

03021
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso
el contenido de mi trabajo receptivo.

NOMBRE: Andrea Sachi
Díaz Villaseñor

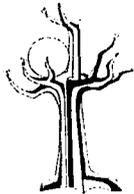
FECHA: 7-marzo-03

FIRMA: [Firma]

GENOTIPIFICACIÓN PARCIAL
DEL RECEPTOR DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA
DENSIDAD (LDLR) EN PACIENTES MEXICANOS CON
HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.

EJEMPLAR UNICO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A:
ANDREA SACHI / DÍAZ VILLASEÑOR



BIOMEDICAS

MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Coordinación de Enseñanza
Facultad de Medicina

Dr. Alejandro Cravioto Quintana
Director de la
Facultad de Medicina
Presente

Por medio del presente le informamos que la tesis: "*Genotipificación parcial del receptor de la Lipoproteína de baja densidad (LDLR) en pacientes mexicanos con Hipercolesterolemia Familiar*" que presenta la alumna: Andrea Sachi Díaz Villaseñor, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado damos nuestro voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente.

Dra. María Teresa Tusié Luna

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dra. Socorro Concepción Durán Vargas

Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet

Dra. Imelda López Villaseñor

Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas

*“La crítica científica se justifica solamente
entregando, a cambio de un error, una verdad”.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dr. Santiago Ramón y Cajal

Premio Nobel de Medicina y Fisiología 1906

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Este trabajo se realizó
bajo la dirección y asesoramiento
de la Dra. Socorro Durán Vargas
en el departamento de
Biología Molecular y Biotecnología
del Instituto de Investigaciones Biomédicas
de la Universidad Nacional Autónoma de México .



El trabajo es parte de una colaboración realizada con:

Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Dr. Carlos Aguilar Salinas

Unidad de Rehabilitación Cardíaca del
Hospital de Cardiología del IMSS Siglo XXI

Dr. Saúl Salinas

Unidad de Biología Molecular del
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Laura Ongay Larios

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología del
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Ma. Teresa Tusíé Luna

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad por ser un pilar lleno de ciencia y conocimientos.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la Facultad de Medicina por dejarme cumplir un sueño, hacer investigación.

A los integrantes de la Coordinación de Enseñanza del Instituto por su tiempo brindado y por su guía. A las secretarías del departamento por su cortesía y ayuda. A Becas Probetel por el apoyo económico recibido durante el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Socorro Durán por su interés, estímulos, retroalimentaciones hacia mi persona y por permitirme ser parte de su grupo de investigación durante un período muy importante de mi vida tanto personal como académica.

A la Dra. Patricia Ostrosky por su gran apoyo incondicional, por su maravillosa calidad humana y por brindarme una invaluable formación académica. También agradezco a todos los miembros de su laboratorio, particularmente por su hospitalidad.

Al jurado por las enriquecedoras observaciones otorgadas a este trabajo.

A la Unidad de Biología Molecular del Inst. de Fisiología Celular; a la Dra. Laura Ongay Laríos y a la Biol. Ma. Guadalupe Codiz Huerta por su gran apoyo técnico y excelente trabajo.

A la Dra. Ma. Elena Flores e integrantes de su laboratorio por su ayuda y préstamo de equipo.

A la Q.F.B. Gisela Du Pont De Lara por sus atenciones, comprensión y soporte técnico dentro del laboratorio.

A Osvaldo por su amabilidad, su dedicación y su estoica labor de mantener el laboratorio en orden.

A Ma. Petra Muñoz y Alfonso Martínez por su ayuda bibliotecaria.

A mis compañeros del laboratorio; Ale, Gisela, Alejandro, Arturo, Toño, Angélica, Martha Osvaldo y Soco, por todas sus enseñanzas y por los momentos que hemos disfrutado juntos.

A Julián y Andrés por compartir conmigo una amistad y ser mis aliados y confidentes científicos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis papás Jorge y Lucila por su cariño y entrega; Mamí gracias por tu dedicación y gran esfuerzo. Pá gracias por apoyarme en ser y hacer lo que amo. A mis hermanas Lucila y Valeria por enseñarme a convivir y a compartir, gracias por haber crecido junto a mí. 🙌📝

A mi abue Sachi por confiar y creer siempre en mí, por su educación y cuidados. Por ser una guía emocional, intelectual y espiritual. Gracias por tu gran enseñanza llena de sabiduría de nunca dejarse derrotar y seguir siempre adelante. Gracias por ser justo así. 🍷👉

A mi tía Rosario, mi tío Salvador, mis primos Marcos y Pamela, a las Berthas, a mis abuelos, a mis papás y hermanas por esos domingos que me enseñaron la importancia del ser, vivir y creer en la familia. 🕯️👪🍷

A mi complemento, a mi mejor amigo, mi novio Vicente. Gracias por tu amor y por tu cariño. Gracias por ser una prioridad en tu vida. Gracias por querer compartir conmigo tus sueños, ilusiones, anhelos y triunfos. Gracias por ser uno mismo. 🧘❤️

A mis amigos del Ciudad, una experiencia inolvidable. Ana, Raquel, y Vicky, mis grandes amigas inseparables. Roberto, aquel amigo oportuno y Yesid, una amiga crucial.

Gracias por ese cariño y todos esos momentos que marcaron nuestras vidas y ahora nos mantienen unidos. 🕒📱😊

A mis amigos Nacho, Gaby, Porfirio y Hugo por su increíble convivencia, por una amistad llena de emociones para compartir, gracias por esas carcajadas que endulzan la vida. 🙌🍷🐕🎵

Y a todas aquellas personas, amigos y familiares que en algún momento han formado parte de mi vida. De cada uno de ustedes he aprendido algo, les agradezco infinitamente. ➡️☆.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dedico este trabajo
a mis abuelos
Salvador Villaseñor[†]
y Sachí Arai
por ser
un gran
ejemplo de vida
a seguir.

