none of his 3 daughters has either elevated HDL-C levels or the chromosome 6 haplotype, which would support the assumption that his HDL-C levels were below what is regarded as protective. In light of these observations, we propose that in this family, the FH-C elevation explains the antiatherogenic effect seen in those FH individuals also carrying the HA trait.

Through a genome-wide scan, we mapped the FH trait to a region on chromosome 1p32, a region previously linked to FH in 2 separate studies.^{18,19} Based on recombination events in 2 affected individuals, our results localize the responsible gene to an interval of 6.75 cM flanked by markers D1S2134 and D1S200. The integration of the mapping data from all 3 studies yields a common interval of ~ 0.61 cM flanked by markers D1S2134 to D1S197. Some likely candidate genes in the vicinity of this region are EPRS18 (an epidermal growth factor receptor pathway substrate),²⁰ APOER2 (an apoE receptor),²¹ and SCP2 (a sterol carrier protein).²²

In the family we studied, this locus displays incomplete penetrance, because in addition to all 12 affected individuals sharing a common 4 marker haplotype, several other mem-

bers share the same region but appear to be asymptomatic. Of these, 5 are individuals with total cholesterol and LDL-C levels within the normal range, and 2 are individuals who showed either borderline lipid values according to age and sex or are individuals with unknown status (see Materials and Methods). The affected-only analysis showed 5 consecutive markers (D1S2134 through D1S417) with positive LOD scores (all at ≥ 0.01). A comparison of the results obtained under the 2 models used (whole family versus affecteds only) is consistent with the observed incomplete penetrance in this kindred. Although incomplete penetrance for this FH locus has been reported for both French and Spanish families,²³ the penetrance found in our kindred may be lower. This suggests the possible involvement of additional loci influencing the phenotype.

For the HA trait, a genome-wide scan identified a locus on chromosome 6p. Haplotype analysis defined a region spanning 7.32 cM between markers D6S1280 and D6S1275. This haplotype is shared by all individuals with HA and 1 individual with levels within the normal range, implying a penetrance of 90% in this family. Our region on chromosome 6p (7.13 to 80.45 cM from pter) overlaps the region reported by Knoblauch et al²⁴ influencing LDL levels in an FH Arab family and an independent sample of healthy white monozygotic and dizygotic twins from Germany. This same region has also been linked with TG HDL levels in a study in a population from Minnesota,²⁵ and it is close to a peak for TG levels (LOD score 1.24 at 71.3 cM) reported in African American families from the HyperGEN Study.²⁶ Therefore, it is possible that the locus mapped in chromosome 6p12.3-q13 in our family for high HDL levels may also influence lipid concentrations in other populations. The critical interval defined in our family has ~ 30 known genes, with interleukin-17 and interleukin-17F as the only candidate genes showing a possible biologically related function. Sequence analysis of these genes showed no evidence that they were responsible for the HA phenotype. We have not ana-

lyzed other positional candidate genes within this chromosomal region.

Although the 6p12.3-q13 locus has already been associated with the modulation of cholesterol, TG, and TG/HDL levels,²⁰⁻²³ it has not been previously linked to high HDL levels or to an antiatherogenic effect in humans. As to the extent of the observed protective effect conferred by this locus in the family we studied, it is noteworthy that there are independent cardiovascular risk factors besides FH in affected individuals with no manifestations of CHD. This suggests that the antiatherogenic effect conferred by this locus may also provide protection against atherogenesis-promoting conditions other than FH. In this regard, it would be of interest to determine the possible influence of this locus on lipid concentrations and its associated cardiovascular risk in Mexican population.

The identification of the responsible gene within the 6p12.3-q13 locus will provide new information regarding the role of the HDL-C particles as antiatherogenic agents and may result in the identification of new therapeutic targets for the prevention and treatment of atherosclerotic disease.

Acknowledgments

This work was supported by grants IN217898 and IN217501 from DILAPAs, Universidad Nacional Autónoma de México, and from Fundación Miguel Alemán, 2000. S. Canizales-Quintero was supported by a PhD fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. We are very grateful to the participating family for their kindness and enthusiastic collaboration in this study. We thank Rafael Torres for technical assistance in genetic identification. Southwestern Medical Center, Dallas, Tex. We also thank S. Romero for providing technical informatics assistance and S. Cuirel for access to a Workstation and informatics support during the early part of this project.

