

11282



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL RECEPTOR DE
LDL Y APOLIPROTEINA B100 EN SUJETOS CON
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR EN POBLACION
MEXICANA.**

Tesis para obtener el grado de Doctor

PRESENTA

Ma^o Ludivina Robles Osorio

TUTOR: Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas

COTUTOR: Dra Teresa Tusié Luna

COTUTOR: Dr. Juan A. Rull Rodrigo

Noviembre 2004

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE DE CONTENIDO

1.- INTRODUCCIÓN.....	pág 4
1.1 Definición	
1.2 Antecedentes	
1.3 Epidemiología	
1.4 Cuadro clínico y características bioquímicas	
1.5 Fisiología del receptor de LDL	
1.6 Gen del receptor de LDL y estructura proteica	
1.7 Tipos de mutaciones para el receptor de LDL	
1.7.1 Polimorfismos en el RLDL	
1.8 Fisiología de la apolipoproteína B100	
1.9 Gen de la apolipoproteína B100	
1.10 Tipos de mutaciones para apolipoproteína B100	
1.11 Epidemiología molecular	
1.12 Diagnóstico y diagnóstico diferencial	
1.13 Tratamiento	
2.- JUSTIFICACIÓN.....	pág 20
3.- HIPÓTESIS.....	pág 21
4.- OBJETIVOS.....	pág 22
5.- MATERIAL Y METODOS.....	pág 23
5.1 Diseño del estudio	
5.2 Pacientes	
5.3 Captura de datos	
5.4 Toma de muestras y pruebas de laboratorio	
5.5 Tamaño de la muestra	
5.6 Análisis Estadístico	
5.7 Implicaciones éticas	
6.- RESULTADOS	pág 30
7.- DISCUSIÓN.....	pág 35
8.- CONCLUSIONES.....	pág 39
9.- BIBLIOGRAFÍA.....	pág 40
10.- ANEXOS	pág 47
11.- TABLAS Y FIGURAS	pág 55

DEDICADA A

*Ernesto mi esposo por el apoyo incondicional que he recibido de su parte
en todo momento.*

*A mis padres por su confianza y apoyo en cada uno de los pasos importantes
que he dado en mi vida.*

1.- INTRODUCCION

1.1 Definición

La hipercolesterolemia familiar (HF) es una enfermedad hereditaria que se presenta con un patrón autosómico dominante. El defecto básico de esta patología es la alteración de la captación y/o endocitosis de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), causada por mutaciones en el receptor de lipoproteínas de baja densidad (RLDL) (OMIM 143890) o en su ligando, la apolipoproteína B100 (apoB100) (OMIM 144010). Como consecuencia de esta anomalía, existe una elevación de los niveles séricos de las LDL por lo que las manifestaciones clínicas son debidas a su acúmulo en diferentes tejidos como tendones (xantomas) y pared arterial (aterosclerosis) (1).

1.2 Antecedentes

La HF fue la primera entidad genética relacionada con enfermedad coronaria e infarto del miocardio cuando en 1930, Muller y Thannhauser reconocieron el patrón familiar en casos de pacientes con xantomas, enfermedad coronaria prematura e hipercolesterolemia. Sin embargo, ya desde finales del siglo XIX se conocía la asociación entre xantomas tendinosos y aterosclerosis (2).

En los años 1940s y 1950s Wilkinson, Adlerberg y otros investigadores sugirieron la posibilidad de su origen genético, así mismo, Gofman demostró que la HF era ocasionada por elevación en los niveles de LDL (3).

En 1960 Khachadurian definió las diferencias entre pacientes homocigotos y heterocigotos, además aportó la primera evidencia de herencia por un gen único en esta enfermedad; poco tiempo después, Levy y Lees describieron el problema en el metabolismo de las apolipoproteínas y LDL (4).

La mayor contribución al conocimiento de esta enfermedad ha sido por parte de Michael S. Brown y Joseph L. Goldstein, quienes en 1970 descubrieron el receptor de superficie para LDL y que la HF era causada por una mutación en el gen correspondiente al receptor antes mencionado (5, 6). En 1982 purificaron la proteína del receptor, en 1983 clonaron el DNA y en 1985 aislaron y caracterizaron el gen (7,8,9,10,11). Por su contribución al conocimiento en el metabolismo de lípidos les otorgaron el Premio Nobel de fisiología en 1985.

1.3 Epidemiología

La HF es una de las dislipidemias de origen genético más comunes, así como una de las dislipidemias asociadas con mayor mortalidad cardiovascular.

La prevalencia de HF en la mayoría de las poblaciones en las que no ha habido aislamiento genético es de 1/500 habitantes para los heterocigotos y para los homocigotos 1/1,000,000. Se encuentra comunmente consanguinidad en los padres de sujetos homocigotos.

En Estados Unidos de América y en los países de Europa Occidental el 5-10% de los infartos en pacientes menores de 60 años ocurren en individuos heterocigotos para HF. En los pacientes homocigotos, debido a elevación de colesterol de 2 a 3 veces más que los heterocigotos, los infartos generalmente se presentan durante las 2 primeras décadas de la vida (12,13).

En nuestro país no existen datos epidemiológicos relacionados con la incidencia de enfermedad coronaria en esta población.

Existen algunas poblaciones con aislamiento genético (debido a endogamia) donde la prevalencia de HF es más elevada como es el caso de los judíos Ashkenazi cuya prevalencia es la más alta en el mundo con 1/67 para heterocigotos (16), la provincia de Québec en la que la población franco-canadiense tiene una prevalencia de 1/270 para heterocigotos (14); y los Libaneses cristianos en quienes es de 1/171 y 1/10,000 para heterocigotos y homocigotos respectivamente (15).

Por otro lado, en individuos caucásicos de Estados Unidos y Europa se estima una frecuencia de 1:500 a 1:700 para heterocigotos de mutaciones en apoB100 (FDB). En un estudio realizado en la clínica de lípidos de la ciudad de Glasgow, Escocia, para el tratamiento de dislipidemias cuyos pacientes son en su mayoría de raza caucásica, la prevalencia reportada es de 0.6% (17).

Casi todos los individuos con la mutación más frecuente (CGG a CAG en el codon 3,500, que sustituye glutamina por arginina) tienen un haplotipo raro en el locus de apoB100 lo cual sugiere que provienen de un mismo ancestro que vivió en Europa Central hace aproximadamente 6,750 años (18).

1.4 Cuadro clínico y características bioquímicas

En la HF existe desde el nacimiento una elevación persistente de LDL sérica lo que ocasiona la formación de depósitos de colesterol en forma de xantomas, arco corneal y placas aterosclerosas que se encuentran en la mitad de los pacientes heterocigotos en la tercera década de la vida (19).

En los homocigotos, comúnmente se encuentran antecedentes de consanguinidad, los xantomas se pueden presentar desde el nacimiento, aunque se encuentran en la mayoría a los 4 años y la muerte por infarto ocurre generalmente antes de los 30 años. Los niveles de colesterol total en heterocigotos son en promedio de 350 mg/dl, aunque pueden encontrarse niveles limítrofes en relación a los rangos de referencia; en los homocigotos se encuentran niveles de 600 a 1,200 mg/dl (1, 20). En relación a los triglicéridos en heterocigotos se encuentran discretamente elevados y un tercio de ellos presentan elevación por acúmulo de remanentes; en homocigotos los niveles de triglicéridos pueden fluctuar entre 250 mg/dl o más, debido a que el receptor de LDL tiene la función de remover los remanentes de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y densidad intermedia (IDL).

La cantidad de receptores funcionales es inversamente proporcional a los niveles de LDL y por tanto se encuentra relacionada con la gravedad de las manifestaciones clínicas. Los pacientes en los que se encuentra una mutación, pueden ser clasificados en 2 grupos principales de acuerdo a la cantidad de

actividad del receptor medida en los fibroblastos de piel de los pacientes: si la actividad del receptor es menor al 2% de la actividad normal, se denomina *Receptor Negativo* y si está entre 2-25% de los normal es dominado *Receptor Defectuoso* (21). Al comparar ambos grupos, los niveles de colesterol total y LDL se encontraron más elevados en el grupo de receptor negativo después de corregir para edad, sexo e índice de masa corporal. En el grupo de pacientes con Receptor Negativo la prevalencia de xantomas tendinosos y de arco corneal es 6 y 3 veces mayor respectivamente comparado con el grupo de pacientes con Receptor Defectuoso, la prevalencia de enfermedad coronaria es también mayor en este grupo (25 vs 12%).

1.5 Fisiología del receptor de LDL

El proceso que sigue el receptor LDL desde su síntesis hasta la formación de vesículas en la membrana celular para la internalización de la LDL (figura 1 y 2), se describe a continuación:

a) *síntesis en el retículo endoplásmico rugoso (RE)* como un precursor con alto contenido de carbohidratos ricos en manosa;

b) en el *aparato de Golgi (AG)* se le agrega una molécula de galactosa y uno o dos residuos de ácido siálico;

c) Los receptores de LDL *aparecen en la superficie celular* en donde forman vesículas;

d) se lleva a cabo la *unión del complejo LDL-apo B100 o remanentes-apo E*;

e) *internalización en forma de endosomas* a un pH 6.5;

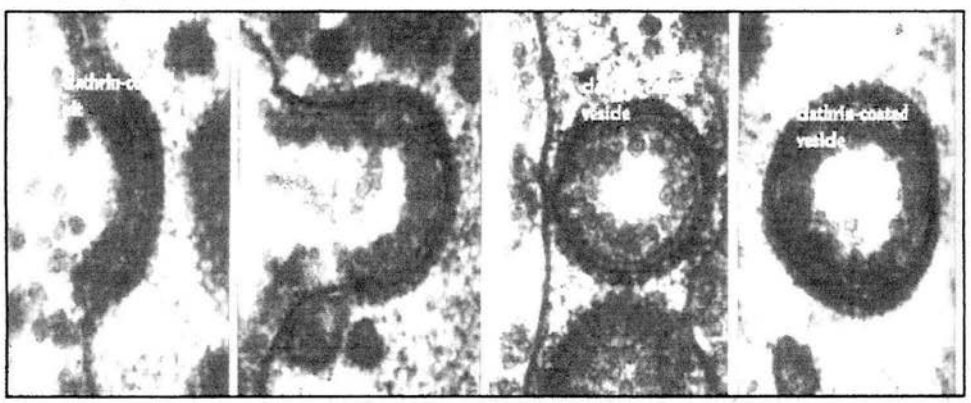
f) *disociación ácido-dependiente de la LDL y su receptor*, evento que es esencial en el reciclaje del receptor el cual es posteriormente liberado a un lisosoma al fusionarse las membranas de ambos organelos (endosoma y lisosoma);

g) la *LDL es degradada por las enzimas hidrolíticas*, la apoB100 es hidrolizada por proteasas a aminoácidos y los ésteres de colesterol son hidrolizados por la lipasa lisosomal. El colesterol desesterificado cruza la membrana lisosomal y entra al compartimento celular en donde es utilizado para la síntesis de membrana y como regulador de la homeostasis intracelular del colesterol.

Figura 1: Ciclo del receptor del LDL, para más detalles referirse al texto.



Figura 2: Microfotografías electrónicas de la endocitosis de lipoproteínas, A) Primera imagen, hendidura cubierta de clatrina y partículas de LDL que empiezan a unirse en su superficie; B) segunda imagen, prolongación de la hendidura; C y D) tercera y cuarta imágenes, invaginación y formación de vesículas cubiertas de clatrina. Tomado de J. Cell Sci, 1972, 39:257-272.



1.6 Gen del receptor de LDL y estructura proteica

El gen del receptor de LDL se encuentra en el cromosoma 19 (p13.1-p13.3) contiene 45 kb (kilo bases), 18 exones y se transcribe en un RNAm de 5.3 kb de longitud (5175 bp de mRNA lineal), el cual a su vez se traduce en una proteína de 860 aminoácidos (NCBI: NP 000518), incluyendo el péptido señal de 21 aminoácidos, de tal forma que la proteína madura está compuesta de 839 aminoácidos; sin embargo cerca de la mitad del mRNA (2.8 kb) constituye una larga región 3' no traducible (3'UTR) que contiene varias copias de secuencias repetidas de la familia Alu (Figura 3).

El exón 1 codifica la región 5' que comprende el péptido señal de 21 aminoácidos, que es escindida en el RE.

Los exones 2 a 6 codifican el dominio del ligando de unión, comprende 292 aminoácidos y tiene 7 repeticiones de 40 aminoácidos cada uno. Cada repetición contiene 6 residuos de cisteína; la parte carboxiterminal de cada repetición está compuesta por aminoácidos cargados negativamente, los dos ligandos del receptor es decir apo B y apo E tienen secuencias completamente diferentes, sin embargo contienen segmentos cortos ricos en aminoácidos básicos y se unen al receptor cargado negativamente, cuando existen mutaciones que alteran alguna de estas repeticiones, el plegamiento de la proteína y por tanto la función de ligando, se ven afectados (22).

Cada una de las repeticiones ricas en cisteína está codificada por un exón a excepción de las repeticiones 3, 4 y 5 que son codificadas por el exón 4. La delección de la repetición 1 no tiene efecto en la unión de LDL o VLDL, sin embargo la delección de cualquier otra repetición daña la unión de LDL en más del 95%, no así la unión de VLDL, un defecto en la repetición 5 reduce en 50% la unión de esta última.

Los exones 7 a 14 codifican una secuencia de 400 aminoácidos que incluyen 3 repeticiones idénticas al factor de crecimiento epidérmico. Es requerida para la disociación del complejo lipoproteína-receptor del endosoma en el reciclaje del receptor; sirve también para colocar el dominio de unión del ligando de tal manera que pueda unir la LDL a la superficie celular.

El exón 15 codifica 58 aminoácidos ricos en residuos de serina y treonina.

El exón 16 y la terminación 5' del exón 17 codifican 22 aminoácidos hidrofóbicos que comprenden el dominio que ancla la proteína a la membrana celular.

Los exones 17 y la terminal 5' del exón 18 codifican 50 aminoácidos que hacen el dominio citoplásmico y son necesarios para localizar el receptor en las vesículas y para distinguir al receptor de la superficie sinusoidal de los hepatocitos polarizados, el resto del exón 18 es una región del RNA no traducible. Ver figura 3

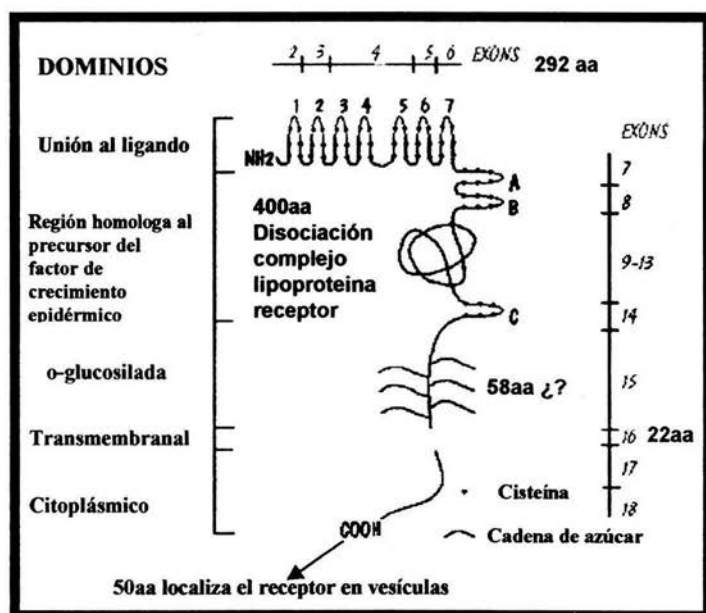


Figura 3: Representa cada uno de los dominios del RLDL, su función y exones que codifican cada uno de ellos. El exón 1, codifica 21 aa de la secuencia señal que se escinde al pasar al RE, quedando una proteína de 839 aa.