"Porque también somos, lo que hemos perdido"
(Anónimo)

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Introducción	
1.- Lípidos y lipoproteínas	3
2.- Metabolismo de la lipoproteína de baja densidad (LDL)	9
3.- Receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDLR)	13
3a.- Los 18 exones del gen <i>ldlr</i>	15
3b.- Regulación y síntesis del receptor LDL	18
4.- Hipercolesterolemia Familiar	21
4a.- Características clínicas de la HF	21
4b.- Tratamiento para la HF	24
4c.- Características epidemiológicas de la HF	25
4d.- Mutaciones causantes de la HF	27
Justificación	32
Objetivo General	35
Objetivos Particulares	35
Material y Métodos	
Pacientes con HF	36
Extracción de ADN genómico	36
Diseño de Oligonucleótidos	37
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
Programa utilizado en el termociclador	39
Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP)	40
Purificación del producto de PCR	42
Secuenciación	42
Análisis de la secuencia	43
Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	43
Resultados	
Exones 14 y 17	44
Exón 6	45
HF1 y HF2 (Familia A)	46
HF3, HF4 y HF5 (Familia B)	49
HF6 y HF7 (Familia C)	50
HF8 (Familia D)	50
Discusión	55
Conclusiones	65
Perspectivas	67
Bibliografía	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Metabolismo del colesterol.	4
Figura 2.- Metabolismo de lípidos.	8
Figura 3.- Gen del receptor de la LDL (<i>ldlr</i>).	13
Figura 4.- Receptor de la LDL.	14
Figura 5.- Características clínicas de la HF.	23
Figura 6.- Clases de mutaciones dependiendo de la función afectada.	30
Figura 7.- Programa utilizado para llevar a cabo el PCR.	39
Figura 8.- SSCP del exón 6 del gen <i>ldlr</i> .	45
Figura 9.- Histograma de la secuencia automática del exón 6 de los pacientes HF1 y HF2.	47
Figura 10.- RFLP del exón 6 con la enzima de restricción <i>Nsi I</i> .	48
Figura 11.- Histograma de la secuencia automática del exón 6 de la familia B.	49
Figura 12a.- Histograma de la secuencia sentido del exón 6 del paciente HF8.	51
Figura 12b.- Acercamiento a la región donde se presentan las mutaciones.	51
Figura 13a.- Histograma de la secuencia antisentido del exón 6 del paciente HF8.	53
Figura 13b.- Acercamiento a la región donde se presenta la mutación.	53
Figura 14.- Comparación de la parte final del exón 6; paciente HF8 vs control.	54

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Clasificación y propiedades de las lipoproteínas plasmáticas.	5
Tabla 2.- Composición de las lipoproteínas plasmáticas.	6
Tabla 3.- Clasificación de las Hiperlipoproteinemias.	22
Tabla 4.- Temperaturas específica para amplificar cada exón (6, 14 y 17) del gen <i>ldlr</i> .	40
Tabla 5.- Gel de poliacrilamida al 6% en condiciones nativas.	41
Tabla 6.- Numeración original y nueva de los pacientes que presentan bandedo y migración anormal en el estudio de SSCP para el exón 6 del gen <i>ldlr</i> .	46
Tabla 7.- Datos clínicos de los pacientes que presentan mutaciones en el exón 6 del gen <i>ldlr</i> .	47
Tabla 8.- Perfil lipídico (mg/dl) de integrantes de la Familia D	54
Tabla 9.- Análisis de las 42 cisteínas del dominio de unión al ligando.	58
Tabla 10.- Mutaciones encontradas.	66

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las lipoproteínas son moléculas constituidas por colesterol libre y esterificado, fosfolípidos, triglicéridos y proteínas. Una de sus funciones es transportar los lípidos en la sangre a través del organismo. El colesterol es importante para el ser humano ya que forma parte fundamental de las membranas celulares y la estructura básica de las hormonas esteroideas y vitamina D, entre otras. Existen varios tipos de lipoproteínas dependiendo de su densidad y contenido. La lipoproteína de baja densidad (LDL; low density lipoprotein) es la que presenta mayor contenido de colesterol y por lo tanto responsable de su transporte a varios tejidos extrahepáticos. La manera en que la LDL se remueve de circulación es a través de su receptor (LDLR) el cual es una glicoproteína transmembranal de 839 aminoácidos, que se encuentra principalmente en hígado. Dicho receptor, mediante endocitosis, transporta a la LDL hacia el interior de las células jugando un papel importante en la homeostasis del colesterol. El gen *ldlr* se localiza en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13.1-13.3) y se encuentra constituido por el promotor y 18 exones. La relación entre los exones y los cinco dominios de la proteína se conoce bastante bien. Mutaciones en el gen *ldlr* resultan en Hipercolesterolemia Familiar (HF) la cual es una enfermedad autosómica dominante clasificada dentro de las hiperlipoproteinemias. Su frecuencia la sitúa como una de las enfermedades hereditarias más frecuentes, ya que en la mayoría de las poblaciones ocurre de 1:500 para heterocigotos y de 1:10⁶ para homocigotos. Clínicamente se caracteriza por niveles elevados de colesterol total y de colesterol LDL, xantomas tendinosos, arco corneal y desarrollo prematuro de aterosclerosis coronaria.

A pesar de que se conocen más de 800 mutaciones a nivel mundial que afectan al gen *ldlr* y que la primera causa de muerte en México son las enfermedades del corazón, la población mexicana aun no se ha genotipificado para dicho gen causante de la HF. Por lo que el propósito del trabajo es analizar 3 de los 18 exones (6, 14 y 17) que constituyen al gen por ser representativos de los dominios de la proteína con el fin de identificar mutaciones causantes de la enfermedad en nuestra población.