References

1. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AJ, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor scales. *Circulation*. 1998;97:183-91.
2. Goldstein JL, Hobbs HW, Brown MS. Familial hypercholesterolemia. In Scriver CR et al, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, NY: McGraw-Hill, 2000:2665-2693.
3. Kannel WB. Coronary heart disease risk factors in the elderly. *Am J Geriatr Cardiol*. 2002;13:101-107.
4. Davignon J, Cohen JC, Motlagh E, Barmett L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal models. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:139-143.
5. Kralj R, Emgeleuc S, Radojic J, Horvackovic M, Kermavanc J. Lipoproteins of homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. *Thrombosis*. *Haemostasis*. *Biol*. 2000;20:522-528.
6. Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem*. 1974;249:8183-8192.
7. Imarhiya H, Weisgraber KH, Arnold RC, Mahley RW, Krauss RS, Vega GL, Garavito RM, Santoro JC, Bittch D, Jendoux G, Kreppl M, Orsini P, Durkin C, Bozak C. Familial hypercholesterolemia and apolipoprotein B-100: simultaneous detection of the ARB3500>GLN and ARB3535>CYS mutations in a French population. *Hum Mutat*. 1997;10:160-163.
8. Varret M, Rabes JP, Naimi-Jore D, Genaro A, Mariani JC, Couvera J, Desviers H, Kreppl M, Crulon M, Thart R, Krutz M, Schmidt H, Buzzi JC, Kissner GM, Herdoin S, Pevsny M, Réva M, Lannier M, Marcegnie M, Jamin C, Bozak C. A single major locus for autosomal

9. dominant hypercholesterolemia maps to 1p34-1p32. *Am J Hum Genet*. 1999;64:1378-1387.
10. Hunt SC, Hopkins PM, Balka K, McDermott ML, Thorne JL, Wandell BH, Bowen BR, Ballinger DG, Skolnick MH, Samuels MF. Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia on a Utah kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1056-1060.
11. Miller GJ, Miller SE. Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet*. 1978;1:16-20.
12. Rankin AC, Miller SE. Pathophysiology of reverse cholesterol transport: insights from inhibited dieters of lipoprotein metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;9:285-297.
13. Glonek CF, Garavito P, Lalor RW, Stetko J, Strimer DM. Longevity syndromes: familial hyperlipidemia and familial hyperapalipoproteinemia. *J Lab Clin Med*. 1976;88:941-967.
14. Cheung ME, Brown GH, Wolf AC, Alferts B. Altered particle size distribution of apolipoprotein B-containing lipoproteins in subjects with coronary artery disease. *J Lipid Res*. 1994;35:381-394.
15. Mahaney SO, Havelogry I, Reinwater DJ, Camargo AC, VandeHeeg H, Wertz PL, MacLean DR, Herson J. A major locus influencing plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in the San Antonio Family Heart Study: segregation and linkage analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1740-1752.
16. Cupples LA, Myers RH. Segregation analysis for high density lipoprotein in the Berkeley data. *Genet Epidemiol*. 1993;10:629-634.
17. Wang N, Pagan H. Quantitative trait loci and candidate genes regulating HDL cholesterol: a murine chromosome map. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1390-1401.
18. Rader DJ, Dewaki K. Extravelling high density lipoprotein-apolipoprotein metabolism in human mutants and animal models. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:127-134.
19. Franceschini G, Calabrese L, Tassi C, Grandjean G, Sirtori CR, Nicolini S. Apolipoprotein AII Milano: disulfate-linked dimers increase high density lipoprotein stability and inhibit particle auto-oxidation in carrier plasma. *J Biol Chem*. 1990;265:12224-12231.
20. Gomonen JA. High density lipoproteins in human health and disease. *Adv Inorg Biochem*. 1997;29:116-129.
21. Ho YK, Brown MS, Goldstein JL. Hydrolysis and excretion of extraplastic cholesterols: esters by macrophages: stimulation by high density lipoprotein and other agents. *J Lipid Res*. 1990;31:391-401.
22. Hara H, and Yokoyama S. Interaction of free apolipoproteins with macrophages: formation of high density protein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J Biol Chem*. 1991;266:8465-8470.
23. Macchioni B, Mackintosh H, Harrison PS, Gayetani AM, Heineke J, Luss M, Nassy M, Nish D, Lennox G, Paravaccano A and coronary heart disease. *Eur Opin Lipidol*. 1999;10:319-324.
24. Curb JD, CW, De Garmo EJ, Santos MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1987-1994.
25. Valhalla BS, Zhu N, Cox RH, Haines JL, DeFaire JC, Lawrence S, Lu P, Maheshwari S, Anderson RG, Hobbs HW, Heitman BT, Blund PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-B1 activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*. 2001;7:883-887.
26. Kannel WB. Identification of high density lipoprotein familial hypercholesterolemia in children and adolescents. *Am J Cardiol*. 1991;67:36-37.
27. Aguilar-Salinas A, Olaso G, Valdes V, Torres JM, Perez JL, Ruiz JA, Rojas R, Franco A, Sepulveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res*. 2000;41:2298-2300.
28. National Cholesterol Education Program. Report of the expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. *Circulation*. 1998;108:360-390.
29. National Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA*. 1998;279:1675-1685.
30. Wolson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality: the Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis*. 1988;8:737-744.
31. Lussakov WJ, Shalh SN, Chakraborti H. Isolation of cholesterol-esterifying activity in rat serum by ultracentrifugal flotation. *Biochim Biophys Acta*. 1966;116:172-174.
32. Martin S, Haggard E, Harou E, Lee GJ, Fellin R, Hancock M, Cappelletti G. Evaluation of HDL2 and HDL3 cholesterol by a precipitation pro-