1.7 Tipos de mutaciones en el gen del receptor de LDL

De acuerdo a los reportes recientes, hasta la fecha se han descrito más de 900 mutaciones. La información se encuentra disponible en el sitio web de la UMD-LDLR (Universal Mutation Database of LDLR) www.umd.necker.fr y en www.ucl.ac.uk/fh (23, 24). De acuerdo al último reporte del UMD-LDLR la mayoría de las mutaciones son puntuales y se distribuyen de la siguiente forma:

TIPO DE MUTACION	NUMERO REPORTADO
Mutaciones puntuales (en cDNA)	841
Sustituciones	610
Delecciones menores	121
Inserciones menores o duplicaciones	53
Sustituciones intrónicas (en DNA genómico)	57
(Afectan la secuencia consenso del empalme)	(37)
Distribución de las mutaciones en la proteína	
Cambio de aminoácido	507
Codón de paro prematuro	242
Inserciones o delecciones de aminoácidos	35
Rearreglos mayores	91
Cambios en el promotor	7

Hasta el momento, las mutaciones reportadas en HF suman más de 900 (25, 26), sin embargo existen poblaciones en las que la mayoría de los casos de HF pueden ser explicados por una o pocas mutaciones sobretodo aquellas poblaciones que han tenido un aislamiento geográfico o cultural, en las que se ve un efecto de gen fundador.

La clasificación de las mutaciones del receptor LDL es la siguiente (1, 27):

- Clase 1:** Es una falla completa para producir receptor inmunoprecipitable (alelos nulos), por cualquiera de los métodos inmunológicos.
- Clase 2:** Es la mutación más común, el defecto estriba en el transporte del receptor entre el RE y el sitio en donde se efectúa la glucosilación en el aparato de Golgi. Existen 2 subtipos: el primero denominado **2A** se produce una proteína que falla para ser transportada fuera del RE de tal forma que no se encuentra la forma madura del receptor detectable en la superficie. El segundo tipo es **2B** en el que una cantidad variable del receptor maduro es expresada en la superficie, es decir la expresión del receptor se encuentra parcialmente bloqueada.

Falta página

N° 11

mutación que causa un cambio de arginina a triptófano en el codón 3500 pueden interactuar débilmente con el triptófano 4369, lo cual explica las manifestaciones menos severas de la enfermedad en este caso, mientras la interacción está completamente abolida con el cambio a glutamina (29), ver figura 4.

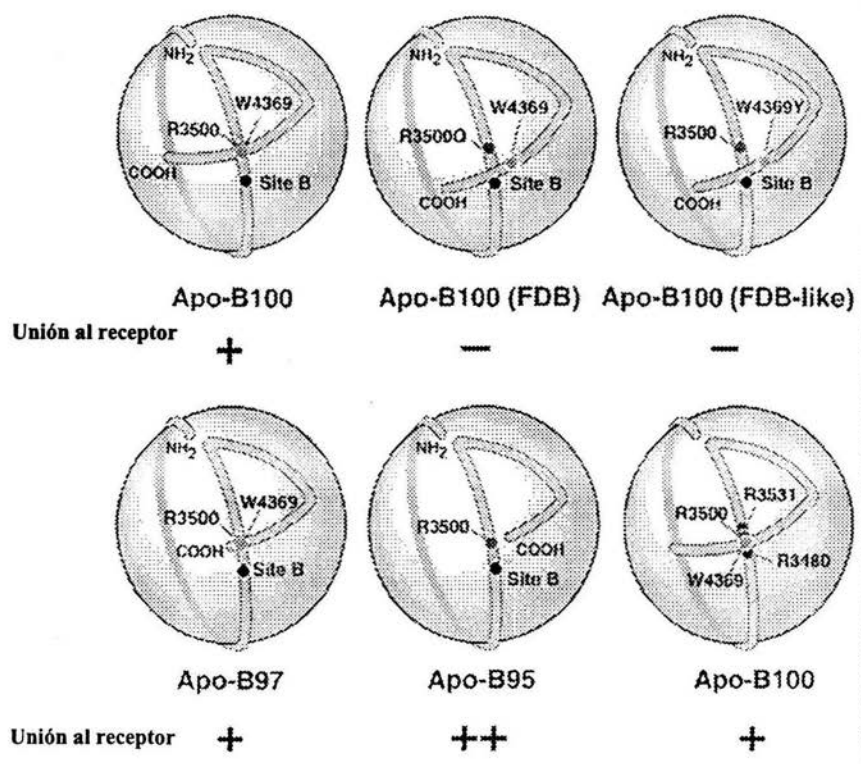


Figura 4: Modelo del sitio de unión de la apoB100 al receptor de LDL: La unión normal de la apoB100 al receptor depende de la interacción entre la arginina 3500 y el triptófano 4369 (R3500-W4369). Una mutación de la arginina es la causa del defecto denominado apoB defectuosa, también una mutación en el triptófano produce el mismo efecto que la mutación en arginina, en ambos casos la unión al receptor está disminuida importantemente. La interacción de R3500-W4369 es esencial para el plegado correcto de la región carboxi terminal de la apoB100 con el fin de permitir una interacción normal entre la LDL y su receptor, esta interacción cambia si se remueve el extremo carboxi-terminal. Cuando la LDL tiene apoB97 (truncada en el residuo 4397) presenta una unión normal al receptor, mientras que si la LDL tiene apoB95 (truncada en el residuo 4330) presenta una unión aumentada al receptor. El triptófano 4369 interactúa no sólo con la arginina 3500, sino también con la arginina 3480 y 3531. El sitio B (residuos 3359-3369) es el sitio de unión al receptor.

Tomado de: Borén J, Ekström U, Ågren B, Nilsson-Ehle P, and Innerarity TL. The Molecular Mechanism for the Genetic Disorder Familial Defective Apolipoprotein B100. *Jour Biol Chem*; 276, 2001: 9214-9218 (29).

1.9 Gen de la apolipoproteína B100

El locus para el gen de apo B100 se encuentra en el cromosoma 2p24-p23 y consta de 29 exones y 30 intrones, que contienen 43 kb (kilo bases). En el exón 26 se han localizado las tres mutaciones hasta el momento descritas.

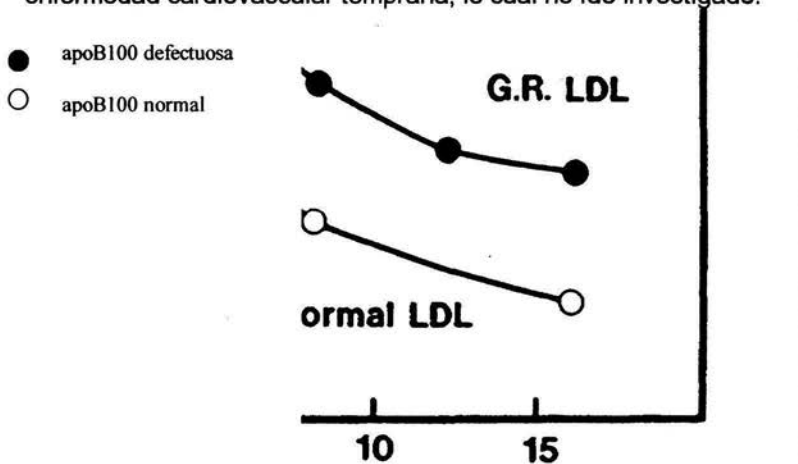
1.10 Tipos de mutaciones para apo B100

La primera y más frecuente de las mutaciones es la sustitución de arginina por glutamina en la posición 3500 (Arg3500Gln), que consiste en una *sustitución de adenina por guanina en la posición 10,699 del DNA complementario*. Estudios de captación de la LDL de pacientes que tienen este defecto en la proteína han mostrado una reducción en la unión al receptor (figura 5); la segunda es un cambio de arginina por triptófano en la misma posición (Arg3500Trp) existe una *sustitución de timina por citosina en la posición 10,698*, ha sido descrita en una familia de origen europeo, dos casos más en una cohorte de pacientes de Asia Oriental, en Glasgow, Escocia un individuo de raza oriental y en 9 individuos no relacionados en Taiwan (28); la tercera mutación es un cambio de arginina por cisteína en la posición 3531 (Arg3531Cys) debida a una *sustitución de timina por citosina en la posición 10,791* (30, 31, 32, 33, 34), esta última mutación ha sido identificada en pocos individuos (dos familias de diferente origen étnico, cuatro pacientes con cardiopatía isquémica en Estados Unidos de Norteamérica, todos de origen caucásico, 2 familias del Reino Unido y dos pacientes franceses). Estas mutaciones producen un cambio en la conformación de apo B100. El grado de elevación de colesterol LDL es menor en la mutación Arg3531Cys.

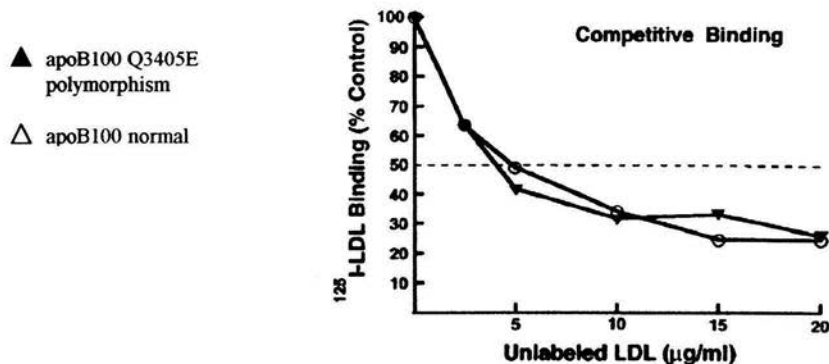
También ha sido reportado un cambio de Glu3405Gln (cambio C>G en la posición 10422) que se caracteriza por discretas elevaciones de colesterol LDL, sin embargo al estudiar una población de 2,316 individuos se encontró una frecuencia de 0.9%; además en este estudio al hacer un ensayo competitivo de captación de LDL con isótopos, en los individuos que presentaban el cambio E3405Q, la afinidad de unión fue de 97.9% comparado con los sujetos sin el cambio, por otro lado en un sujeto homocigoto para el cambio no se encontró diferencia en relación a los controles ver gráficas 1 y 2 (28, 35).

En un estudio realizado en una cohorte grande (18) se encontró otra mutación en el exón 26 (posición 10757) del RNA mensajero, codon 3,516 cuyo cambio es de AAC que codifica para asparagina a AAG que codifica para lisina, sin embargo sólo el caso índice fue encontrado con cardiopatía isquémica; llámola atención que el perfil de lípidos estaba dentro de rangos normales. Los restantes 6 miembros de la familia que tenían la mutación, también tenían perfil normal sin cardiopatía isquémica a excepción de un hermano del caso índice, quien tenía una hipercolesterolemia leve a moderada, sin manifestaciones clínicas de aterosclerosis; la búsqueda se hizo en una cohorte de 2757 individuos, sin encontrar otro caso y hasta el momento no existe algún otro reporte. Debido a que de los 7 individuos afectados sólo uno que no era el caso índice tenía

hipercolesterolemia moderada, el resto de los afectados el perfil de lípidos fue normal y a la falta de más casos entre individuos pertenecientes a cohortes de pacientes en clínicas de dislipidemias, queda aún la interrogante de cual es el efecto real de esta mutación ya que la familia encontrada no tiene las características fenotípicas y bioquímicas de los casos de apoB100 defectuosa y existe la posibilidad de que el caso índice tuviera algún otro factor causal de enfermedad cardiovascular temprana, lo cual no fue investigado.



Gráfica 1: Capacidad de unión de la LDL a su receptor en fibroblastos, de un paciente con apoB100 defectuosa debida a la mutación Arg3500Gln comparada contra LDL marcada con 125 de un paciente sin dislipidemia, la diferencia es de 20%. (Tomada de Innearity 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 1987; 84: 1919-1922) (36).



Gráfica 2: Capacidad de unión de la LDL a su receptor en fibroblastos de un paciente con la mutación Glu3405Gln (de forma homocigota) comparada contra LDL marcada con 125 de un paciente sin dislipidemia, no existe diferencia entre el paciente con el cambio de aminoácido y el normal, por lo que la sustitución en esa posición es considerado un polimorfismo ya que no

afecta la función del ligando. (Tomada de referencia: Pullinger CR, et al. The apolipoprotein B Q3405E polymorphism has no effect on its low-density-lipoprotein receptor binding affinity. *Hum Genet*, 1996; 98: 678-680) (35).

1.11 Epidemiología molecular

La mayoría de las diferentes mutaciones reportadas hasta el momento (más de 900) (26, 23, 24) del gen del receptor de LDL, tienen poca recurrencia en otras poblaciones, es decir se encuentran en pocos casos y de ahí la gran cantidad de mutaciones encontradas, sin embargo en las poblaciones con alta prevalencia de la enfermedad, la mayoría de los casos de HF pueden ser explicados por 5 o menos mutaciones, como es el caso de los franco-canadienses de Québec, los libaneses cristianos, los Judíos Ashkenazi, Escocia, Holanda Noruega y Finlandia (14, 16, 25, 37, 38). La característica común en estos grupos es cierto aislamiento genético o geográfico de una población relacionada, además existe un rápido crecimiento de la descendencia en un cierto período de tiempo (25), lo cual lleva al efecto del gen fundador. Recientemente otro reporte de las mutaciones en casos de hipercolesterolemia heredada de forma autosómica dominante en Grecia, encontraron 17 mutaciones distintas, 5 de ellas explican un 30% de los casos, tomando en cuenta que se encontró mutación en un 57% del total (21).

Como se ha visto en los diferentes países mencionados, el hecho de conocer la frecuencia de las mutaciones y si existen algunas más prevalentes, facilita el proceso diagnóstico subsecuente en los casos nuevos, con un abordaje dirigido hacia la búsqueda de las mutaciones que explican la mayoría de los casos.

Por otro lado en las series publicadas relacionadas con el espectro de mutaciones que explican la enfermedad en diferentes países, aproximadamente del 40 al 60% de los casos no se encuentra mutación, lo que hace postular que el defecto puede radicar en otro u otros genes implicados en el metabolismo de la LDL y que este defecto se manifiesta como HF (30, 39, 40, 21), dichos pacientes parecen tener niveles de colesterol significativamente más bajos en relación al grupo en el que si se encuentra una mutación (41). Esto refleja una posible heterogeneidad genética de la enfermedad sugerida por reportes de nuevos loci (19, 42, 43).

Así en 1999 Varret et al, (44) informaron de un estudio realizado en una familia francesa en la que previamente se había excluido la presencia de mutaciones en los genes del RLDL y ApoB100 por métodos convencionales y por ligamiento con marcadores autosómicos de la misma región, el sitio identificado fue en el cromosoma 1p34.2 -p32, con lo que propusieron la existencia de un tercer gen como causal de hipercolesterolemia familiar. Esta observación fue confirmada por una prueba funcional en fibroblastos del caso índice que mostró unión, internalización y degradación de las partículas de LDL de forma normal, así como la exclusión de otras causas de dislipidemia, se incluyeron después 12 familias más de diferentes nacionalidades, con características semejantes a la primera y con estudio de la función del RLDL en fibroblastos normales, de ellas 3 familias más se encontraron con ligamiento a esta región, por lo que se propuso la posibilidad de un nuevo gen implicado en la síntesis de una proteína importante en el metabolismo de

colesterol. En el 2000 Hunt et al, (18) reportaron otra familia de Utah en la que se encontró ligamiento para la región del cromosoma 1p32. Canizales-Quinteros et al. (43) reportaron una familia mexicana en la que se descartó la existencia de mutaciones en el RLDL y ApoB100, incluso con ligamiento a través de marcadores autosómicos y se encontró también ligada al locus 1p32.

Estos resultados en diferentes laboratorio indicaban que aparentemente pudiera estar relacionado con un tercer gen implicado en la etiología de la HF.

Subsecuentemente en la familia francesa reportada por Varret, et al. encontraron 1 mutación en el gen PSCK9, que codifica NARC-1 (Neural apoptosis regulated convertase), una enzima recientemente identificada, que se encuentra abundantemente en hígado y contribuye a la homeostasis de colesterol (45), al analizar otras familias de la cohorte en las que no se había encontrado previamente mutación, tanto en el RLDL como apoB100, otra familia más se le encontró mutación en el mismo gen, además se analizaron 100 individuos no relacionados de la población general a los cuales no se les encontró mutación.

1.12 Diagnóstico y Diagnóstico diferencial

El diagnóstico clínico de los pacientes homocigotos se basa en la presencia de xantomas, aterosclerosis prematura y el colesterol total mayor a 650 mg/dl a expensas de LDL. En pacientes heterocigotos compuestos (con dos mutaciones diferentes) las manifestaciones clínicas son idénticas a las que presentan los pacientes homocigotos, y sólo se podrá diferenciar entre ambos casos si se realizan estudios genéticos.