Se analizaron 110 muestras de ADN de pacientes mexicanos con HF, entre las cuales 9, las cuales corresponden a 4 familias mostraron alteraciones en la secuencia del exón 6. La primera familia (2 miembros estudiados) reveló la presencia de la mutación C268R de forma heterocigota, esta mutación no se había reportado previamente. En la segunda familia sus tres integrantes presentan la mutación E256K, ambos padres de manera heterocigota y la hija de manera homocigota. Esta mutación ya se ha reportado (solo de manera heterocigota) con anterioridad en población sueca, española, belga, italiana y en el sureste de Asia. Los tres miembros estudiados de la tercera familia también presentan la mutación E256K en un alelo. Por último, un integrante de la cuarta familia presenta las mutaciones K290R, E291V, C292R, la delección 939delCG y un cambio de base en el intrón 6 940+36 G → C. Todas estas variaciones ocurren de manera heterocigota y sólo la mutación K290R se ha reportado previamente en población francesa y alemana, todas las demás son nuevas. A pesar de que todos los familiares de este último paciente padecen HF, ninguno de ellos tiene estas mutaciones por lo que se cree que ocurrieron *de novo* en ambas líneas germinales en este paciente, por lo que se puede decir tanto por sus datos clínicos como por los cambios observados que se trata de un heterocigoto compuesto.

Dentro de la muestra analizada de pacientes mexicanos con hipercolesterolemia familiar, el exón 6 del gen *ldlr* representa una región importante debido a la variedad de mutaciones encontradas, siendo la mutación E256K la de mayor frecuencia.

ABSTRACT

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Lipoproteins are molecules constituted by free and esterified cholesterol, phospholipids, triglycerides and proteins. One of their functions is to transport the lipids in the blood plasma through the organism. Cholesterol is important to the body since it builds up a fundamental part of cellular membranes and the basic structure of steroid hormones, vitamin D, among others. Several lipoproteins have been described which vary on their density and content of lipids and proteins. The low density lipoprotein (LDL) is responsible for cholesterol transport through different extra hepatic tissues because this is the one that presents the higher cholesterol content. LDL is removed from circulation by its receptor (LDLR). LDLR is a transmembranal glycoprotein of 839 amino acids and it is found mostly in the liver. LDL is transported inside the cell via its receptor by endocytosis, playing the receptor an important role in cholesterol homeostasis. The *ldlr* gene is localized in the short arm of chromosome 19 (19p13.1-13.3) and it comprises the promoter region and 18 exons. The relation between exons and the five protein domains is well known. Mutations in the *ldlr* gene results in Familial Hypercholesterolemia (FH) which is a dominant autosomic disease classified within the hyperlipoproteinemias. FH prevalence places it among the most common hereditary diseases, since it occurs 1:500 for heterozygous and 1:10⁶ for homozygous in the majority of the populations. FH is characterized clinically by an elevated concentration of total and LDL cholesterol, tendon xanthomas, arcus corneae and development of premature coronary atherosclerosis.

In spite of the 800 mutations known in the *ldlr* gene all over the world, and the fact that coronary heart diseases are the first cause of mortality in Mexico, Mexican population has not been genotyped for this gene. The purpose of this work is to analyze 3 of the 18 exons (6, 14 y 17) of the *ldlr* gene for being representative of the protein domains. The aim is to identify mutations which could be responsible for causing FH in the Mexican population.

From the 110 DNA samples of the Mexican patients with HF analyzed, only 9 of them, which correspond to 4 families exhibit sequence changes in exon 6. The first family (2 investigated members) revealed the presence of the C268R mutation in a heterozygous manner. This mutation had never been reported before. Three integrants of the second family present the E256K mutation, both parents are heterozygous and the daughter is homozygous. This mutation has been reported previously (only as a heterozygous) in Swedish, Spanish, Belgian, Italian and Southeast Asian population. Three studied members of the third family also have the same E256K mutation in only one of their alleles. Finally, one integrant of the fourth family presents three mutations; K290R, E291V, C292R, one deletion 939delCG and one intron (6) base change 940+36 G → C. All the variations shown in this patient occur in a heterozygous way. Only the K290R mutation has been reported previously in French and German populations, the rest of them are new. In spite that all the relatives of this last patient suffer FH, neither of them have these mutations. Therefore we believe that in this patient, the mutations occurred *de novo* in both germinal lines. On the basis of the clinical data as well as on the basis of the observed changes, it can be said that this patient is a compound heterozygous.

Within the analyzed sample of Mexican patients with familial hypercholesterolemia, the exon 6 of the *ldlr* gene represents an important region because of the variety of mutations that were found. The mutation that was found with the highest frequency was the E256K.

INTRODUCCIÓN

1.- LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS

Los dos lípidos en el plasma clínicamente más relevantes son los triglicéridos y el colesterol, los cuales se transportan de su tejido de origen (el hígado donde son sintetizados o en el intestino donde son absorbidos) al tejido donde se almacenan o se consumen, a través de lipoproteínas (Baron, 2001).