- cedure in a normal population and in different hyperlipidemic phenotypes. *Clin Chim Acta*. 1984; 137:291-298.
33. Anderson RJ, Steiner JC. A rate nephelometer for immunoprecipitation measurement of specific serum proteins. In: Krichevsky ED, *Automated Immunology*. New York, NY: Marcel Dekker; 1987:410-460.
 34. Beatty TH, Kwostrzsch PJ, Fei K, Houris M, White S, Bachofn PS, Smith HH, Teng B, Sanderson A. Genetic analysis of plasma vitronectin, apolipoprotein B, and lipoproteins in a large Amish pedigree with sitosterolemia. *Am J Hum Genet*. 1986; 38:902-914.
 35. Hume CD, Furlong CD. Amplification of DNA from biological specimens without extraction with phage DNA. *Am J Hum Genet*. 1985; 31:164-165.
 36. Huxson JL, Verrier DJ. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res*. 1990; 31:845-848.
 37. Oh J. *Analysis of Human Genes: Linkage, Recombination, and Mapping*. London, UK: The Johns Hopkins University Press; 1994.
 38. Cottingham RW, Jr, Idury RM, Schaffer AA. Fast sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet*. 1993; 53:252-263.
 39. King A, Cox NJ. Allele sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet*. 1990; 51:176-188.
 40. Yao G, Garner SE, Lindsay WC, Finch D, MacNeil HM, Springs MK, Armitage RG, Human H-1. A novel cytokine derived from T cells. *J Immunol*. 1995; 155:3433-3436.
 41. Starnes JL, Robertson MJ, Siedge G, Kersch S, Nakshatri H, Broxmeyer HJ, Thomas R. Cutting edge: H-1.1, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol*. 2001; 167:4135-4140.
 42. Khoyashanki W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammatory induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J Infect Dis*. 2000; 182:1691-1692.
 43. Hatada-Tajiri F, Moser AH, Fuller J, Felding C, Feingold K, Grunfeld C. Endothelin and cytokines decrease serum lipids and extra hepatic protein and mRNA levels of the heparin sulfate transfer protein in Syrian hamsters. *J Am Invest Assoc*. 1996; 258:285-292.
 44. Khoyashanki W, Moser AH, Shigenaga K, Grunfeld C, Feingold KR. Regulation of scavenger receptor class B type I in hamster liver and HepM2 cells by endotoxin and cytokines. *J Lipid Res*. 2001; 42:1636-1644.
 45. Lysis M. *Microbiology*. *Nature*. 2000; 407:233-241.
 46. Brooks-Wilson A, Marcil A, Côté S, Pang H, Benoit K, van Dam M, Yu J, Brewer C, Collins A, Molloy G, Couture P, Chetani E, Durrer K, Ashburner E, Sefton D, Samson C, Scherer S, Smith S, Denis M, Mattenias D, Roberts J, Morgan K, Koop B, Penston S, Bastien J, Hayden MR, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiencies. *Nature Genet*. 1999; 22:335-343.
 47. Feingold KR, Koozekan D, Langstam T, Borstler A, Diederich W, Drexler W, Barak O, Buchler T, Porsch-Oeckmann M, Kaminski WJ, Blumhagen HW, Oette K, Roth G, Aisland C, Lakner KJ, Schmitz J. The gene encoding ABC-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*. 1999; 22:347-351.
 48. Willett WC, Green A, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA, Rosner B, Mittleman BB, Sacks S, Hennekens CH. Relative and absolute excess risks of coronary heart disease in heavy smokers who smoke cigarettes. *N Engl J Med*. 1987; 317:1033-1039.
 49. Bernard S, de Lencastre M. Dietary lipids and their relation to ischemic heart disease: from epidemiology to prevention. *J Intern Med Suppl*. 1990; 225:14-20.