En los heterocigotos el diagnóstico para el caso índice puede ser inicialmente sugerido por hipercolesterolemia a expensas de LDL con niveles de triglicéridos normales o discretamente elevados en un tercio de los casos, también presentan xantomas tendinosos a partir de la segunda década de la vida y sobre todo muy importante es el antecedentes de enfermedad cardiovascular en la familia con patrón de herencia autosómico dominante. Se debe tomar en cuenta que existen otras causas de hipercolesterolemia a expensas de LDL ya que menos de 1 en 20 individuos con esta característica bioquímica realmente tienen HF (1, 20).

Diagnóstico diferencial: se debe hacer con hipercolesterolemia poligénica no hereditaria en la que no hay familiares afectados, no tienen xantomas tendinosos y la etiología es desconocida. Otro de los diagnósticos diferenciales a tomar en cuenta es la hiperlipidemia familiar combinada en la que también existe patrón de herencia autosómico dominante, enfermedad coronaria a edad temprana y la diferencia entre esta y la hipercolesterolemia familiar es que no presentan xantomas tendinosos, el patrón de hiperlipidemia puede cambiar de una medición a otra en el mismo paciente y en los familiares se encuentran diferentes patrones de hiperlipidemia.

El hipotiroidismo sin tratamiento sustitutivo con hormonas tiroideas produce elevación de colesterol a expensas de LDL; por otro lado los pacientes con síndrome nefrótico tienen hipercolesterolemia a expensas de LDL aunque el cuadro clínico generalmente es muy claro por el mismo síndrome; niños con

pseudohipercolesterolemia, lo cuales no tienen familiares afectados y responden a tratamiento basado en dieta solamente.

Los datos claves que ayudan a definir el diagnóstico de hipercolesterolemia familiar son:

a) Elevación del colesterol mayor a 250 mg/dl a expensas de la fracción LDL el cual debe ser mayor a 155 mg/dl en HF;

b) La presencia de xantomas tendinosos es patognomónico de HF;

c) Patrón de herencia autosómica dominante. Los familiares afectados tienen elevación de colesterol a expensas de LDL;

d) La afección se encuentra desde la infancia. Aunque existe un grupo de pacientes (15%) en que los criterios mencionados no están claramente presentes y pueden ser subdiagnosticados si no se realiza diagnóstico genético (40).

Para distinguir los casos entre un defecto en el gen del receptor de LDL y apoB100 sólo es posible mediante un estudio genético.

Por otro lado, en los casos donde existe duda en cuanto al diagnóstico diferencial y con valores séricos de colesterol entre 200-250 mg/dl, el diagnóstico genotípico puede utilizarse como una herramienta para diagnóstico definitivo y de esta manera la información con que se cuenta actualmente acerca de respuesta a tratamiento, pronóstico, entre otros puede aplicarse en el paciente con el fin de estimularlo a un mejor apego al tratamiento, también el hecho de tener un diagnóstico definitivo permite cuando el caso lo requiere dar consejo genético al paciente. Sin embargo el diagnóstico de la enfermedad es preponderantemente clínico ya que los criterios clínicos establecidos tienen solamente un 2% de falsos negativos y 7% de falsos positivos cuando son tomados en consideración (12).

Existe un programa denominado MED PED (Make Early Diagnoses to Prevent Early Deaths), cuyo objetivo principal es la detección de enfermedades hereditarias de manera oportuna (46), este programa toma en cuenta el grado de parentesco en relación al caso índice y el grupo de edad al que pertenecen sus niveles de colesterol total y LDL a partir de los cuales se realizó el diagnóstico así como los niveles de colesterol sugeridos para el diagnóstico en la población general, la eficiencia diagnóstica es de 98% de especificidad y 87% de sensibilidad (47) en la siguiente tabla se resumen los criterios para el diagnóstico:

Grupo de edad	Grado de parentesco en relación con el caso índice.			General	"100%"
	Primer grado	Segundo grado	Tercer grado	Población	Probabilidad
<20	220 (155)	230 (165)	240 (170)	270 (200)	240
20-29	240 (170)	250 (180)	260 (185)	290 (220)	260
30-39	270 (190)	280 (200)	290 (210)	340 (240)	280
≥ 40	290 (205)	300 (215)	310 (225)	360 (260)	300

Tabla para diagnóstico del MED PED. Puntos de corte para colesterol total (LDL entre paréntesis) en mg/dl utilizados programa MED PED para diagnóstico de HF. Los pacientes con valores mayor o igual al señalado cumplen criterio para diagnóstico. Los familiares de primer grado son padres, hijos y hermanos, los de segundo grado son tíos, abuelos, sobrinos y medios hermanos, de tercer grado son primos-hermanos, medios hermanos de los padres, etc. Los niveles solamente de LDL se dan en la columna que indica un 100% de probabilidad para el diagnóstico.

En relación al diagnóstico en pacientes pediátricos, es basado primordialmente en la historia familiar y los niveles séricos de LDL. Si el caso tiene niveles iguales o mayores a 135 mg/dl y pertenece a una familia afectada la probabilidad de tener HF es de 98% (valor predictivo positivo para el diagnóstico de HF, dado que reúne el criterio), en cambio cuando los niveles son menores la probabilidad del diagnóstico es de únicamente 0.043 (4.3%)(48).

1.13 TRATAMIENTO

Los pacientes con hipercolesterolemia familiar sin tratamiento, tienen cifras de colesterol LDL que van de 155 a 400 mg/dl, partiendo de esto, no es fácil lograr la meta de tratamiento en la mayoría. El tercer reporte del Panel para tratamiento de colesterol en adultos, del Programa Nacional de Educación en Colesterol (NCEP-ATPIII), establece como meta un colesterol menor a 100 mg/dl en pacientes con alto riesgo, como los casos con cardiopatía isquémica ya establecida (49), con base en esto la reducción en las cifras de colesterol deberá ser entre 50 y 75%. Recientes estudios relacionados con tratamiento han demostrado que para prevenir la progresión de la enfermedad cardiovascular asintomática, el colesterol LDL deberá mantenerse menos de 150 mg/dl. Definitivamente reducciones mayores a 45% son necesarias para disminuir la progresión de la enfermedad aterosclerosa.

Las primeras medidas recomendadas son cambios en el estilo de vida como lo son ejercicio físico moderado, con previa evaluación cardiológica, así como suspender el consumo de tabaco. Además indicaciones dietéticas, con consumo total de colesterol al día de 200 mg o menos y la cantidad de grasas saturadas deberá ser menor al 7% del total de calorías.

En cuanto al tratamiento farmacológico la primera elección son las estatinas o inhibidores de la 3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa), con las cuales se ha logrado disminuir significativamente la morbilidad y

mortalidad cardiovascular tanto primaria como secundaria. Las estatinas con mayor efecto en reducción de los niveles de colesterol LDL son atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina, cuya reducción en los niveles de colesterol es de 40-55% cuando son administradas a dosis máximas (50).

En caso de no lograr la meta de tratamiento, con estatinas se pueden combinar con resinas que secuestran ácidos biliares (colestiramina, colestipol y colesevelam) o un inhibidor selectivo de la absorción intestinal de colesterol (ezetimibe), con los cuales se puede lograr una reducción extra de los niveles de colesterol LDL de 10-20 y 14-25% respectivamente, el ezetimibe tiene menos efectos adversos en cuanto a molestias gastrointestinales, por lo que es posible que pase a ser la resina de primera elección.

El inicio del tratamiento deberá de ser gradual y con monitoreo de efectos adversos, hasta lograr el máximo beneficio en reducción de colesterol LDL.

La aferesis de colesterol LDL se ha convertido en el tratamiento estándar para pacientes con HF homocigota, sin embargo para los casos heterocigotos no es utilizada comúnmente debido a las reducciones sustanciales obtenidas con el tratamiento farmacológico, es un procedimiento invasivo y relativamente seguro. La FDA (Federal Drug Administration) en Estados Unidos de Norteamérica aprobó el uso de la LDL-aferesis para pacientes con HF heterocigota sin enfermedad cardiovascular sintomática en caso de que tengan niveles de LDL mayores a 300 mg/dL a pesar de estar con tratamiento farmacológico a dosis máximas o en el caso de individuos con enfermedad cardiovascular sintomática en caso de que las cifras sean mayores a 200 mg/dL. Hay evidencia que para lograr regresión de la aterosclerosis deberá alcanzarse una concentración de LDL menor a 100 md/dl, por lo que podría ofrecerse a pacientes con cardiopatía isquémica sintomática cuya LDL se mantiene mayor a 160 mg/dL a pesar del tratamiento (50).

Para los pacientes con hipercolesterolemia familiar homocigota la primera elección es la LDL-aferesis, la cual es realizada cada 1-2 semanas de acuerdo a la respuesta, con este esquema de tratamiento se logran reducciones de 58% o más en los niveles de colesterol LDL y un 72% de los eventos cardiovasculares al comparar con los pacientes tratados farmacológicamente (51).

2.- JUSTIFICACIÓN

La hipercolesterolemia familiar es la enfermedad genética mendeliana más frecuente en la población general (1 caso por cada 500 habitantes en el caso de los heterocigotos); tiene repercusión a nivel de salud pública por manifestarse como enfermedad coronaria prematura ya que el 50% de los pacientes del género masculino con esta enfermedad tienen cardiopatía isquémica antes de los 50 años y en el género femenino la prevalencia es de 30% a los 60 años. Se estima que 1:20 pacientes que sufrieron un infarto al miocardio y logran sobrevivir tienen HF (OMIM).

En las poblaciones con alta prevalencia de la enfermedad, la mayoría de los casos de HF pueden ser explicados por 5 o menos mutaciones, como es el caso de los franco-canadienses de Québec, los libaneses cristianos, los Judíos Ashkenazi, Escocia, Holanda, Noruega y Finlandia (14, 16, 25, 37, 38), la característica común en estos grupos es un aislamiento genético de la población relacionada, además existe un rápido crecimiento de la descendencia en un cierto período de tiempo.

En las familias mexicanas afectadas por hipercolesterolemia familiar no se conocen las mutaciones causales y tampoco si existe predominio de alguna o algunas de ellas. En estudios de diferentes regiones geográficas del mundo en donde existe variabilidad genética, se reportan múltiples mutaciones, muchas de ellas nuevas, por lo que es probable que en nuestra población existan múltiples mutaciones y algunas de ellas no reportadas previamente.

Aproximadamente en el 15% de los familiares que tienen la enfermedad se puede encontrar un nivel sérico de colesterol limitrofe, sin criterios clínicos diagnósticos de HF, por lo que una alternativa para hacer el diagnóstico definitivo es buscar la mutación causal, de ahí que es útil conocer si existen mutaciones que son más prevalentes en nuestra población, y de esta manera en el futuro se puede iniciar una búsqueda dirigida de estas mutaciones en los casos en que este indicado.

En el análisis genético de los distintos tipos de mutaciones se encuentran pacientes en los que no existe mutación en el gen del receptor de LDL ni en apoB100 lo que sugiere existen otros genes implicados en la etiología de la hipercolesterolemia familiar. El encontrar familias sin mutación en los genes conocidos, dará pauta para un nuevo estudio enfocado a buscar otros *loci* que pueden estar implicados en la etiología de la enfermedad y eventualmente generar conocimiento nuevo de factores implicados en el metabolismo del colesterol y en la etiología de esta enfermedad.

3.- HIPOTESIS

Debido a la variabilidad genética de la población mexicana, esperamos encontrar más de 5 mutaciones diferentes en nuestra muestra de casos con Hipercolesterolemia Familiar, dado que en las poblaciones genéticamente aisladas 5 o menos mutaciones explican la mayoría de los casos.

4.- OBJETIVOS

General:

Caracterizar la prevalencia y diferentes tipos de mutaciones en los genes que codifican para el receptor de LDL o apoB100 en pacientes mexicanos con hipercolesterolemia familiar.

Específicos:

Primarios:

-Determinar el tipo de mutaciones en los genes del receptor de LDL y apoB100 en sujetos mexicanos con hipercolesterolemia familiar.

-Determinar el porcentaje de los sujetos con hipercolesterolemia familiar que no presentan mutaciones en receptor LDL o en la apoB100.

Secundarios:

-Describir las características clínicas y bioquímicas de los pacientes con hipercolesterolemia familiar que pertenecen a nuestra población.

-Analizar la eficiencia de los criterios diagnósticos del MED PED para identificar individuos con hipercolesterolemia familiar en un grupo de pacientes que pertenecen a la población mexicana

5.- MATERIAL Y METODOS

5.1.- Diseño del estudio

Es un estudio descriptivo, de procedimiento y observacional.

En cuanto a la recolección de datos es transversal y retrolectivo

5.2.- Pacientes

Se captaron los casos índice y miembros de las familias con HF, de la Clínica de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", bajo los siguientes criterios de inclusión:

A) Que dieran su consentimiento por escrito (ver Anexo 1).

B) Que cumplieran los siguientes criterios diagnósticos para HF (para el caso índice o familiares afectados):

1.- Elevación de los niveles de colesterol total mayor a 250 mg/dl y LDL mayor a 155 mg/dl.

2.- Presencia de xantomas tendinosos o cutáneos en al menos un miembro de la familia.

3.- Patrón de herencia autosómico dominante (antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular prematura en el género masculino antes de los 50 años y en el género femenino antes de los 60 años) o bien antecedente de familiar(es) con cifras elevadas de colesterol total (mayor a 250 mg/dl) o LDL (mayor a 155 mg/dl).

Los Criterios de exclusión son:

1. Presencia de enfermedad distinta a HF que curse con elevación de colesterol total a expensas de LDL, como hipotiroidismo, hipercolesterolemia poligénica e hiperlipidemia familiar combinada.
2. Incremento de LDL a expensas de VLDL (síndrome nefrótico, uso de glucocorticoides).

5.4 Captura de Pacientes

Como etapa inicial se hizo una búsqueda en el registro de perfiles de lípidos del Laboratorio de lípidos del Departamento de Endocrinología y Metabolismo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, desde el año de 1990 de los casos cuyo perfil era compatible con Hipercolesterolemia Familiar, posteriormente se procedió a revisar sus expedientes, con el objetivo de buscar datos adicionales que apoyaran el diagnóstico o bien si existía una causa secundaria de dicha hipercolesterolemia.

Se revisaron 879 expedientes, de los cuales en caso de reunir criterios que hicieran sospechar hipercolesterolemia familiar, se les citó para revisión clínica, realización de árbol genealógico y toma de muestras sanguíneas, no sin antes haberles explicado el objetivo del estudio y haber obtenido su autorización. Si el caso índice reunía criterios para diagnóstico de HF, posteriormente se programó cita a los familiares que aceptaron participar en el estudio con el objetivo de hacer una revisión clínica y toma de muestras.

5.3.- Captura de Datos

Se utilizó una hoja de recolección de datos (Anexo 2), la cual incluye identificación del paciente, región del país de donde proviene, familiares afectados, perfil de lípidos a su llegada al Instituto, posterior al inicio del tratamiento y tiempo de control en la clínica, hallazgos clínicos relacionados con HF, investigación de otros factores asociados a hipercolesterolemia.

Posteriormente en todos los casos se realizó un árbol genealógico, con el fin de establecer el patrón de herencia.

5.4.- Toma de muestras y pruebas de laboratorio

Se tomaron muestras de sangre venosa periférica a los participantes, tanto casos índice como familiares que dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio.

Las muestras sanguíneas se tomaron después de un ayuno de al menos 10 hrs., para obtener suero con el fin de hacer determinación de los niveles de lípidos, así como sangre total anticoagulada con K₃EDTA que se almacenó a -80°C para extracción de DNA.

Medición de niveles de lípidos: Las mediciones fueron realizadas en el laboratorio del Departamento de Endocrinología y Metabolismo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, el cual sigue los procedimientos de estandarización de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, incluyendo el uso de un suero control externo. Este laboratorio está certificado para estandarización de los exámenes mediante la evaluación externa comparativa del Programa de Laboratorios del Colegio Americano de Patólogos

Clínicos. La glucosa se midió utilizando el método de glucosa oxidasa (Laboratorios Bayer). El colesterol total en suero y triglicéridos se midieron a través de método enzimático (SERA-PAK) con un CV de 3.3%. El colesterol HDL fue medido después de precipitación de VLDL y LDL utilizando el método de ácido fosfotungstico con un CV de 2.5%. Las concentraciones de colesterol LDL fueron estimadas mediante la fórmula de Friedewald (52).