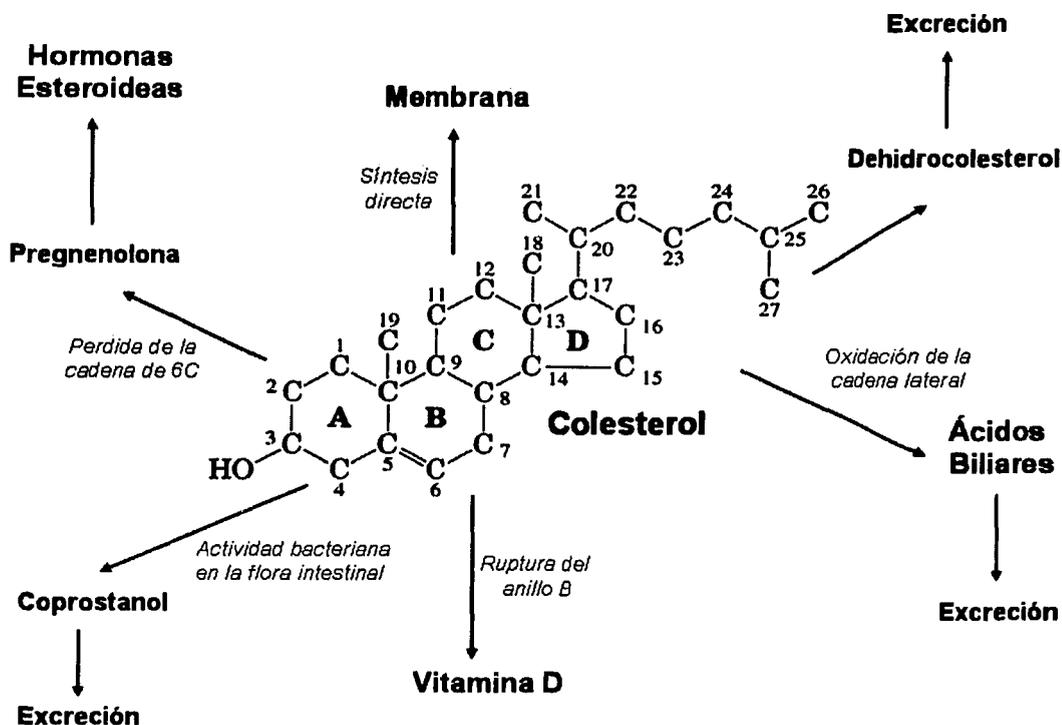
El colesterol es un elemento esencial en las membranas celulares animales y forma la estructura básica de las cinco clases de hormonas esteroideas (gestágenos, glucocorticoides, mineralcorticoides, andrógenos y estrógenos), los ácidos biliares, oxisteroles y la vitamina D (Figura 1). Los triglicéridos son importantes para transferir energía de los alimentos hacia las células. A pesar de que el colesterol juega un papel vital en el metabolismo celular, también puede llegar a ser dañino ya que puede ser capturado por macrófagos de las paredes arteriales y así dar lugar a las células espumosas y éstas a su vez a la formación y crecimiento de placas ateroscleróticas. Dichas placas pueden ser vulnerables a rupturas y a trombosis, dando lugar a una oclusión arterial provocando un infarto al miocardio (Hegele, 2001).

El hecho de que el colesterol sea insoluble en agua hace imposible su transporte por sí solo a través de la sangre. Por esta razón el colesterol se esterifica con largas cadenas de ácidos grasos dando lugar a las lipoproteínas (Brown & Goldstein, 1986). Las lipoproteínas son macromoléculas esféricas compuestas por un centro no polar de ésteres de colesterol y triglicéridos, cubierto por una monocapa superficial hidrofílica compuesta de fosfolípidos, colesterol libre y proteína(s) conocidas como apolipoproteínas (Hegele, 2001). La pequeña cantidad de colesterol no esterificado en la superficie de la partícula se mantiene en un intercambio equilibrado con el colesterol de la membrana celular, mientras que las grandes cantidades de colesterol esterificado se mantienen firmes en el centro de la lipoproteína (Brown & Goldstein, 1986).

Existen diferentes tipos de lipoproteínas plasmáticas, las cuales se diferencian por su contenido lipídico, densidad durante la ultracentrifugación, tamaño o diámetro, movilidad en la electrofóresis y el tipo de proteínas específicas en su superficie (Tabla 1) (Scanu & Wisdom, 1972).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1.- Metabolismo del colesterol



(Depto. Bioquímica Facultad de Medicina UNAM, 2000)

Tabla 1.- Clasificación y propiedades de las lipoproteínas plasmáticas

Lipoproteínas	Lípidos mayores	Apolipoproteínas	Densidad (g/ml)	Diámetro (Å)	Movilidad Electroforética
Quilomicrones	Triglicéridos y ésteres de colesterol de alimentos	A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III, E	< 0.95	800 – 5000	Origen
Restos de quilomicrones	ésteres de colesterol de alimentos	B-48, E	< 1.006	> 300	Origen
VLDL	Triglicéridos endógenos	B-100, C-I, C-II, C-III, E	< 1.006	300 – 800	Pre-β
IDL	ésteres de colesterol y triglicéridos	B-100, E	1.006 – 1.019	250 – 350	Amplia-β
LDL	ésteres de colesterol	B-100	1.019 – 1.063	180 – 280	β
HDL ₂	éster de colesterol	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, E	1.063 – 1.125	90 – 120	α
HDL ₃	ésteres de colesterol	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, E	1.125 – 1.210	50 – 90	α

(Farmer & Gotto, 2001)

Las lipoproteínas plasmáticas consisten de cinco grandes grupos y de varias subclases, cada una de ellas con diferente composición de lípidos y proteínas (Tabla 2), función y metabolismo (Gotto *et al.*, 1986).

Quilomicrones.- Son las partículas de mayor tamaño y las de menor densidad las cuales se sintetizan en el intestino después de la ingestión de alimentos que contienen grasas, como triglicéridos y colesterol. Después de haber sido sintetizadas se encuentran normalmente en el torrente sanguíneo y están compuestos principalmente de triglicéridos. A pesar de que su contenido de ésteres de colesterol es bajo es muy importante para la regulación de la síntesis del colesterol en hígado. Su contenido proteínico no alcanza el 2%.

Remanentes de quilomicrones.- Se forman a partir de los quilomicrones y sufren endocitosis por el hígado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VLDL.- Lipoproteína de muy baja densidad (*very low density lipoprotein*). Se sintetizan en el hígado y transportan triglicéridos y colesterol de origen endógeno y en menor proporción de origen exógeno.

IDL.- Lipoproteína de densidad intermedia (*intermediate density lipoprotein*), también llamada remanente de VLDL. Representa un intermediario en la conversión de VLDL a LDL y contiene cantidades considerables tanto de triglicéridos como de ésteres de colesterol.