 50. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med*. 1977; 62:703-716.
 51. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*. 1999; 32:1311-1316.
 52. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience): Prospective Cardiovascular Munster study. *Am J Cardiol*. 1992; 70:733-737.
 53. Jansen R, Calland JM, Hommes N, Esveter C, Viss I, Houdebeek JC, Fruchart P, Deneffe P, Dussanck N. Overexpression of human apolipoprotein A-I inhibits atherosclerosis development in Watanabe rabbits. *Circulation*. 1996; 94(suppl 1):6-12. Abstract.
 54. Rubin EM, Krauss RS, Spangler J, Vessella H Jr, Côté SM. Inhibition of early atherosclerosis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature*. 1991; 353:268-270.
 55. Schmidt HH, Geggel RL, Torpe C, Christrup I, Zevaloff A, Besser HH Jr, Manns MP, Hatanaka D. In regulated synthesis of both apolipoprotein A-I and apolipoprotein B in familial hypertriglyceridemia and hyperlipoproteinemia. *Metabolism*. 1998; 47:1460-1466.
 56. Tremars R, Chagnacran K, Magueyev V, Marchioni B, Beutler P, Bard JM, Magot E, Kempf M. Apolipoprotein A-I kinetics in heterozygous familial hypercholesterolemia: a stable isotope study. *J Lipid Res*. 1999; 40:1806-1811.
 57. Eden ER, Naumova RP, Hurden B, McCarthy ML, Soutar AB. Use of homozygosity mapping to identify a region on chromosome 11 bearing a defective gene that causes autosomal recessive homozygous hypercholesterolemia in two unrelated families. *Am J Hum Genet*. 2001; 268:653-660.
 58. Wong WJ, Kraus MH, Collomagnesi F, Zelano A, Duck D, Croce CM, Huxford K, De Fosse PJ. The human apoB1 gene, encoding a serine kinase substrate, is conserved in evolution and maps to 1p31-p32. *Cytogenet*. 1994; 9:1597-1597.
 59. Kim DE, Maguire K, Inoue T, Mao C, Kim HJ, Suzuki H, Iwata T, Endo Y, Sasaki S, Yamamoto H. Exon-intron organization, chromosome localization, alternative splicing, and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene. *J Biol Chem*. 1995; 270:8508-8514.
 60. Ghosh J, Bender H, Picot D, Srinivasan SR, Anand SS, Heil EA, Hillemeier JJ, Sitanski JI III. The structure of the human apoE3 carrier protein A. Stereo carrier protein 2 gene (APE2). *Genomics*. 1994; 24:370-374.
 61. Ghosh J, Bender H, Muller-Sonnen J, Hoshino S, Ito N, Li J, Haining S, Bacon H, Heath S, Chalmers R, Fiallilar H, Hoshino S, Asydn A, Reshel A, Rosenblatt M, Elias D, Muhl A, Lowe A, Schmitt D, Harats D, Jenike J, Friedlander S, Schuster H, Roth FC, Esterhuysen J. A cholesterol-lowering gene maps to chromosome 14q. *Am J Hum Genet*. 2000; 66:157-160.
 62. Kim KE, Karala SI, Ferrell RF, Turner ST, Horowitz E, Sing C. Genetic and clinical analysis of familial hypertriglyceridemia that influence variation in plasma lipid and apolipoprotein levels associated with risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis Thromb Vasc Biol*. 2000; 21:971-978.
 63. Castejon H, Lopez JM, Lekuibel H, Oberman A, Myers RH, Prasad JM, Province MA, Hopkins PN, Heiss G. Genome-wide linkage analysis of lipids in the Hypertension Genetic Epidemiology Network (HGENEP) Hispanic Pressure Study. *Atherosclerosis Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1969-1976.