5.5.- Búsqueda de mutaciones en el gen del RLDL y apoB100

De las muestras de sangre total, se obtuvo DNA de linfocitos mediante el método de extracción con fenol/cloroformo.

Búsqueda de mutaciones en el gen que codifica para el receptor de LDL:

Para el escrutinio inicial de mutaciones se utilizó la técnica de SSCP (conformación de polimorfismos de cadena única). El primer paso consiste en amplificar la región a estudiar mediante PCR marcada con radiactividad (53), después se separa el DNA en cadenas únicas mediante desnaturalización, se somete a electroforesis en gel de acrilamida y el análisis está basado en la diferencia de migración electroforética entre el DNA mutado y el no mutado. Esta metodología tiene la capacidad de detectar cerca del 100% de las mutaciones si se lleva a cabo con estrictas condiciones tanto de temperatura, como de los buffers utilizados (54). Puede detectar cambios en la secuencia del DNA, tan pequeños como 1 base; la cadena sencilla de DNA se endobra de forma diferente aún si existe diferencia en una sola base, la movilidad electroforética del DNA de cadena única en geles de poliacrilamida o gel conformacional, depende no únicamente del tamaño, sino de la secuencia, partiendo de la base de que el DNA de cadena única puede formar pares de bases intramoleculares lo que resulta en una conformación dependiente de secuencia con una movilidad específica en el gel.

-Para cada uno de los exones que componen el gen del receptor de LDL se sintetizaron un par de oligonucleótidos (sentido y antisentido), de acuerdo a las secuencias ya reportadas previamente (55). En el caso del exón 4 y 10 fueron divididos en dos, debido a que su gran tamaño en cuanto a pares de bases puede disminuir la sensibilidad para la detección de mutaciones. En la siguiente tabla se reporta la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para cada exón.

Región/ Exón	5' oligonucleótido (de 5' a 3')	3' oligonucleótido (de 5' a 3')	(pb)
Promotor	GAGTGGGAATCAGAGCTTCACGGGT	CCACGTCATTTACAGCATTCAATG	155
Exón1	ACTCCTCCCCCTGCTAGAAACCTCA	TTCTGGCGCCTGGAGCAAGCCTTAC	234
Exón2	CCTTTCTCCTTTTCCTCTCTCTCAG	AAAATAAATGCATATCATGCCAAA	172
Exón3	TGACAGTTCAATCCTGTCTCTTCTG	ATAGCAAAGGCAGGGCCACACTTAC	176
Exón4A	GTTGGGAGACTTCACACGGTGATGG	ACTTAGGCAGTGGAACCTGAAGGCC	355
Exón4B	CCCCAGCTGTGGCCTGCGACAACG	GGGGGAGCCCAGGGACAGGTGATAG	267
Exón5	CAACACACTCTGTCCTGTTTTCCAG	GGAAAACCAGATGGCCAGCGCTCAC	252
Exón6	TCCTTCTCTCTCTGGCTCTCACAG	GCAAGCCGCTGCACCGAGACTCAC	174
Exón7	AGTCTGCATCCCTGGCCCTGCGCAG	AGGGCTCAGTCCACCGGGGAATCAC	169
Exón8	CCAAGCCTCTTCTCTCTCTTCCAG	CCACCCGCGCCTTCCCGTGCTCAC	175
Exón9	TCCATCGACGGGTCCCCTCTGACCC	AGCCCTCATCTCACCTGCGGGCCAA	271
Exón10A	AGATGAGGGCTCCTGGTGCATGCC	GCCCTTGGTATCCGCAACAGAGACA	202
Exón10B	GATCCACAGCAACATCTACTGGACC	AGCCCTCAGCGTCGTGGATACGCAC	162
Exón11	CAGCTATTCTCTGTCTCCACCAG	TGGGACGGCTGTCTGCGAACATAC	168
Exón12	GCACGTGACCTCTCCTTATCCACTT	CACCTAAGTGCTTCGATCTCGTACG	209
Exón13	GTCATCTTCTTGTCTGCTGTTTAG	GTTTCCACAAGGAGTTTCAAGTT	217
Exón14	CCTGACTCCGCTTCTTCTGCCCCAG	CGCAGAAACAAGGCGTGTGCCACAC	202
Exón15	GAAGGGCCTGCAGGCACGTGGCACT	GTGTGGTGGCGGGCCAGTCTTTAC	246
Exón16	CCTCACTTGTCTTCTCTCTCTGCAG	CGCTGGGGGACCGGCCCGCGCTTAC	127
Exón17	TGACAGAGCGTGCCTCTCCCTACAG	GCTTCTAGAGAGGGTCACACTCAC	307
Exón18	TCCGCTGTTTACCATTTGTTGGCAG	AATAAAACAAGGCCGGCGAGGTCTC	135

PCR para cada uno de los exones que componen el gen: cada uno de los segmentos del gen (que incluyeron exones y región donadora y aceptora de los intrones) fueron amplificados a través de una PCR marcando radiactivamente el producto con αP^{32} dCTP. Posteriormente el producto se desnaturalizó a 94°C por 5 minutos y se colocaron las muestras inmediatamente en hielo, con el fin de mantener el estado de desnaturalización, después se realizó una electroforesis, en geles de acrilamida al 6% durante 12 - 24 horas a temperatura ambiente, posteriormente se secó el gel y se expuso a una placa radiográfica; una vez revelada, se procedió a analizar las bandas, cuando se encontraron diferencias en la migración de una banda, se procedió al siguiente paso.

Para caracterizar la mutación, se realizó secuenciación automática directa del fragmento de DNA que mostró alteraciones en el patrón de migración (56), (para confirmar si existía una mutación en la secuencia del gen (Applied Biosystems 310 secuenciador de Perkin-Elmer Corp, Foster City, CA).

Búsqueda de las mutaciones puntuales conocidas para Apo B100, se realizó inicialmente PCR con los siguientes oligonucleótidos de acuerdo al sitio de la mutación: (31,33,34):

Mutación Arg3500Gln

5'TCTCGGGAATATTCAGGAACTATTG3'
3'CAGgAGTCACTTCGACGTCCCG5'
3'CAtgAGTCACTTCGACGTCCCG5'

Mutación Arg3531Cys

5'CCTCCACTGAAAGATTTCTCTCTATGGG3'
5'GGAAgCTTAGGTGTCCTTCTAAGGATCCTG3'

Mutación Arg3500Trp

5'GTGTCAGTGGCAAAAACCACA3'
5'CAGAGGGAATATATGCGTTGG3'

Posteriormente se digirió el producto con las siguientes enzimas de restricción:

- Arg3500Gln Sau 96 I y Sca I
- Arg3531Cys Nsi I
- Arg3500Trp Hsp 92 II

Finalmente se realizó electroforesis en gel de acrilamida para analizar si existe en las bandas generadas, un patrón de digestión que sugiriera la presencia de la mutación específica.

En caso de encontrarse los fragmentos que sugieren la mutación, esta se confirmó con secuenciación automática (Applied Biosystems 310 secuenciador de Perkin-Elmer Corp, Foster City, CA).

Análisis de Ligamiento

A las familias que no se les encontró mutación con PCR-SSCP para el gen del RLDL o enzimas de restricción para las mutaciones de APOB100; se realizó análisis de ligamiento a través de genotipificación con marcadores, mediante amplificación con PCR, incorporando el marcador radioactivo αP^{32} dCTP. Para el RLDL con el marcador autosómico D195394 estrechamente ligado a este gen. Para el cromosoma 1p32, los marcadores D1S2134, D1S386, los cuales tuvieron el mayor LOD score en la familia mexicana reportada previamente ligada a este locus (Canizales-Quinteros, et al, 2003; Circ Res) (g). Para el análisis se utilizaron, el programa de análisis de ligamiento no paramétrico llamado GENEHUNTER-PLUS (Multipoint linkage analysis) y FASTLINK (Two point linkage analysis), para un modelo autosómico dominante con penetrancia del 90%.

5.5 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra lo constituye la población total de los pacientes con HF que acuden a la Clínica de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, así como miembros de familias que aceptaron participar y 5 sujetos provenientes de la clínica de lípidos del Intituto Mexicano del Seguro Social.

5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS versión 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Los datos son expresados en el caso de variables continuas en promedio \pm desviación estándar. Para los casos de distribución sesgada se empleó mediana \pm desviación intercuartilar. Y para las variables categóricas o nominales se reportan como frecuencias absolutas

Se realizó prueba de t para comparar los promedios de dos diferentes grupos y prueba de chi cuadrada para comparar variables binomiales.

Para calcular el grado de acuerdo para el diagnóstico entre el hallazgo de mutación y los niveles de lípidos por la clasificación del MEDPED se usó el índice de Kappa, cuyo valor puede ser interpretado como sigue (criterios de Landis y Koch):

Valor de Kappa	Grado de acuerdo
0.0-0.21	Pobre
0.21-0.40	Leve
0.41-0.60	Moderado
0.61-0.80	Considerable
0.81-1.0	Casi perfecto

Las mutaciones se expresan por frecuencia relativa.

Para el nivel alfa de significancia se eligió un nivel nominal menor de 0.05.

Se utilizó el procedimiento de LOD SCORE para análisis de ligamiento.

5.7 Implicaciones éticas

El protocolo fue presentado y aceptado en el Comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición.

A todos los pacientes que participaron se les explicó en que consistía el estudio y posteriormente firmaron el consentimiento escrito.

6.- RESULTADOS

PACIENTES:

Se incluyeron 143 sujetos, de estos 138 fueron captados en la Clínica de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición y 5 sujetos más del Centro Médico Nacional siglo XXI. Del total, 37 son casos índice y 106 familiares. Contamos con familiares en 31 casos índice. El 51% (64 sujetos) de los familiares de casos índice fueron diagnosticados con hipercolesterolemia familiar

Pertencen al género femenino el 59.2% de los sujetos estudiados. Llama la atención que de los afectados con hipercolesterolemia el 80% pertenecen a este género.

El promedio de edad fue de 48 ± 16.8 años (ver tabla 1 para características demográficas y clínicas de los casos afectados).

La manifestación clínica más frecuente fue xantomas tendinosos ya que 86 casos (85.15%) los presentaban. Se encontraron 17 pacientes (16.8%) con manifestaciones de aterosclerosis cardiovascular. En relación a otros factores de riesgo cardiovascular, el 34.7% (N=35) de los casos son fumadores y el 13% tienen hipertensión arterial.

La edad promedio a la que se hizo el diagnóstico de HF es de 36.8 ± 17.2 años, con un rango muy amplio que va de los 5 a 74 años.

El promedio de la concentración sérica de colesterol total fue de 355 ± 126 mg/dl y la de colesterol LDL de 274 ± 109 mg/dl, estos valores son mayores a la percentila 90 para la población mexicana; dicha diferencia se ve claramente al comparar afectados versus no afectados (ver tabla 2); el promedio de triglicéridos en el grupo de afectados se encontró dentro del rango considerado normal o de referencia (144 ± 59 mg/dl).

Cuando se comparó entre los casos afectados en quienes se *encontró mutación* (tanto en el RLDL como en apo B100) contra los casos afectados en los que *no se encontró*. De manera interesante se observó una diferencia significativa en los niveles de colesterol total, los cuales están más elevados en el grupo con mutación (tabla 3).

Debido a que estudios previos han demostrado una diferencia significativa de los niveles de triglicéridos y HDL en hombres versus mujeres afectados (57), se compararon ambos grupos y en esta cohorte no existen diferencias (ver tabla 4).

Con el objetivo de analizar la eficiencia diagnóstica en relación a niveles de lípidos para familiares del caso índice del programa MED PED se realizó una tabla

de contingencia en la que se toma en cuenta por un lado, los que reunieron los criterios diagnósticos de acuerdo al MED PED y por otro, el diagnóstico a través de mutación o ligamiento (ver tabla 5). Se encontró una sensibilidad de 79.5%; especificidad de 88%; el valor predictivo positivo fue de 91% y el valor predictivo negativo de 73%. También se calcularon las razones de verosimilitud con el fin de evaluar la aportación de la prueba. La razón de verosimilitud positiva fue de 6.625 y la negativa de 0.23, con lo cual cumple con criterios para ser una prueba aportativa. El valor de Kappa fue de 0.65 que entra en el rango de acuerdo considerable por los criterios de Landis y Koch (ver material y métodos)

En relación a una familia en la que se encontró la mutación en apoB100 Arg3500Gln, de los 5 familiares afectados sólo 1 reunió criterios diagnósticos de acuerdo al MED PED el cual es un familiar de segundo grado (sobrino) de 12 años, sin embargo los 3 hermanos de 45, 42 y 37 años, así como una sobrina afectada de 8 años no reunieron los criterios para diagnóstico de acuerdo al MED PED, lo cual nos indica que los niveles de colesterol son menores en esta familia con apoB100 defectuosa y por lo tanto los criterios del MED PED no son diagnósticos en una proporción considerable de los individuos afectados.

MUTACIONES EN EL GEN DEL RECEPTOR DE LDL

Se encontraron 13 mutaciones diferentes en el gen del RLDL. Las mutaciones se distribuyeron en 16 familias diferentes.

En 3 de estas existen 2 dobles mutaciones, la primera es W-18X y E256K que fue encontrada en 2 familias; había sido reportada previamente en familias de población española por Cenarro y cols., en 1998 (58). La segunda es C88R y C163W se encontró en una familia de nuestra muestra y no ha sido reportada previamente en la literatura (ver tablas 6 A y 6 B).

Ocho mutaciones son nuevas, ya que no se encuentran reportadas en la base de datos de mutaciones en el receptor de LDL (UMD-LDLR database www.umd.necker.fr) (23, 24), de ellas dos se encuentran en el exón 4, dos en el exón 6, tres en el exón 15 y finalmente una en el exón 16.

Los tipos de mutaciones son (ver tablas 6A y 6B):

- a) Ocho sustituciones (E80K, C88R, C163W, E256K, C268R, C343R, C347Y, V776M);
- b) Dos mutaciones en las que un cambio de base en la secuencia da como resultado una secuencia que codifica para condón de paro (W-18X, Q718X);
- c) Una inserción de una G en el exón 4 que cambia el marco de lectura (Frameship) y genera más adelante un condón de paro (E92FsX);

d) Dos deleciones la primera se caracteriza por la ausencia de una C y en el otro caso de una T, lo cual cambia el marco de lectura en el exón 15 (E714Fs y P736Fs respectivamente).

En la tabla 6C se presenta un resumen de las mutaciones y el dominio de la proteína afectado de acuerdo a la localización de la mutación, el dominio de unión al ligando es en el que se encontraron más mutaciones, ya que 6 de las 13 se encuentran en este.

POLIMORFISMOS Y CAMBIOS INTRONICOS EN EL GEN DEL RECEPTOR DE LDL

Fueron encontrados 5 polimorfismos previamente reportados por otros autores, estos se localizan en el intrón 7, exón 10, 12 y 15; en el 12 se encontraron 2 polimorfismos diferentes. El polimorfismo del exón 10 (1413 G>A) se encontró en 27 sujetos no emparentados, lo que representa un 18.9% de la muestra (tabla 7). El polimorfismo que le sigue en frecuencia es el del exón 12 (1773 T>C), que fue encontrado en 11 sujetos no emparentados, esto representa el 7.7% del total de la muestra. Se encontraron 2 polimorfismos nuevos en los exones 1 (24 A>G) y 8 (1185 3G>C).

También en los intrones 1, 17 y 18 existen cambios de una base, ninguno se encuentra en los sitios consenso del empalme (splicing), ver tabla 8, sin embargo en dos familias que presentan un cambio en el intrón 17 (nucleótido 2548 -80 A>G), no se les encontró mutación en algún exón y sólo está presente en los afectados con la enfermedad.