Tabla 2.- Composición de las lipoproteínas plasmáticas

Composición (% de peso seco)

Lipoproteína	Superficie			Centro	
	Proteína	fosfolípidos	colesterol libre	ésteres de colesterol	Triglicéridos
Quilomicrones	2	7	2	3	86
VLDL	8	18	7	12	55
IDL	19	19	9	29	23
LDL	22	22	8	42	6
HDL ₂	40	33	5	17	5
HDL ₃	55	25	4	13	3

(Pownall & Gotto, 1999)

LDL.- Lipoproteína de baja densidad (*low density lipoprotein*). Se sintetizan en circulación a partir de las IDL y éstas a su vez de las VLDL. Las LDL son los mayores acarreadores de colesterol libre y de colesterol esterificado en plasma. En el hombre, aproximadamente el 70% del colesterol se transporta a través de este tipo de lipoproteínas, del cual tres cuartas partes se encuentra esterificado. Solamente contiene una molécula de la apolipoproteína B-100 (apoB-100). La LDL es la principal lipoproteína responsable de transportar el colesterol al tejido periférico, sufre endocitosis por el hígado y otros tejidos mediado a través de su receptor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HDL.- Lipoproteína de alta densidad (*high density lipoprotein*). Son las lipoproteínas más pequeñas y a su vez las más densas. Los lípidos principales de esta lipoproteína son fosfatidilcolina y los ésteres de colesterol. Las HDL son las que contienen mayor cantidad de proteína, éstas constituyen la mitad de su peso. Se subdividen en dos clases: HDL₂ y HDL₃. La primera subclase contiene más ésteres de colesterol y menos proteína a comparación de la segunda subclase.

Todas estas lipoproteínas forman una compleja red que constituye el metabolismo de los lípidos, dando lugar a la vía exógena y la vía endógena. La primera empieza en el intestino y acaba en el hígado, mientras que la segunda empieza en el hígado, recorre los tejidos periféricos y regresa de nuevo a dicho órgano (Figura 2) (Brown & Goldstein, 1985).

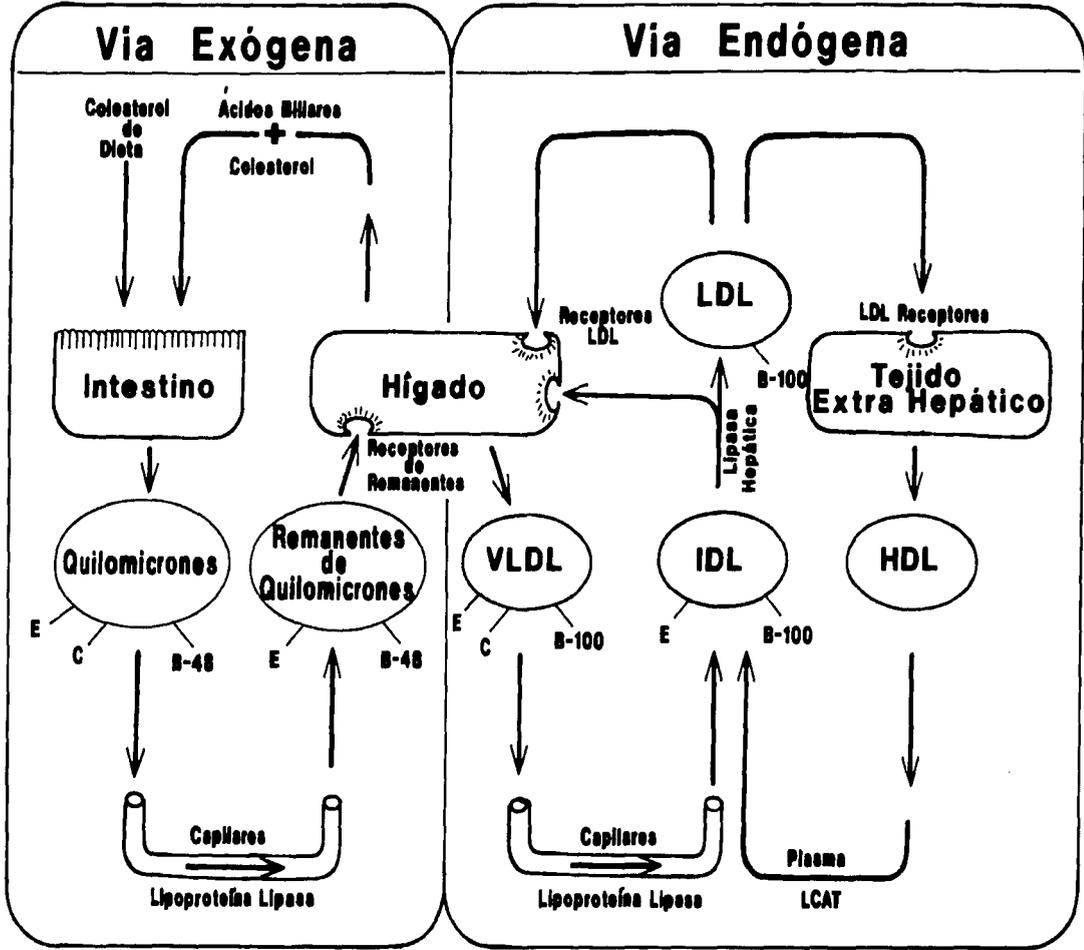
Después de que los quilomicrones entran al torrente sanguíneo sufren rápidamente lipólisis; pierden la mayoría de los triglicéridos y adquieren ésteres de colesterol de otras lipoproteínas. Durante este proceso también adquieren la apolipoproteína E (apoE) y se convierten en remanentes de quilomicrones. Estos remanentes se eliminan de la circulación por medio del hígado vía los receptores de apoE. ApoB-100 es la apolipoproteína que contiene en mayor cantidad la VLDL, así como la única apolipoproteína que contiene la LDL. En el hígado apoB-100 se combina con varios lípidos para dar lugar a la VLDL. Esta última lipoproteína también es rica en triglicéridos, los cuales se hidrolizan para dar lugar a las IDL. Algunos de los remanentes de VLDL, también conocidos como IDL se remueven de la circulación mediante el hígado a través de un proceso mediado por apoE, mientras que otros se hidrolizan dando lugar a la LDL.

Debido a que la LDL es la lipoproteína con mayor contenido de colesterol esterificado, una de sus funciones es transportar una porción de dicho lípido a diferentes tejidos periféricos, mientras que el resto, el cual es la mayoría, se remueve del torrente sanguíneo de nuevo a través del hígado.

Dicha remoción se lleva a cabo cuando la única molécula de apoB-100 que contiene la LDL se une al receptor hepático de la LDL (LDLR) (Rader *et al.*, 1994; Schaefer, 2002).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 2.- Metabolismo de lípidos



(Adaptado de Brown & Goldstein, 1985)

La HDL es la responsable del transporte reverso de colesterol, el cual consiste en llevar de regreso el colesterol de las células de tejido periférico hacia el hígado y otros órganos esteroideogénicos (Eckardstein *et al.*, 2001).