MUTACIONES Y POLIMORFISMOS PARA APOLIPOPROTEINA B100

Se encontró una transición de C>G, de forma heterocigota en el nucleótido número 10422, que corresponde a un cambio de ácido glutámico por glutamina del aminoácido 3405, el cual es considerado polimorfismo (35), una hermana tiene el cambio de forma homocigoto y ambos casos tienen también en el gen del RLDL una inserción de G entre los nucleótidos 337-338 (E92FsX).

Se encontró una mutación en el codón 3500 que produce un cambio de arginina a glutamina, debida a una sustitución de adenosina por guanosina en el nucleótido 10699; se estudiaron además 14 miembros de la familia. Los resultados obtenidos de esta familia ya fueron publicados (59):

**DESCRIPCION DE LA FAMILIA CON MUTACIÓN EN APOB100 Arg3500Gln
(Robles-Osorio L, et al, 2003 Arch Med Res)**

CASO INDICE:

Paciente del género masculino de 45 años de edad, que fue referido por hipercolesterolemia severa, antecedentes familiares de infarto agudo al miocardio (IAM) en el abuelo paterno a los 55 años y en el padre a los 52 años. A la exploración física se detectaron xantomas en el tendón de Aquiles. No se encontraron enfermedades comórbidas que pudieran explicar el patrón de hipercolesterolemia a expensas de LDL (IIa). Se diagnosticó como probable HF y se inició tratamiento con dieta y atorvastatina 40mg/día, con el cual hubo una buena respuesta:

Perfil de lípidos del caso índice

(Las cifras son reportadas en mg/dl).

Lípidos	Al diagnóstico (1996)	Atorvastatina 40mg/día + Dieta
Colesterol Total	370	195
Colesterol LDL	300	134
Colesterol HDL	32	43
Triglicéridos	189	90

En el árbol genealógico (Figura 5) se encontró un patrón de herencia autosómico dominante, con antecedentes de enfermedad cardiovascular a edad temprana por la rama paterna.

Se realizó escrutinio para mutaciones en el gen del receptor de LDL y para las mutaciones en el gen de ApoB100 y se encontró un patrón en la digestión con enzimas de restricción que sugería la existencia de la mutación Arg3500Gln, que consiste en una *sustitución de adenosina por guanosina en la posición 10,699*, que corresponde al codón 3500, cambio de CGG a CAG, se realizó secuenciación del fragmento que corresponde a esa región y se corroboró el cambio (Figura 6).

Se estudiaron además 13 familiares, de los cuales tres de los 4 hermanos tenían xantomas tendinosos e hipercolesterolemia a expensas de LDL, se estudiaron nueve de los 14 miembros de la siguiente generación y se encontraron dos sujetos (número 7 y 13 en la tabla 9) con niveles de colesterol elevados a expensas de LDL. Se corroboró el diagnóstico en todos los familiares con hipercolesterolemia mediante el patrón de digestión de DNA con las enzimas de restricción específicas Sau 96 I y Sca I (figura 7). A los casos afectados se les inició tratamiento con cambios en el estilo de vida y diferentes dosis de atorvastatina de acuerdo a la respuesta.

ANALISIS DE LIGAMIENTO:

De los casos en los que no se encontró una mutación tanto en el gen del RLDL como en apolipoproteína B100, se incluyeron 11 familias en las que se contaba con al menos 4 miembros para hacer análisis de ligamiento.

En relación a la región del gen del RLDL el marcador que se utilizó fue D195394. Se encontraron 3 familias ligadas al RLDL en las que previamente no se había encontrado mutación (ver tabla 10). Los LOD score de las tres familias fueron 1.158, 2.10 y 0.957 respectivamente.

Por otro lado para el cromosoma 1p32, los marcadores utilizados fueron D1S2134 y D1S386. Se encontraron 2 familias cuyos LOD SCORE, si bien no están claramente en niveles confirmatorios para ligamiento, debido a que es positivo, posiblemente están ligadas a esta región (ver tabla 11). Los valores de LOD score son 0.308 y 0.222, respectivamente.

7.- DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta cohorte de pacientes con hipercolesterolemia familiar son los primeros reportados en nuestro país. Estos revelan que nuestra población es genéticamente heterogénea debido a que la recurrencia de las diferentes mutaciones no es alta, ya que sólo se encontró una mutación en 4 diferentes familias, que representa un 10.8% de los casos índice en los que se identificó mutación. Seguida en frecuencia por 2 dobles mutaciones que se encontraron en 2 familias no relacionadas (5.4%). Estos resultados contrastan con los encontrados en otras regiones geográficas o grupos étnicos en los que pocas mutaciones explican la mayoría de los casos debido a cierto aislamiento genético, por ejemplo en la población finlandesa en la que 2 mutaciones (FH-North Karelia y FH-Helsinki) explican las dos terceras partes de los casos, lo cual facilita el diagnóstico de HF mediante búsqueda dirigida por métodos de genética molecular (37, 60), como también es el caso de la población franco-canadiense de la provincia de Québec en la que 5 mutaciones explican el 76% de los casos con HF (14)

Por otro lado el número de mutaciones y la proporción en la que se encuentra presente cada una en relación al número total de sujetos no relacionados, son acordes a lo encontrado en poblaciones con variabilidad genética como la nuestra (25). Así en una muestra de afectados con HF en China se encontraron 18 mutaciones diferentes de un total de 21 casos índice (40); en población española fueron reportadas 116 mutaciones diferentes en casos no relacionados, de las cuales 39 no habían sido reportadas previamente (61,62); en un reporte de mutaciones encontradas en población brasileña, se encontraron 15 mutaciones diferentes en un total de 35 individuos no relacionados (63), otro ejemplo es el caso de la población canadiense de la provincia de Ontario, en la que se encontraron 25 mutaciones diferentes en 34 casos índice (64).

En presente muestra se encontraron mutaciones en 16 familias, de un total de 37, que representan un 43.24%, similar a lo encontrado en otros reportes de diferentes grupos, además 3 familias en el análisis de ligamiento para el receptor de LDL son altamente sugerentes de tener una mutación en el gen del RLDL, si son tomadas en cuenta hacen un total de 51.35% de los casos.

En general en ningún estudio se ha encontrado que el porcentaje de mutaciones encontradas sea mayor al 70% a través de SSCP (62), a excepción de las poblaciones en donde existe el efecto de gen fundador. En todos los estudios de mutaciones en pacientes con HF, el porcentaje de no detección de mutaciones va de 30-60%, lo cual puede ser explicado por la heterogeneidad genética de la HF, con contribuciones de uno o varios genes implicados, que intervienen en el metabolismo de la LDL y un defecto en ellos se manifiesta como HF (30,39,40,44,21,65,66,61). Esta heterogeneidad genética de la HF es apoyada por reportes de nuevos loci candidatos e incluso el hallazgo de mutaciones en una proteína implicada en la homeostasis de colesterol en 2 familias con hipercolesterolemia familiar (19,42,43,67).

La sensibilidad para encontrar mutaciones con la técnica de SSCP es de 92-99%, en diferentes estudios de hipercolesterolemia familiar, existe la posibilidad de que no sean detectadas con este método en situaciones como la presencia de deleciones o inserciones grandes, las cuales constituyen el 2.5 a 5% de las mutaciones en HF (65) o bien cambios en regiones intrónicas que pueden intervenir en el empalme. En este estudio se amplificaron los exones y las regiones consenso para el empalme de los intrones, sin embargo, aún existe la posibilidad de cambios en otras regiones intrónicas no detectados que puedan afectar el empalme o bien rearrreglos mayores como son deleciones o inserciones.

En relación a las mutaciones específicas encontradas en este estudio, existe un reporte en la literatura de un sujeto de origen mexicano con la mutación 1090 T>C (C364R) (55). Al comparar con publicaciones de poblaciones hispanoamericanas, las cuales tienen cierta afinidad en cuanto a ascendencia de nuestra población; las mutaciones encontradas previamente son el cambio en el nucleótido 12 G>A (W-18X) en sujetos españoles y colombianos, la mutación 829 G>C (E256K), así como la doble mutación W-18X y E256K en tres familias españolas en las que por análisis de co-segregación se encontraron ambas mutaciones en el mismo alelo (58,61,62).

En una publicación previa de las mutaciones y polimorfismos de pacientes con HF en población Brasileña reportaron tres de los polimorfismos encontrados en nuestra población, como son 1773 T>C, 1725 C>T y 2232 G>A, este último publicado sólo en estas dos poblaciones (63).

De manera interesante en dos familias con cambios intrónicos, sólo los afectados presentan el cambio en el intrón 17, nucleótido 2548 -80 A>G y no se encontró mutación en algún exón, por lo que en ambos casos el cambio de nucleótido podría afectar el empalme y ser entonces la causa de la enfermedad, estos cambios no han sido reportados previamente.

La mayor parte de las mutaciones encontradas, se localizan en los exones que codifican para el dominio de unión al ligando, lo cual es acorde con lo reportado en la mayoría de las poblaciones, ya que incluso llega a constituir las dos terceras partes de las mutaciones (1).

Los sujetos afectados con HF en este estudio, llama la atención la mayor proporción del género femenino (80%), ya que del total de la muestra, incluyendo afectados y no afectados representan un 59%, lo cual no es esperable dado que es una enfermedad de herencia autosómica dominante y no ha sido reportado hasta el momento. Puede explicarse por un sesgo del grupo de pacientes con HF que acuden a la clínica de lípidos del INCMNSZ. Durante el desarrollo de este estudio se observó frecuentemente poca respuesta de los miembros del género masculino para acudir a escrutinio y atención médica. En el árbol genealógico realizado de cada caso índice, la proporción de afectados de ambos géneros es semejante. Podría también ser explicado si se tratase de una muestra de sobrevivientes, ya que el género masculino sufre CI a más temprana edad.

Las cifras de colesterol total están significativamente más elevadas en el grupo de pacientes con mutación identificada cuando se comparan con los que tienen clínicamente HF pero no se encontró mutación. Los niveles de colesterol LDL no son estadísticamente diferentes entre los dos grupos, esto va a favor de la hipótesis de que se puede tratar de una enfermedad con un mismo fenotipo, pero el defecto radica en otra área del metabolismo de lípidos.

El hecho de tener el diagnóstico con el hallazgo de una mutación nos permitió evaluar la eficiencia diagnóstica de los criterios para las cifras de lípidos de acuerdo al programa MED PED (46,47). Así en nuestra muestra si un paciente tiene niveles de colesterol diagnósticos de HF, patrón de herencia autosómico dominante con historia familiar de cardiopatía isquémica prematura y xantomas tendinosos en al menos un miembro de la familia, los criterios diagnósticos del MED PED tienen una sensibilidad de 79.5% y una especificidad de 88%, es decir un 20.5% de falsos positivos y un 12% de falsos negativos. Contrastan estos resultados con lo obtenido originalmente en la cohorte de Utah del programa MED PED, los pacientes diagnosticados con la presencia de la mutación versus no afectados, en que la sensibilidad es de 87% y la especificidad de 98%.

Por otro lado si el paciente tiene criterios para diagnóstico de HF con los criterios del MED PED, la probabilidad de que realmente tenga la enfermedad corroborada por mutación es del 91% (valor predictivo positivo de los criterios del MED PED) y si no reúne los criterios para diagnóstico, la probabilidad de que realmente no tenga la enfermedad es de 73% (valor predictivo negativo). El grado de acuerdo entre el diagnóstico de HF con los criterios del MED PED y tener la enfermedad diagnosticada mediante mutación es de un 65% (Kappa 0.65) lo cual es un acuerdo bueno o considerable (criterios de Landis y Koch).

Sabemos que el porcentaje de casos no diagnosticados de acuerdo a la prevalencia de la enfermedad es alto aún en países en donde existe un registro central de enfermedades. En un estudio realizado en Inglaterra cerca del 75% de los casos esperados no fueron diagnosticados, durante un periodo de 19 años, tomando como referencia la prevalencia de la enfermedad (1:500) (68).

Dado el impacto de esta enfermedad, ya que los pacientes del género masculino tienen un riesgo de 50% de enfermedad coronaria manifiesta a la edad de 50 años y el género femenino de por lo menos 30% a los 60 años (69,70). Es muy importante establecer estrategias de escrutinio. Si este se lleva a cabo en población general sería necesario estudiar 1000 sujetos para encontrar 2 casos, pero cuando se hace de manera dirigida por ejemplo en pacientes con cardiopatía isquémica, la frecuencia de detección es de 5% y entre los familiares de primer grado de casos índice confirmados clínicamente es de 1 caso por cada 2.6 estudiados (68).

En nuestro estudio la frecuencia en que se diagnostica la enfermedad entre los familiares de casos índice con diagnóstico ya establecido fue de 51%, es decir 1 en cada 2 familiares estudiados, lo cual es costo beneficio en cuanto al inicio

temprano del tratamiento y en consecuencia prevención o retraso en la edad de presentación de cardiopatía isquémica.

Es posible incrementar la esperanza de vida en los pacientes con HF si el diagnóstico e inicio del tratamiento se realizan en etapas tempranas de la vida, este incremento es aún mayor en las pacientes del género femenino. De esta forma si el tratamiento se inicia antes de los 16 años, la esperanza de vida se incrementa 9.2 y 7.1; si se inicia entre los 16 y 24 años se incrementa 9.13 y 6.97 años; entre los 25 y 34 años el incremento es de 8.16 y 3.7 años; de los 35 a 44 años 0.57 y 7.33 años y finalmente si se realiza entre los 45 y 54 años es de 0.26 y 3.41 años para el género femenino y masculino respectivamente en todos los rangos de edad mencionados (45). Con esta evidencia podemos decir que existe un costo-beneficio importante en cuanto al diagnóstico temprano, dirigido a población de riesgo como lo son los familiares de los casos índice, principalmente entre la edad de 16 a 34 años.

En la muestra estudiada la edad promedio de diagnóstico es 36 años, por lo que es necesario establecer estrategias de escrutinio para el diagnóstico de dislipidemias a edad temprana, como la realización de un perfil de lípidos, que nos permite el inicio temprano del tratamiento y en consecuencia un aumento de la esperanza de vida.

El diagnóstico genético molecular ofrece la posibilidad de un diagnóstico certero de la enfermedad. También es importante en estudios familiares de casos índice conocidos, con el objetivo de realizar un diagnóstico oportuno y por otro lado a los no afectados se les confirma su estado. En centros académicos ofrece la oportunidad de crecer en el conocimiento de esta enfermedad, sus causas, metabolismo de lípidos y eventualmente la posibilidad de un tratamiento nuevo.

8.- CONCLUSIONES

La muestra estudiada es genéticamente heterogénea.

No es posible aplicar un escrutinio dirigido a mutaciones específicas en pacientes con dislipidemia que se sospecha hipercolesterolemia familiar, debido a la variabilidad genética de nuestra población.

Existe un 40-60% de no detección de la mutación causal en HF, lo cual puede ser debido a que se trata de una enfermedad con el mismo fenotipo, cuyo origen radica en el defecto en otra proteína o factor que interviene en el metabolismo de lípidos.

Al aplicar los criterios diagnósticos del MED PED existe un 80% de posibilidades de diagnosticar un caso afectado como verdaderamente positivo y 12% de que sea un falso positivo.

En los pacientes afectados el promedio de edad a la que se hizo el diagnóstico fue de 36.8 años, lo cual representa un retraso en la edad de inicio del tratamiento, ya que ha sido reportado en la literatura que si se inicia a los 16 años o menos se puede incrementar la esperanza de vida hasta 7 y 9 años en el género masculino y femenino respectivamente.

Es necesario instaurar estrategias de diagnóstico en poblaciones específicas tales como pacientes con infarto al miocardio en los que el 5% presentan HF. Una vez identificado el caso índice, es importante hacer escrutinio a los familiares, ya que existe la posibilidad de encontrar 1 caso por cada 2 familiares.

Así mismo, es necesario implementar programas de educación médica en relación a este problema con la finalidad de mejorar la capacidad diagnóstica de hipercolesterolemia en población joven.