2.- METABOLISMO DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD (LDL)

La lipoproteína de baja densidad (LDL) como ya se mencionó es la responsable de transportar el mayor porcentaje de colesterol a través del organismo. La mayoría de las LDL provienen de su precursor, la VLDL la cual es secretada por el hígado con el fin de exportar el exceso de triglicéridos hepáticos, evitando así su acumulación. El centro de esta lipoproteína precursora es por lo tanto rico en triglicéridos, los cuales son removidos por la enzima lipoproteína lipasa en los capilares de los músculos y del tejido adiposo.

El resultado de dicha remoción da lugar a las IDL, las cuales representan al intermediario entre la VLDL y la LDL. Bajo condiciones normales, la mayoría de estas partículas IDL se eliminan de la circulación a través del LDLR hepático. La afinidad de la IDL por el receptor es muy alta por lo que la vida media de la lipoproteína en plasma es corta, incluso de pocos minutos, haciéndola casi indetectable. Una fracción de las IDL escapa de éste proceso hepático sufriendo posteriormente lipólisis para dar lugar a la LDL. La enzima responsable de dicho proceso es la lipasa hepática.

Debido a que la LDL tiene menor afinidad que la IDL por el receptor de la LDL, el tiempo en circulación es mayor, incluso hasta de tres días antes de que sea removida por el receptor. La unión monovalente que se da entre el receptor y la LDL es a través de la molécula de apoB-100 presente en la lipoproteína. Cabe mencionar que los macrófagos a través de su receptor scavenger como CD36 y SRA-I/II también pueden unir e internalizar a la LDL de manera no regulada en las paredes de las arterias promoviendo así la aterosclerosis.

La LDL se puede unir a su receptor tanto en hígado como en tejido extra hepático. Sin embargo el hígado es el principal responsable de la remoción de la lipoproteína.

El metabolismo de estas lipoproteínas de diferente densidad es importante, ya que en general, entre mayor actividad tenga el receptor de la LDL, mayor será la eficiencia para

remover a la IDL de circulación y por lo tanto menor será la fracción de IDL convertida a LDL (Brown & Goldstein, 1990; Havel & Kane, 2001; Hegele, 2001).

Los niveles circulantes de lípidos o de las fracciones lipoproteínicas son anormales en las dislipidemias debido a situaciones genéticas, ambientales o ambas, que alteran la producción, el catabolismo, o la eliminación de las lipoproteínas plasmáticas de la circulación (Farmer & Gotto, 2001).

En 1923 un científico ruso llamado Antischkow alimentó únicamente con colesterol a conejos y produjo altos niveles de colesterol en la sangre de estos animales así como aterosclerosis en la aorta y en las arterias coronarias. En base a dicha observación postuló que la hipercolesterolemia ocasiona aterosclerosis, pensamiento directo que se estableció durante los 50 años siguientes (Goldstein & Brown, 1987). Sin embargo, desde varias décadas atrás los estudios epidemiológicos mostraron que entre mayor sea el nivel de colesterol de un individuo, mayor será el riesgo a desarrollar enfermedad de las coronarias (Kannel *et al.*, 1971). También se observó que niveles altos de colesterol en sangre correlacionaban con aterosclerosis en diferentes poblaciones (Keys, 1980). Cabe mencionar que los niveles de colesterol total en plasma reflejan de manera directa la concentración de las LDL, ya que dos terceras partes del colesterol se transportan a través de esta fracción lipídica (Rifkind, 1982).

Debido a dichas y otras observaciones, la LDL es considerada la lipoproteína responsable de las diferentes enfermedades del corazón. Existen cuatro enfermedades monogénicas que dan lugar a la acumulación de las LDL en plasma (Goldstein & Brown, 2001a).

La primera en ser descrita y la más importante por su frecuencia es la Hipercolesterolemia Familiar (HF, OMIM: #143890), donde el gen afectado es el que codifica para el receptor de la LDL (Goldstein *et al.*, 2001b).

El segundo desorden genético que causa acumulación de la LDL en plasma, con un fenotipo autosómico dominante de hipercolesterolemia (ADH) (Varret *et al.*, 1999) es el ligando deficiente de apoB-100 familiar (FDB; *familial ligand-defective apoB-100*, OMIM:

#144010). Esta enfermedad se diferenció por primera vez de la HF en 1986 (Vega & Grundy, 1986). En este caso las mutaciones ocurren en el gen que codifica para apoB-100, de manera que la habilidad para unirse al receptor de la LDL disminuye (Kane & Havel, 2001). Hasta la fecha sólo se conocen 4 mutaciones en el gen *apoB* asociadas al fenotipo ADH (Soria *et al.*, 1989; Gaffney *et al.*, 1995; Pullinger *et al.*, 1995; Nissen *et al.*, 1995). El cuadro clínico para FDB no es tan severo, pero en muchos casos es prácticamente indistinguible del de Hipercolesterolemia Familiar de forma heterocigota (Goldstein & Brown, 2001a; Gómez & Aguiar, 1996), y la única manera de diferenciarlos es a nivel genético.

La tercera enfermedad es la sitosterolemia (OMIM: #210250), la cual produce que los individuos con dicho padecimiento absorban mediante el intestino grandes cantidades de colesterol proveniente de la dieta, así como de esteroides de las plantas (sitosterol, campesterol y estigmasterol). Como resultado ocurre un aumento de colesterol en el hígado, lo cual suprime la transcripción del gen del receptor de la LDL (Björkhem *et al.*, 2001; Salen *et al.*, 1992). Para esta enfermedad se han identificado mutaciones en dos genes de la familia de los transportadores ABC (*ATP binding cassette*); ABCG5 (OMIM: *605459) y/o ABCG8 (OMIM: *605460) (Berge *et al.*, 2000).

La cuarta y última enfermedad es la Hipercolesterolemia Autosómica Recesiva (ARH, OMIM: #603813). A pesar de que este padecimiento comparte muchas características clínicas con la HF, su defecto genético es diferente. En este caso las mutaciones ocurren en una proteína putativa adaptadora del LDLR, denominada ARH, la cual contiene un dominio de unión a fosfotirosina. En otras proteínas, dicho dominio une a los motivos NPXY en las colas citoplasmáticas de los receptores de superficie celular, incluyendo a LDLR (García *et al.*, 2001).

Estos cuatro defectos genéticos dan como resultado que los niveles de LDL plasmáticos se eleven debido a un decremento en la actividad de su receptor, LDLR, ya sea de manera directa o indirecta (Goldstein & Brown, 2001a). En el caso de la HF la actividad del receptor disminuye directamente ya que las mutaciones ocurren justo en el gen *ldlr*.

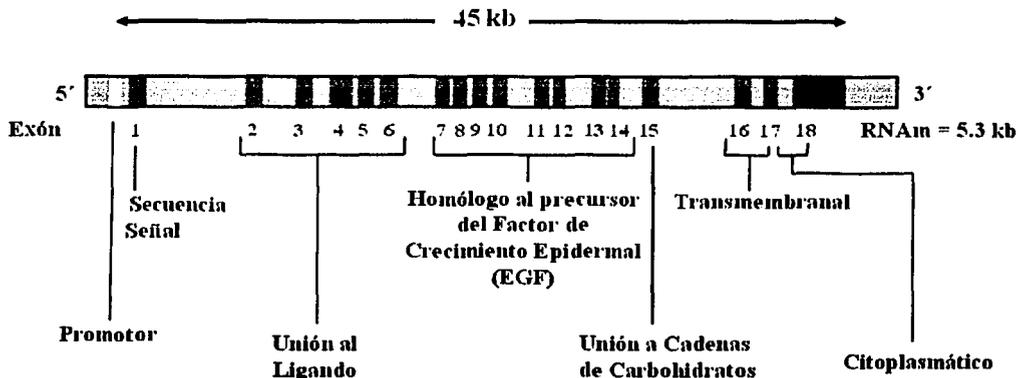
La sitosterolemia y la hipercolesterolemia autosómica recesiva (ARH) son, como su nombre lo dice, padecimientos recesivos. Y cabe mencionar que para el fenotipo de hipercolesterolemia autosómica dominante (ADH), a parte de los dos defectos ya mencionados (HF y FDB) recientemente se ha descrito un nuevo locus en el cromosoma 1, mapeado en la región 1p34.1-p32 (Varret *et al.*, 1999).

3.- RECEPTOR DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD (LDLR)

El receptor de la LDL (LDLR) es una glicoproteína transmembranal distribuida de manera ubicua, sin embargo la mayoría de los receptores se expresan en hígado donde proporcionan el colesterol para sintetizar ácidos biliares que posteriormente serán secretados de nuevo en forma de lipoproteínas recién sintetizadas. Los receptores también se encuentran en altas concentraciones en la corteza adrenal de las glándulas suprarrenales y en el cuerpo luteo de los ovarios. De esta manera dichos órganos son proveídos de colesterol para sintetizar hormonas esteroideas (Goldstein & Brown, 1985b). Por éstas y varias razones más el LDLR juega un papel principal en la homeostasis del colesterol.

El gen *ldlr* se localiza en el brazo corto del cromosoma 19, 19p13.1-13.3 (Lindgren *et al.*, 1985). Abarca 45 kilobases (kb) y consta de un promotor, 18 exones y 17 intrones (Figura 3). Muchos de los exones comparten una historia evolutiva con exones de otros genes (precursor del factor de crecimiento epidermal y C9 de la cascada de complemento), lo que sugiere que el gen *ldlr* fue ensamblado a partir de una entremezcla de exones (Südhof *et al.*, 1985a).

Figura 3.- Gen del receptor de la LDL (*ldlr*)

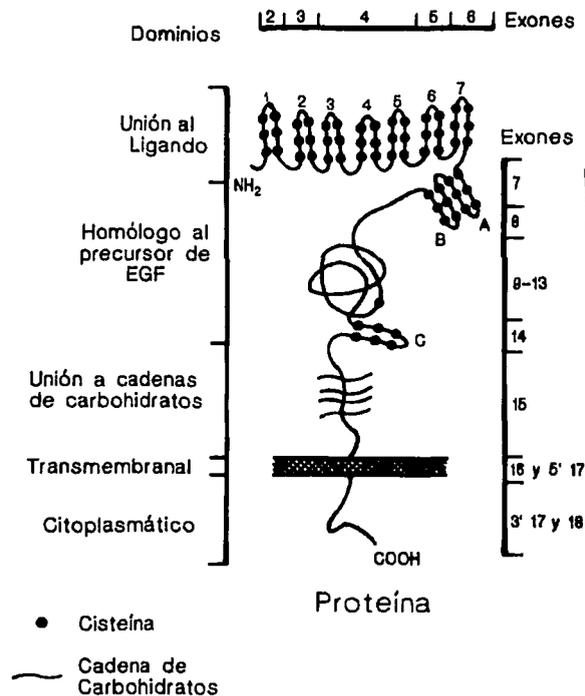


(Adaptado de Russell *et al.*, 1989)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El ARNm del receptor mide 5.3 kb, sin embargo la región codificante es únicamente de 2.6 kb, ya que casi la mitad del ARNm se encuentra constituido por una gran región en el extremo 3' (exón 18) la cual no se traduce. Dicha región contiene dos copias y media de la familia de elementos repetidos moderadamente (SINES; short interspersed repeated elements) *Alu* de ADN (Yamamoto *et al.*, 1984), las cuales actúan como retrotransposones por su homología con el ARN 7SL (Schmid, 1998). También se ha observado que existen 95 repeticiones *Alu* en los intrones del gen *ldlr* (Amsellem *et al.*, 2002). El ARNm codifica para una proteína de 860 aminoácidos, la cual mediante modificaciones post-traduccionales queda finalmente de 839 aminoácidos (Südhof *et al.*, 1985a). La relación entre los exones y los dominios funcionales de la proteína madura se conoce bastante bien (Figura 4) (Südhof *et al.*, 1985a).