9.- BIBLIOGRAFIA

- 1) Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS: Familial hypercholesterolemia. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited diseases, New York: McGraw-Hill; 1995, Vol 1: 1981-2030.
- 2) Zollner N, Siegfried J Thannhauser, 1885-1962. Classification of xanthomatous diseases. Internist. 1969; 10: 106-109.
- 3) Wilkinson CF Jr. Essential familial hypercholesterolemia: cutaneous, metabolic and hereditary aspects. Bull N Y Acad Med. 1950; 26: 670-85.
- 4) Khachadurian A K. The Inheritance of essential Familial Hypercholesterolemia. Am J Med. 1964; 37: 402-407.
- 5) Brown M S, Goldstein J L. Familial Hypercholesterolemia: Defective Binding of Lipoproteins to Cultured Fibroblasts Associated with Impaired Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity. Proc Nat Acad Sci 1974;71: 788-792.
- 6) Brown M S, Goldstein J L. Receptor-Mediated Control of Cholesterol Metabolism. Science 1976; 191: 150-154.
- 7) Schneider WJ, Goldstein JL, Brown MS. Partial purification and characterization of the low density lipoprotein receptor from bovine adrenal cortex. J Biol Chem. 1980; 255: 11442-11447
- 8) Schneider WJ, Beisiegel U, Goldstein JL, and Brown MS. Purification of the Low Density Lipoprotein Receptor, an Acidic Glycoprotein of 164,000 Molecular Weight. Jour Biol Chem 1982; 257: 2664-2673
- 9) Francke U, Brown M S, Goldstein J L. 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 1984; 81: 2826-2830
- 10) Russell DW, Schneider WJ, Yamamoto T, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL. Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. Cell. 1984 Jun;37(2): 577-585.
- 11) Sudhof T C, Goldstein J L, Brown M S, Russel D W. The LDL Receptor Gene: A Mosaic of Exons Shared with Different Proteins. Science 1985; 228: 815-822.
- 12) Schuster H, Luft FC. Clinical criteria versus DNA diagnosis in heterozygous familial hypercholesterolemia. Editorial. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998; 18: 331-332.

- 13) Gotto A., Pownall H. Familial Hypercholesterolemia. En Gotto A, ed. Manual of Lipids disorders. 3rd Ed. New York: Lippincott Williams and Wilkins; 2003: 225-229.
- 14) Leitersdorf E, Tobin E J, Davignon J and Hobbs HH. Common Low-density Lipoprotein Receptor Mutations in the French Canadian Population. *J. Clin. Invest.* 1990; 85: 1014-1023.
- 15) Lehrman MA, Schneider WJ, Brown MS, Davis CG, Elhammer A, Russell DW, Goldstein JL. The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained in endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1987; 262: 401-410.
- 16) Durst R, Colombo R, Shpitzen S, Ben Avi L, Friedlander Y, Wexler R, Raal F J, Marais D A, Defesche J C, Mandelstam M Y, Kotze M J, Leitersdorf E and Meiner V. Recent Origin and Spread of a Common Lithuanian Mutation, G197del LDLR, Causing Familial Hypercholesterolemia: Positive Selection Is Not Always Necessary to Account for Disease Incidence among Ashkenazi Jews. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 68: 1172-1188.
- 17) Gaffney D, Pullinger CR, O'Reilly DS, Hoff MS, Cameron I, Vass JK, Kulkarni MV, John P. Kane JP, Schumaker V N, Watts JF, Packard CJ. Influence of an asparagine to lysine mutation at amino acid 3516 of apolipoprotein B on low-density lipoprotein receptor binding. *Clin Chim Acta*, 2002, 321: 113-121
- 18) Miserez AR, Muller PY. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation emerged in the Mesolithic ancestors of Celtic peoples?. *Atherosclerosis*, 2000; 148: 433-436.
- 19) Hegele RA. Monogenic Dyslipidemias: Window on Determinants of Plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 69: 1161-1177.
- 20) Dalya Marks a, Margaret Thorogood a, H. Andrew W. Neil b, Steve E. Humphries A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2003; 168: 1-14
- 21) Dedoussis G. V. Z., Skoumas J., Pitsavos C., Choumerianou D.M., Genschel J., Schmidt H., Stefanadis C. FH clinical phenotype in Greek patients with LDL-R defective vs. negative mutations. *Eur J Clin Invest*, 2004; 34: 402-409.
- 22) North CL, Blacklow SC. Evidence that Familial Hypercholesterolemia Mutations of the LDL Receptor Cause Limited Local Misfolding in an LDL-A Module Pair. *Biochemistry*, 2000; 39: 13127-13135.
- 23) Bertolini S, Calandra S, Heath KE. The World-Wide spectrum of LDL receptor gene mutations in patients with familial hypercholesterolemia (FH). *Atherosclerosis*, 1999; 145 (supp 1): S2.

- 24) Villéger L, Abifabdel M, Allard D, Rabès JP, Thiart R, Kotze M J, Bérout Ch, Junien C, Boileau C and Varret M. The UMD-LDLR Database: Additions to the Software and 490 New Entries to the Database) *Hum Mutat*, 2002; 20: 81–87.
- 25) Defesche JC, Kastelein JJ: Molecular epidemiology of familial hypercholesterolaemia. *The Lancet*, 1998; 352: 1643-1644.
- 26) Wilson DJ, et al. A world web site for low-density lipoprotein receptor gene mutations in familial hypercholesterolemia: Sequence-based tabular, and direct submission data handling. *Am J Cardiol*, 1998; 81: 1509-1511.
- 27) Gómez FJ, Aguilar CA: Hipercolesterolemia familiar. En Posadas C: *Dislipidemias y Aterosclerosis*. 1ª. Edición, México, Interamericana-McGraw Hill, 1995: 91
- 28) Fisher E, Scharnagl H, Hoffmann M M, Kusterer K, Wittmann D, Wieland H, Gross W and März W. Receptor-binding region: Detection of apo B-100 (Arg 3500 3Trp) Associated with Two New Haplotypes and Evidence That apo B-100 (Glu 3405 3Gln) Diminishes Receptor-mediated Uptake of LDL. *Clin Chem*, 1999; 45: 1026-1038.
- 29) Borén J, Ekström U, Ågren B, Nilsson-Ehle P, and Innerarity TL. The Molecular Mechanism for the Genetic Disorder Familial Defective Apolipoprotein B100. *Jour Biol Chem*, 2001, 276: 9214–9218.
- 30) Hartmut H, Schmidt J, et al: 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: 2167-2174.
- 31) Pullinger CR, Hennessy LK, Chatterton JE, Lui W, Love JA, Mendel CM y Cols. Familial Ligand-Defective Apolipoprotein B. *J. Clin Invest*. 1995, 95: 1125-1134.
- 32) Davignon J, Genest J. Genetics of Lipoprotein Disorders. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 27: 521-550.
- 33) Mamotte CD, van Bockxmeer FM. A Robust Strategy for Screening and Confirmation of Familial Defective Apolipoprotein B-100. *Clin Chem*, 1993; 39: 118-121.
- 34) Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr P, Nordestgaard BG. Association of Mutations in the Apolipoprotein B Gene with Hypercholesterolemia and the Risk os Isquemic Heart Disease. *N Engl J Med*, 1998; 338: 1577-1584.
- 35) Pullinger CR, Love JA, Liu W, Hennessy LK, Ghassemzadeh M, Newcomb KC, Illingworth DR, Kane JP. The apolipoprotein B Q3405E polymorphism has no effect on its low-density-lipoprotein receptor binding affinity. *Hum Genet*, 1996; 98: 678-680.

- 36) 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*, 1987; 84: 1919-1922.
- 37) Koivisto U M, Tórtola H, Aalto-Setälä K, Top B, Franss R R, Kovanen P T, Syvänen A C and Kontula K. The Familial Hypercholesterolemia (FH)-North Karelia Mutation of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Deletes Seven Nucleotides of Exon 6 and Is a Common Cause of FH in Finland. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 219-228.
- 38) Lee W. K, Haddad L, Macleod M. J, Dorrance A. M, Wilson D. J, Gaffney D, Dominiczak M H, Packard C. J, Day I. N, Humphries S. E, Dominiczak A. F. Identification of a common low density lipoprotein receptor mutation (C163Y) in the West of Scotland. *J. Med. Genet.* 1998; 35: 573-578.
- 39) Humphries SE, et al: Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia: a non LDLR, non-apo B Kindred. *Atherosclerosis*, 1998; 140: 380-381.
- 40) Mak YT, et al: Mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in chinese familial hypercholesterolemia patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998; 18: 1600-1605.
- 41) Fascetti V, et al. Clinical comparison between LDL-R gene mutations which cause no receptor synthesis or truncated receptors and LDL-R gene missense mutations. *Atherosclerosis*, 1999; 145 (supp 1): S3.
- 42) Hunt SC, Hopkins PN, Bulka K, McDermott MT, Thorne TL, Wardell BB, Bowen BR, Ballinger DG, Skolnick MH and Samuels ME. Genetic Localization to Chromosome 1p32 of the Third Locus for Familial Hypercholesterolemia in a Utah Kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20: 1089-1093.
- 43) Canizales-Quinteros S, Aguilar-Salinas CA, Reyes-Rodriguez E, Riba L, Cox NJ, Bell GI, Tusié-Luna MT, et al. Locus on Chromosome 6p Linked to Elevated HDL Cholesterol Serum Levels and to Protection Against Premature Atherosclerosis in a Kindred With Familial Hypercholesterolemia. *Circ Res*, 2003;92: 569-576.
- 44) Varret M, Rabes JP, Saint-Jore B, Cenarro A, Boileau C, et al. A Third Major Locus for Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Maps to 1p34.1-p32. *Am J. Hum Genet*, 1999; 64: 1378-1387.
- 45) Marks D, Wonderling D, Thorogood M, Lambert H, Humphries S E, Neil H A W. Cost effectiveness analysis of different approaches of screening for familial hypercholesterolaemia. *BMJ* 2002; 324: 1303-1308.
- 46) Williams RR, Schumacher C, Barlow GK, Hunt SC, Ware JL, Pratt M, Latham BD. Documented Need for More Effective Diagnosis and Treatment of Familial

Hypercholesterolemia According to Data from 502 Heterozygotes in Utah. *Am J Cardiol*, 1993; 72: 18D-24D.

47) Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, Hopkins PN. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol*. 1993;72: 171-176.

48) Ose L. Diagnostic, clinical, and therapeutic aspects of familial hypercholesterolemia in children. *Semin Vasc Med*, 2004, 4: 51-57.

49) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-2497.

50) Civeira F. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Atherosclerosis* 2004; 173: 55-68

51) Hiroshi Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, Kajinami K, Miyamoto S, Ueda K, Takegoshi T. The Hokuriku-FH-LDL-Apheresis Study Group. Long-Term Efficacy of Low-Density Lipoprotein Apheresis on Coronary Heart Disease in Familial Hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 1998;82: 1495-1489.

52) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative centrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.

53) Rosenthal N. Tools of the trade-recombinant DNA. *N Engl J Med*, 1994; 331: 315-317.

54) Sambrook Joseph, Russell David. *En Molecular cloning a laboratory manual*. Vol 2. Third edition, New York. Ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 13.49-13.55.

55) Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular Genetics of the LDL Receptor Gene in Familial Hypercholesterolemia. *Human Mutation*, 1992; 1: 445-466.

56) Rosenthal N. Fine structure of a gene-DNA sequencing. *N Engl J Med*, 1995; 332: 589-591.

57) Bujo H, Takahashi K, Saito Y, Maruyama T, Yamashita S, Matsuzawa Y, Ishibashi S, Shionoiri F, Yamada N, Kita T. Clinical features of familial hypercholesterolemia in Japan in a database from 1996-1998 by the research committee of the ministry of health, labour and welfare of Japan. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11(3): 146-51.

- 58) Cenarro A, Jensen H.K, Casao E, Civeira F, González-Bonillo J, Rodríguez-Rey J C, Gregersen N, Pocovi M. Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Spanish patients with familial hypercholesterolemia. *Hum Mut.* 1998; 11: 413
- 59) Robles-Orsorio L, Ordoñez ML, Aguilar-Salinas CA, Aurón-Gómez M, Tusié-Luna MT, Gómez-Pérez FJ, Rull-Rodrigo JA. Familial Hypercholesterolemia Due to Ligand-Defective Apolipoprotein B100. First Case Report in a Mexican Family. *Arch Med Res*, 2003; 34: 70-75.
- 60) Aalto-Setälä, K., E. Helve, P. T. Kovanen, and K. Kontula. Finnish type of low density lipoprotein receptor gene mutation (FH-Helsinki) deletes exons encoding the carboxy-terminal part of the receptor and creates an internalization-defective phenotype. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 499-505.
- 61) Garcia-Garcia AB, Real JT, Puig O, Cebolla E, Marin-Garcia P, Martinez JI, Garcia-Sogo M, Civera M, Ascaso JF, Carmena R, Armengod ME and Chaves FJ. Molecular Genetics of Familial Hypercholesterolemia in Spain: Ten Novel LDLR Mutations and Population Analysis. *Hum Mut*, 2001, on line version: 1-7
- 62) Mozas P, Castillo S, Tejedor D, Reyes G, Alonso R, Franco M, Saenz P, Fuentes F, Almagro F, Mata P, and Pocovi M. Molecular Characterization of Familial Hypercholesterolemia in Spain: Identification of 39 Novel and 77 Recurrent Mutations in LDLR. *Hum Mut.* 2004, 24: 187
- 63) Salazar L A, Hirata M H, Cavalli S A, Nakandakare E R, Forti N Diament J, Giannini S D, Bertolami M C, Hirata R D C. Molecular Basis of Familial Hypercholesterolemia in Brazil: Identification of Seven Novel LDLR Gene Mutations. *Hum Mutat.* 2002; 19: 462-463.
- 64) Wang J, Huff E, Janecka L and Hegele RA. Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Gene Mutations in Canadian Subjects With Familial Hypercholesterolemia. *Hum Mut.* 2001, mutation in brief #451, online publication: 1-4.
- 65) Haddad L, Day I, Hunt S, Williams RR, Humphries SE, Hopkins P. Evidence for a third genetic locus causing familial hypercholesterolemia: a non-LDLR, non-APOB kindred. *J Lipid Res* 1999; 40: 1113-1122
- 66) Ciccarese M, Pacifico A, Tonolo G, Pintus P, Nikoshkov A, Zuliani G, Fellin R, Luthman H, Maioli M. A new locus for autosomal recessive hypercholesterolemia maps to chromosome 15q25-q26. *Am J Hum Genet.* 2000; 66: 453-460.
- 67) Abifadel M, Varret M, Rabès J P, Allard D, Auquier K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erilich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Gen* 2003; 34: 154-156.

- 68) Neil H A W, Hammond T, Huxley R, Matthews D R, Humphries S E. Extent of underdiagnosis of familial hypercholesterolaemia in routine practice: prospective registry study. *BMJ* 2000; 321: 148
- 69) Slack J. Risks of ischaemic heart-disease in familial hyperlipoproteinaemic states. *Lancet*. 1969; 2: 1380-1382
- 70) Stone NJ, Levy RI, Fredrickson DS, Verter J. Coronary artery disease in 116 kindred with familial type II hyperlipoproteinemia. *Circulation*. 1974; 49: 476-488.

ANEXO 1
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Búsqueda de mutaciones en el receptor de LDL y apolipoproteína B100 en
sujetos con hipercolesterolemia familiar en población mexicana.

INTRODUCCION: La siguiente información describe el protocolo y su papel como participante. El investigador contestará cualquier pregunta sobre ésta forma de estudio.

PROPOSITO DEL ESTUDIO: El propósito del estudio es conocer el tipo de mutaciones genéticas existentes en pacientes mexicanos con Hipercolesterolemia Familiar como es su caso.

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR: Su participación en el estudio incluye la realización de una prueba que consiste en la toma de una muestra de sangre venosa, mediante una punción en vena periférica. No requiere preparación previa. Posteriormente se realizarán los procedimientos de laboratorio para buscar la mutación existente. La muestra de sangre únicamente será empleada con este fin.

MOLESTIAS POR SU PARTICIPACION: Deberá asistir en una ocasión para la toma de muestra, lo cual implica una punción en una vena periférica y una entrevista con el investigador.

BENEFICIO PARA LOS PARTICIPANTES: Se le informará sobre la existencia de la mutación presupuesta clínicamente. El participante no obtendrá beneficio directo. Los exámenes no tendrán 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 ésta investigación.

PARTICIPACION VOLUNTARIA:

Yo _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en éste estudio. Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que lo desee. 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 consumo de medicamentos, suspensión o inicio de algún hábito (ej. tabaquismo) o cambio de domicilio.

He comprendido el contenido de ésta carta de consentimiento, mis dudas han sido resueltas y voluntariamente apto participar en éste estudio.

Firma del investigador y fecha
Tel 55 73 12 00 Ext. 2405-7

Firma del paciente y fecha

Firma de testigo

Firma de testigo

ANEXO 2

HOJA DE CAPTURA DE DATOS

Nombre: Registro:
Fecha: Edad: Sexo: F (1) M (2) Teléfono:
Lugar y fecha de Nacimiento:
Domicilio actual:

ANTECEDENTES FAMILIARES

Ascendencia proveniente de:

Familiares afectados por HF:

Se elaboró árbol genealógico: Si No

HISTORIAL

Fecha de diagnóstico: Edad al diagnóstico:
Peso: Talla: IMC: Diámetro cintura Cadera Índice
C/C
TA:

Enfermedades concomitantes y fecha de diagnóstico:

Alcoholismo Si No Hipotiroidismo Si No Síndrome Nefrótico Si No
Utiliza estrógenos: Si No

MANIFESTACIONES DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

¿Tiene o tuvo xantomas? Si No Edad en que aparecieron

Tiene o tuvo arco corneal Si No

Enfermedad arterial coronaria: Si No Manifestaciones

Manifestaciones de aterosclerosis en otros niveles

Se le ha realizado estudio de gabinete para confirmación, especificarlo y resultados

Tipo de tratamiento y tiempo que lo ha utilizado

Apego al tratamiento: excelente bueno regular malo

Recibe algún fármaco no relacionado con hipercolesterolemia:

TSH: _____ Fecha

Glucosa: _____ Fecha

Niveles colesterol al diagnóstico: Total mg/dl LDL mg/dl HDL mg/dl TG mg/dl

CURVA DE LIPIDOS DURANTE EL TRATAMIENTO

F:	F:	F:	F:	F:	F:	F:	F:
CT	LDL	HDL	TG	CT	LDL	HDL	TG
F:	F:	F:	F:	F:	F:	F:	F:
CT	LDL	HDL	TG	CT	LDL	HDL	TG
F:	F:	F:	F:	F:	F:	F:	F:
CT	LDL	HDL	TG	CT	LDL	HDL	TG

REGISTRO DE DIETA DE LOS ULTIMOS 2 DIAS

Desayuno _____ Comida _____ Cena _____

Desayuno _____ Comida _____ Cena _____

ANEXO 3 (Con color verde se señala el sitio de mutación y arriba la base que lo sustituye)

SECUENCIA CODIFICANTE DEL GEN DEL RECEPTOR DE LDL

Los números de base están escritos arriba de la secuencia.

Los números de codón están escritos abajo de la secuencia.

- ✓ El primer número corresponde a la nomenclatura de Yamamoto (con números negativos corresponden a los codones del exón 1 (péptido señal) los cuales son escindidos antes de tener el RLDL funcional).
- ✓ El segundo número corresponde a la nomenclatura de la base de datos del RLDL.

```

Exon 1
1          A          31
ATG GGG CCC TGG GGC TGG AAA TTG CGC TGG ACC GTC GCC TTG CTC CTC GCC GCG GCG GGG
Met gly pro trp gly trp lys leu arg trp thr val ala leu leu leu ala ala ala gly
-21/1          -11/11

          Exon 2
61          89          91
ACT GCA GTG GGC GAC AGA TGT GAA AGA AAC GAG TTC CAG TGC CAA GAC GGG AAA TGC ATC
thr ala val gly asp arg cys glu arg asn glu phe gln cys gln asp gly lys cys ile
-1/21          10/31

121          151
TCC TAC AAG TGG GTC TGC GAT GGC AGC GCT GAG TGC CAG GAT GGC TCT GAT GAG TCC CAG
ser tyr lys trp val cys asp gly ser ala glu cys gln asp gly ser asp glu ser gln
20/41          30/51

          Exon 3
181          191          211
GAG ACG TGC TTG TCT GTC ACC TGC AAA TCC GGG GAC TTC AGC TGT GGG GGC CGT GTC AAC
glu thr cys leu ser val thr cys lys ser gly asp phe ser cys gly gly arg val asn
40/61          50/71

241          271
CGC TGC ATT CCT CAG TTC TGG AGG TGC GAT GGC CAA GTG GAC TGC GAC AAC GGC TCA GAC
arg cys ile pro gln phe trp arg cys asp gly gln val asp cys asp asn gly ser asp
60/81          70/91

          Exon 4
A          C          InsG
301          314          C          331
GAG CAA GGC TGT CCC CCC AAG ACG TGC TCC CAG GAC GAG TTT CGC TGC CAC GAT GGG AAG
glu gln gly cys pro pro lys thr cys ser gln asp glu phe arg cys his asp gly lys
80/101          90/111

361          391
TGC ATC TCT CGG CAG TTC GTC TGT GAC TCA GAC CGG GAC TGC TTG GAC GGC TCA GAC GAG
cys ile ser arg gln phe val cys asp ser asp arg asp cys leu asp gly ser asp glu
100/121          110/131

```

421 451
GCC TCC TGC CCG GTG CTC ACC TGT GGT CCC GCC AGC TTC CAG TGC AAC AGC TCC ACC TGC
ala ser cys pro val leu thr cys gly pro ala ser phe gln cys asn ser ser thr cys
120/141 130/151

481 511
ATC CCC CAG CTG TGG GCC TGC GAC AAC GAC CCC GAC TGC GAA GAT GGC TCG GAT GAG TGG
ile pro gln leu trp ala cys asp asn asp pro asp cys glu asp gly ser asp glu trp
140/161 150/171

541 571
CCG CAG CGC TGT AGG GGT CTT TAC GTG TTC CAA GGG GAC AGT AGC CCC TGC TCG GCC TTC
pro gln arg cys arg gly leu tyr val phe gln gly asp ser ser pro cys ser ala phe
160/181 170/191

601 631
GAG TTC CAC TGC CTA AGT GGC GAG TGC ATC CAC TCC AGC TGG CGC TGT GAT GGT GGC CCC
glu phe his cys leu ser gly glu cys ile his ser ser trp arg cys asp gly gly pro
180/201 190/211

Exon 5

661 691 695
GAC TGC AAG GAC AAA TCT GAC GAG GAA AAC TGC GCT GTG GCC ACC TGT CGC CCT GAC GAA
asp cys lys asp lys ser asp glu glu asn cys ala val ala thr cys arg pro asp glu
200/221 210/231

721 751
TTC CAG TGC TCT GAT GGA AAC TGC ATC CAT GGC AGC CGG CAG TGT GAC CGG GAA TAT GAC
phe gln cys ser asp gly asn cys ile his gly ser arg gln cys asp arg glu tyr asp
220/241 230/251

Exon 6

781 811 818
TGC AAG GAC ATG AGC GAT GAA GTT GGC TGC GTT AAT GTC ACA CTC TGC AG GGA CCC AAC
cys lys asp met ser asp glu val gly cys val asn val thr leu cys glu gly pro asn
240/261 250/271

841 871
AAG TTC AAG TGT CAC AGC GGC GAA GC ATC ACC CTG GAC AAA GTC TGC AAC ATG GCT AGA
lys phe lys cys his ser gly glu cys ile thr leu asp lys val cys asn met ala arg
260/281 270/291

Exon 7

901 931 941
GAC TGC CGG GAC TGG TCA GAT GAA CCC ATC AAA GAG TGC GGG ACC AAC GAA TGC TTG GAC
asp cys arg asp trp ser asp glu pro ile lys glu cys gly thr asn glu cys leu asp
280/301 290/311

961 991
AAC AAC GGC GGC TGT TCC CAC GTC TGC AAT GAC CTT AAG ATC GGC TAC GAG TGC CTG TGC
asn asn gly gly cys ser his val cys asn asp leu lys ile gly tyr glu cys leu cys
300/321 310/331

Exon 8

1021 1051 1061
CCC GAC GGC TTC CAG CTG GTG GCC CAG CGA AGA TGC GAA GAT ATC GAT GAG TGT CAG GAT
pro asp gly phe gln leu val ala gln arg arg cys glu asp ile asp glu cys gln asp
320/341 330/351

1081

CCC GAC ACC TGC AGC CAG CTC TGC GTG AAG CTG GAG GGT GGC TAC AAG TGC CAG TGT GAG
pro asp thr cys ser gln leu cys val asn leu glu gly gly tyr lys cys gln cys glu
340/361 350/371

1111

Exon 9

1141

GAA GGC TTC CAG CTG GAC CCC CAC ACG AAG GCC TGC AAG GCT GTG GGC TCC ATC GCC TAC
glu gly phe gln leu asp pro his thr lys ala cys lys ala val gly ser ile ala tyr
360/381 370/391

1171

1187

1201

CTC TTC TTC ACC AAC CGG CAC GAG GTC AGG AAG ATG ACG CTG GAC CGG AGC GAG TAC ACC
leu phe phe thr asn arg his glu val arg lys met thr leu asp arg ser glu tyr thr
390/401 390/411

1231

1261

AGC CTC ATC CCC AAC CTG AGG AAC GTG GTC GCT CTG GAC ACG GAG GTG GCC AGC AAT AGA
ser leu ile pro asn leu arg asn val val ala leu asp thr glu val ala ser asn arg
400/421 410/431

1291

Exon 10

1321

ATC TAC TGG TCT GAC CTG TCC CAG AGA ATG ATC TGC AGC ACC CAG CTT GAC AGA GCC CAC
ile tyr trp ser asp leu ser gln arg met ile cys ser thr gln leu asp arg ala his
420/441 430/451

1351

1359

1381

GGC GTC TCT TCC TAT GAC ACC GTC ATC AGC AGG GAC ATC CAG GCC CCC GAC GGG CTG GCT
gly val ser ser tyr asp thr val ile ser arg asp ile gln ala pro asp gly leu ala
440/461 450/471

1411

1441

GTG GAC TGG ATC CAC AGC AAC ATC TAC TGG ACC GAC TCT GTC CTG GGC ACT GTC TCT GTT
val asp trp ile his ser asn ile tyr trp thr asp ser val leu gly thr val ser val
460/481 470/491

1471

1501

CCG GAT ACC AAG GGC GTG AAG AGG AAA ACG TTA TTC AGG GAG AAC GGC TCC AAG CCA AGG
ala asp thr lys gly val lys arg lys thr leu phe arg glu asn gly ser lys pro arg
480/501 490/511

1531

Exon 11

1561

CCG ATC GTG GTG GAT CCT GTT CAT GGC TTC ATG TAC TGG ACT GAC TGG GGA ACT CCC GCC
ala ile val val asp pro val his gly phe met tyr trp thr asp trp gly thr pro ala
500/521 510/531

1587

1591

1621

AAG ATC AAG AAA GGG GGC CTG AAT GGT GTG GAC ATC TAC TCG CTG GTG ACT GAA AAC ATT
lys ile lys lys gly gly leu asn gly val asp ile tyr ser leu val thr glu asn ile
520/541 530/551

1651

Exon 12

1681

CAG TGG CCC AAT GGC ATC ACC CTA GAT CTC CTC AGT GGC CGC CTC TAC TGG GTT GAC TCC
gln trp pro asn gly ile thr leu asp leu leu ser gly arg leu tyr trp val asp ser
540/561 550/571

1706

1711

1741 1771
AAA CTT CAC TCC ATC TCA AGC ATC GAT GTC AAT GGG GGC AAC CCG AAG ACC ATC TTG GAG
lys leu his ser ile ser ser ile asp val asn gly gly asn arg lys thr ile leu glu
560/581 570/591

Exon 13

1801 1831 1846
GAT GAA AAG AGG CTG GCC CAC CCC TTC TCC TTG GCC GTC TTT GAG GAC AAA GTA TTT TGG
asp glu lys arg leu ala his pro phe ser leu ala val phe glu asp lys val phe trp
580/601 590/611

1861 1891
ACA GAT ATC ATC AAC GAA GCC ATT TTC AGT GCC AAC CGC CTC ACA GGT TCC GAT GTC AAC
thr asp ile ile asn glu ala ile phe ser ala asn arg leu thr gly ser asp val asn
600/621 610/631

1921 1951
TTG TTG GCT GAA AAC CTA CTG TCC CCA GAG GAT ATG GTC CTC TTC CAC AAC CTC ACC CAG
leu leu ala glu asn leu leu ser pro glu asp met val leu phe his asn leu thr gln
620/641 630/651

Exon 14

1981 1988 2011
CCA AGA GGA GTG AAC TGG TGT GAG AGG ACC ACC CTG AGC AAT GGC GGC TGC CAG TAT CTG
pro arg gly val asn trp cys glu arg thr thr leu ser asn gly gly cys gln tyr leu
640/661 650/671

2041 2071
TGC CTC CCT GCC CCG CAG ATC AAC CCC CAC TCG CCC AAG TTT ACC TGC GCC TGC CCG GAC
cys leu pro ala pro gln ile asn pro his ser pro lys phe thr cys ala cys pro asp
660/681 670/691

Exon 15

2101 2131 2141
GGC ATG CTG CTG GCC AGG GAC ATG AGG AGC TGC CTC ACA AG GCT GAG GCT GCA GTG GCC
gly met leu leu ala arg asp met arg ser cys leu thr glu ala glu ala ala val ala
680/701 690/711

2161 2191
ACC CAG GAG ACA TCC ACC GTC AGG CTA AAG GTC AGC TCC ACA GCC GTA AGG ACA GAG CAC
thr gln glu thr ser thr val arg leu lys val ser ser thr ala val arg thr gln his
700/721 710/731

2221 2251
ACA ACC ACC CGG CCT GTT CCC GAC ACC TCC CGG CTG CCT GGG GCC ACC CCT GGG CTC ACC
thr thr thr arg pro val pro asp thr ser arg leu pro gly ala thr pro gly leu thr
720/741 730/751

Exon 16

2281 2312
ACG GTG GAG ATA GTG ACA ATG TCT CAC CAA GCT CTG GGC GAC GTT GCT GGC AGA GGA AAT
thr val glu ile val thr met ser his gln ala leu gly asp val ala gly arg gly asn
740/761 750/771

Exon 17

2341 2371 2390
GAG AAG AAG CCC AGT AGC GTG AGG GCT CTG TCC ATT GTC CTC CCC ATC TG CTC CTC GTC
glu lys lys pro ser ser val arg ala leu ser ile val leu pro ile val leu leu val

760/781

770/791

2401

TTC CTT TGC CTG GGG GTC TTC CTT CTA TGG AAG AAC TGG CGG CTT AAG AAC ATC AAC AGC
phe leu cys leu gly val phe leu leu trp lys asn trp arg leu lys asn ile asn ser
780/801

2431

790/811

2461

ATC AAC TTT GAC AAC CCC GTC TAT CAG AAG ACC ACA GAG GAT GAG GTC CAC ATT TGC CAC
ile asn phe asp asn pro val tyr gln lys thr thr glu asp glu val his ile cys his
800/821

2491

810/831

Exon 18

2521

2580

AAC CAG GAC GGC TAC AGC TAC CCC TCG AGA CAG ATG GTC AGT CTG GAG GAT GAC GTG GCG
asn gln asp gly tyr ser tyr pro ser arg gln met val ser leu glu asp asp val ala
820/841

2546

830/851

839/860

Tabla 1: Características clínicas de los casos afectados (n=101) con hipercolesterolemia. DE= desviación estándar, n=número de sujetos.

VARIABLE	Frecuencia o Promedio
Género femenino n (%)	81 (80)
Edad (promedio+DE)	48.07 + 16.8
Edad al diagnóstico (promedio+DE)	36.88 + 17.2
IMC (promedio+DE)	24.45 + 3.93
sobrepeso n (%)	10 (9.99)
Obesidad n (%)	5 (4.9)
Tabaquismo n (%)	35 (34.7)
DM tipo 2 n (%)	5 (4.9)
Cardiopatía isquémica u otras manifestaciones de aterosclerosis n (%)	17 (16.8)
Arco corneal n (%)	69 (68.32)
Xantomas tendinosos n (%)	86 (85.15)

Tabla 2 Diferencias del perfil de lípidos entre los casos y los familiares no afectados, el valor de p fue calculado con la prueba de t.

	Total n= 143	Afectados Promedio \pm DE (n=101)	No afectados Promedio \pm DE (n=42)	Valor de p para la diferencia
Colesterol total	292 \pm 131	355 \pm 126	186.5 \pm 35	< 0.000
LDL	213.7 \pm 110	274 \pm 109	115 \pm 26	< 0.000
HDL	48.4 \pm 14	48.1 \pm 13.8	48.7 \pm 15.3	0.83
Triglicéridos	133 \pm 70	144.5 \pm 59	115.7 \pm 56.3	<0.015

Tabla 3 Diferencias en el perfil de lípidos entre pacientes Hipercolesterolémicos que se les encontró o no mutación

Variable	Total Casos con/sin Mutación	Casos con Mutación N=47	Casos sin Mutación N=54	Prueba de t
Colesterol total (mg/dL)	355.7 \pm 13.06	382 \pm 26.2	320 \pm 16.4	0.049
Colesterol LDL (mg/dL)	274.8 \pm 11.9	289.6 \pm 22.4	250.8 \pm 15.8	0.165
Colesterol HDL (mg/dL)	48.7 \pm 13.8	45.3 \pm 10.8	48.65 \pm 14.5	0.255
Triglicéridos (mg/dL)	144.4 \pm 8.9	144.46 \pm 108	128.84 \pm 48	0.422

Tabla 4 Diferencias del perfil de lípidos entre el género femenino y masculino, el valor de p fue calculado con la prueba de t.

	Femenino Promedio + DE	Masculino Promedio + DE	Valor de p para la diferencia
Edad	46.9 + 16.7	42.9 + 21.3	0.46
IMC	24 + 3.7	25.6 + 2.5	0.19
Colesterol Total	362 + 94.2	338.8 + 67.7	0.42
Colesterol LDL	275 + 60	283.8 + 64.5	0.68
Colesterol HDL	50 + 15	44.2 + 12.3	0.20
Triglicéridos	135.4 + 57	141.4 + 68.3	0.75

Tabla 5: Eficiencia diagnóstica con los criterios de MED PED. En relación con el diagnóstico genotípico. Tomando en cuenta los familiares de los casos con ligamiento al marcador del RLDL

		MUTACION			
		SI	NO		
DIAGNOSTICO POR CRITERIOS DE MED PED	SI	31 (48.44%)	3 (4.69%)	34 (53.12%)	VPP= 0.91
	NO	8 (12.5%)	22 (34.37%)	30 (46.88%)	
		39 (60.94%)	25 (39.06%)	64	VPN= 0.73
		Sensibilidad .795	Especificidad .88		

$$RV+: \frac{S}{1-E} = 6.625$$

$$RV-: \frac{1-S}{E} = 0.23 \quad \text{Prueba aportativa}$$

Valor de acuerdo de Kappa 0.65 (acuerdo bueno o considerable)

Tabla 6A: Mutaciones encontradas y reporte previo en otras poblaciones. En la columna referente al aminoácido afectado entre paréntesis se reporta la nomenclatura de Yamamoto. Ins= inserción, Fs=frameshift (cambio en el marco de lectura)

LOCALIZACION	CAMBIO DE NUCLEOTIDO	AMINO-ACIDO AFECTADO	EFFECTO EN LA PROTEINA	NUMERO TOTAL CON MUTACION	FAMILIAS AFECTADAS	OTRAS POBLACIONES
Exón 1 (secuencia señal)	12 G>A	W4X (W-18X)	Trp > paro	4	2	Españoles, Ingleses, Colombianos
Exón 3	301 G>A	E101K (E80K)	Glu > Lys	3	2	Norteamericanos, Ingleses, Franceses, Españoles, Alemanes Irlandeses.
Exón 4	337-338 ins G	E92FsX (337insG)	Glu > paro	9	4	Nueva
Exón 4	325 T>C	C109R (C88R)	Cys > Arg	3	1	Alemanes
Exón 4	552 T>C	C184W (C163W)	Cys > Trp	2	1	Nueva
Exón 6	829 G>C	E277K (E256K)	Glu > Lys	6	2	Nueva.
Exón 6	865 T>C	C289R (C268R)	Cys > Arg	2	1	Nueva

Tabla 6B: Mutaciones encontradas y reporte previo en otras poblaciones. En la columna referente al aminoácido afectado entre paréntesis se reporta la nomenclatura de Yamamoto. Ins= inserción, del=delección, Fs=frameshift (cambio en el marco de lectura)

LOCALIZACIÓN	CAMBIO DE NUCLEOTIDO	AMINO-ACIDO AFECTADO	EFEECTO EN LA PROTEINA	NUMERO TOTAL CON MUTACION	FAMILIAS AFECTADAS	OTRAS POBLACIONES
Exón 8	1090 T>C	C364R (C343R)	Cys > Arg	1	1	Italiana, Mexicana, Norteamericana
Exón 8	1103 G>A	C368Y (C347Y)	Cys > Tyr	1	1	Francesa
Exón 15	2141 de C	E714Fs (E693Fs) (2141 del 1C)	Corrimiento en el marco de lectura	1	1	Nueva
Exón 15	2215 C>T	Q739X (Q718X)	Gln > paro	2	1	Nueva
Exón 15	2271 de T	(P736Fs) 2271 del T	Corrimiento en el marco de lectura	2	1	Nueva
Exón 16	2390 G>A	V797M (V776M)	Val > Met	4	1	Nueva; 2389 G>A Sudafricanos. Cubanos. Chinos
Total				40		

Tabla 6C: Representa las diferentes mutaciones encontradas y el dominio que afectan.

Dominio	Mutaciones (Nomenclatura de Yamamoto)	Función del dominio afectado
Exón 1 Péptido señal	W-18X	Péptido señal
Exón 3 Unión al ligando	E80K	
Exón 4 Unión al ligando	E92FsX, C88R, C163W,	Unión del receptor al ligando (ApoB100)
Exón 6 Unión al ligando	E256K, C268R	
Exón 8 Homologo del precursor FCE	C343R, C347Y	Disociación complejo proteína-receptor (reciclaje)
Exón 15 Codifica 58 aminoácidos ricos en serina y treonina	E693Fs, Q718X, P736Fs,	Desconocida
Exón 16 Dominio transmembrana	V776M	Anclaje del receptor a la membrana citoplásmica.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 7: Polimorfismos encontrados, por región y reporte en otras poblaciones.

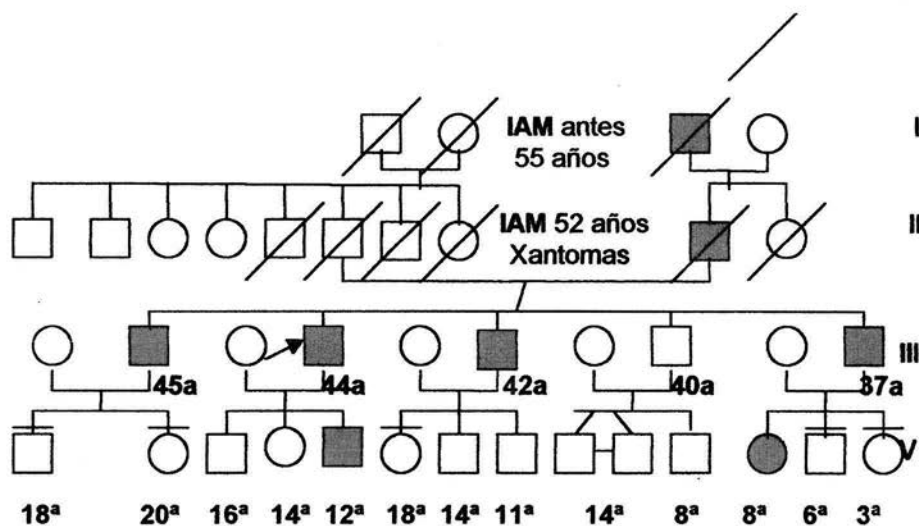
LOCALIZACION	CAMBIO DE NUCLEOTIDO	NUMERO TOTAL DE CASOS CON POLIMORFISMO	FAMILIAS AFECTADAS	REPORTE PREVIO EN OTRA POBLACION
Exón 1	24 A>G	2	2	Nuevo
Exón 8	1185 3G>C	4	2	Nuevo
Exón 10	1413 G>A	43	27	Wamich et al, 1992. Etnicidad desconocida
Exón 12	1773 T>C	12	11	Espanoles, Brasileños, Alemanes, Ingleses, Suizos, Israelies, Caucásicos
Exón 12	1725 C<T	6	6	Yamakawa-Kobayashi et al. 1993. Etnicidad desconocida, Brasil
Exón 15	2232 G>A	8	6	Brasil (Salazar L.A. et al 2002)

Tabla 8: Cambios intrónicos encontrados

LOCALIZACION	CAMBIO DE NUCLEOTIDO	NUMERO DE CASOS CON EL CAMBIO	FAMILIAS AFECTADAS	REPORTE PREVIO EN OTRA POBLACION
Intrón 1	67+18 C>A	2	2	Nuevo
Intrón 7	1060+10 G>C	3	2	Danés (Jansen et, al, 1994)
Intrón 17	2548-42G>A	3	3	Nuevo
Intrón 17	2548-80A>G	5	3	Nuevo
Intrón 18	2580+22 G>A	1	1	Nuevo

Figura 5: Arbol Genealógico

Número de Generación



- Masculino fallecido No afectado
- Masculino fallecido Afectado
- Masculino vivo afectado
- Caso índice

- Femenino viva afectada
- Femenino fallecida afectada
- Femenino fallecida no afectada
- Femenino se ignora si está afectada
- Masculino se ignora si está

afectado

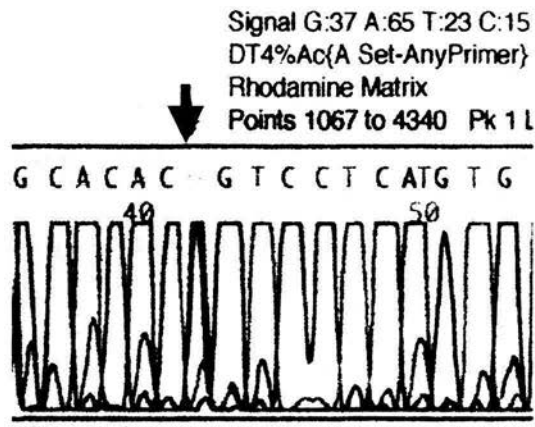


Figura 6: Secuencia del gen de apoB100 en el caso índice, la flecha destaca el sitio de la mutación, que corresponde a la base 10699, se puede apreciar un pico tanto para Adenosina como para Guanosina, lo cual indica se trata de una mutación heterocigota

Tabla 9: Niveles de lípidos de los miembros de la familia estudiados, la primera columna corresponde al número de cada miembro en el gel de electroforesis y la segunda columna al número en el árbol genealógico presentado arriba. El asterisco denota el caso índice

	Número	Colesterol total	Triglicéridos	HDL	LDL	Glucosa
0	II-10	238	94	70	149	70
1	III-2	251	68	49	188	76
2	III-4 *	251	93	50	182	86
3	III-10	247	78	45	186	82
4	III-8	206	191	56	112	78
5	IV-4	149	96	53	77	69
6	IV-3	159	154	43	85	71
7	IV-5	256	91	49	189	75
8	IV-7	158	62	33	113	90
9	IV-8	155	206	36	77.8	78
10	IV-9	150	78	44	90	83
11	IV-10	168	70	49	105	71
12	IV-11	146	70	54	78	78
13	IV-12	210	90	33	159	71

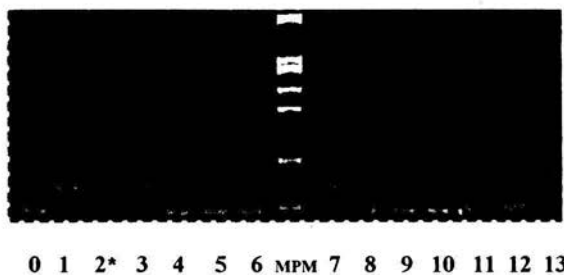


Figura 7: Electroforesis que incluye a todos los miembros estudiados de la familia, los números se corresponden con la primera columna de la tabla de valores de perfil de lípidos, la mutación se encuentra en los casos 1,2,3,7 y 13. El asterisco denota el caso índice.

Tabla 10: Análisis de ligamiento para el RLDL, fue positivo para las familias 1, 5 y 6. El marcador fue D195394

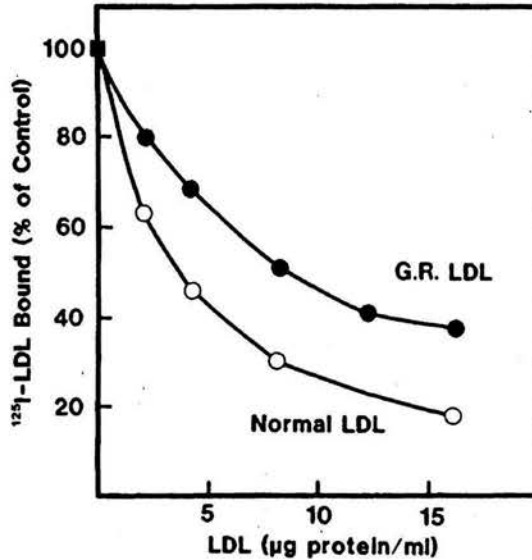
NUMERO DE FAMILIA	LOD score
1	1.158
2	- ∞
3	-0.258
4	-0.299
5	2.10
6	0.957
7	-2.099
8	-2.699
9	0.00
10	- ∞
11	-5.483

Tabla 11: Análisis de ligamiento para el cromosoma 1 región 1p32. No se pudo excluir en las familias 7 y 9. Los marcadores fueron D1S2134 y D1S386.

NUMERO DE FAMILIA	LOD score
1	-4.118
2	-1.161
3	-0.102
4	-2.658
5	0.900
6	-0.454
7	0.308
8	-2.510
9	0.222
10	-2.510
11	-1.451

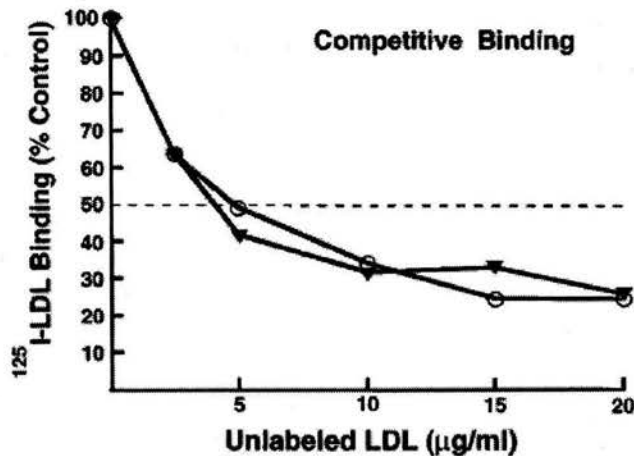
familia encontrada no tiene las características fenotípicas y bioquímicas de los casos de apoB100 defectuosa y existe la posibilidad de que el caso índice tuviera algún otro factor causal de enfermedad cardiovascular temprana, lo cual no fue investigado.

- apoB100 defectuosa
- apoB100 normal



Gráfica 1: Capacidad de unión de la LDL a su receptor en fibroblastos, de un paciente con apoB100 defectuosa debida a la mutación Arg3500Gln comparada contra LDL marcada con 125 I de un paciente sin dislipidemia, la diferencia es de 20%. (Tomada de Innearity 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 1987; 84: 1919-1922) (36).

- ▲ apoB100 Q3405E polymorphism
- △ apoB100 normal



Gráfica 2: Capacidad de unión de la LDL a su receptor en fibroblastos de un paciente con la mutación Glu3405Gln (de forma homocigota) comparada contra LDL marcada con 125 I de un paciente sin dislipidemia, no existe diferencia entre el paciente con el cambio de aminoácido y el normal, por lo que la sustitución en esa posición es considerado un polimorfismo ya que no afecta la función del ligando. (Tomada de referencia: Pullinger CR, et al. The apolipoprotein B Q3405E polymorphism has no effect on its low-density-lipoprotein receptor binding affinity. *Hum Genet*, 1996; 98: 678-680) (35).