Figura 4.- Receptor de la LDL



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

(Adaptado de Hobbs *et al.*, 1990)

En el aparato de Golgi la proteína precursora sufre otras modificaciones post-traduccionales que dan lugar a un incremento en el peso molecular de 120 a 160 kDa (Tolleshaug *et al.*, 1982).

3A.- LOS 18 EXONES DEL GEN LDLR

El exón 1 codifica para un fragmento hidrofóbico de 21 aminoácidos situado en el extremo NH₂ terminal de la proteína precursora. Dicho fragmento, el cual contiene la secuencia señal para dirigir a la proteína hasta el retículo endoplasmático (RE), se adhiere a este último durante la translocación, de tal manera que la proteína madura carece de este péptido quedando de 839 aminoácidos (Goldstein *et al.*, 1985a).

Los exones del 2 al 6 codifican para el dominio de unión al ligando, el cual se encuentra en la superficie externa de la membrana plasmática. Esta formado por siete repeticiones cada una de ~ 40 aminoácidos las cuales muestran una gran similitud a secuencias en diversas proteínas de la cascada del complemento (Hobbs *et al.*, 1990) y a más de 100 proteínas de la base de datos de secuencias de proteínas (Goldstein *et al.*, 2001b). Cada repetición contiene 6 residuos de cisteínas las cuales forman entre ellos tres puentes disulfuro. El extremo del COOH terminal de cada repetición contiene un grupo conservado de aminoácidos cargado negativamente Asp-Cys-X-Asp-Gly-Ser-Asp-Glu (DCXDGSD), siendo los tres últimos (SDE) los más relevantes por conservarse absolutamente en las siete repeticiones.

Las repeticiones 1, 2, 6 y 7 son codificadas por los exones 2, 3, 5 y 6 respectivamente, mientras que el exón 4 codifica para las tres repeticiones restantes, 3, 4 y 5. Los tres puentes disulfuro de cada repetición le confieren gran estabilidad al sitio de unión del receptor, incluso hasta el momento en que la LDL es distribuida al endosoma. La región cargada negativamente es importante tanto para unir al ligando así como para liberarlo en el endosoma. El endosoma al poseer un ambiente ácido ocasiona que los residuos cargados negativamente se protonen y pierdan su carga, liberando así a la LDL. El ligando contiene segmentos cortos ricos en aminoácidos positivos que se cree que son los responsables de la

unión al receptor. A pesar de que la carga total de apoB-100 es negativa, diferentes experimentos prueban que varios grupos de residuos básicos quedan expuestos en la superficie de la molécula (Goldstein *et al.*, 1985a; Hobbs *et al.*, 1990). Sin embargo recientemente con un estudio cristalográfico de la repetición cinco se ha cuestionado un poco acerca de dicha hipótesis, lo que indica que solamente con la estructura completa del complejo receptor-ligando se tendrá la respuesta definitiva (Fass *et al.*, 1997).

Los exones del 7 al 14 codifican para una secuencia de 400 aminoácidos la cual comparte identidad de un 33% con una porción del gen que codifica para el precursor del Factor de Crecimiento Epidermal humano (EGF; *epidermal growth factor*) (Russell *et al.*, 1984; Südhof *et al.*, 1985b). Este dominio incluye 3 repeticiones del factor de crecimiento las cuales son secuencias de 40 aminoácidos ricas en residuos de cisteínas, (6 residuos por repetición). Las dos primeras repeticiones, A y B codificadas por los exones 7 y 8 respectivamente se localizan de manera contigua y separadas por 267 aminoácidos de la tercera repetición C, la cual es codificada por el exón 14. La secuencia que separa a las repeticiones A y B de C(exones 9 – 13) contiene cinco copias de un motivo conservado Tyr-Trp-Thr-Asp (YWTD) el cual se repite entre cada 40 y 60 aminoácidos. El dominio homólogo al precursor de EGF sirve para posicionar al dominio de unión al ligando para que de esta manera una al ligando en la superficie celular (Goldstein *et al.*, 1985a; Hobbs *et al.*, 1990). El dominio homólogo al precursor del factor de crecimiento epidermal también se requiere para la disociación dependiente de ácido de las lipoproteínas y el receptor en el endosoma durante el reciclaje del mismo. Cuando este dominio se encuentra deletado el receptor no libera a su ligando en el endosoma a un pH ácido, lo que ocasiona que el receptor no se pueda reciclar más de manera eficiente y por consecuencia sea degradado rápidamente después de unir a su ligando (Davis *et al.*, 1987b).

Ambos dominios (unión a ligando y el homólogo al precursor de EGF) a pesar de que contienen repeticiones ricas en cisteínas, sus secuencias difieren, tanto en el espaciamiento entre las cisteínas así como en la carencia de la secuencia de aminoácidos Ser-Asp-Glu (SDE) en el dominio homólogo al precursor de EGF. Estas diferencias dan como resultado que la aportación de cada dominio para unir al ligando sea diferente (Südhof *et al.*, 1985a).

Mientras que la repetición 1 del dominio de unión al ligando no es necesaria, las repeticiones 2 y 3 así como 6 y 7 en conjunto respectivamente se requieren para una unión máxima del ligando LDL. Las repeticiones 4 y 5 también son importantes. En cuanto al dominio homólogo al precursor de EGF, sólo la repetición A se requiere para unir al ligando LDL, mientras que la repetición B no es necesaria para dicha unión (Esser *et al.*, 1988; Russell *et al.*, 1989).

El exón 15 codifica para el dominio de unión a cadenas de carbohidratos o azúcares, también conocido como dominio de glicosilación. Está formado por una secuencia de 58 aminoácidos rica en residuos de serinas y treoninas, los cuales sirven como sitio de anclaje para las cadenas de azúcar ligadas en el grupo hidroxilo de la cadena lateral de dichos aminoácidos (*O*-oligosacárido). Cada una de estas cadenas se encuentra formada por un centro de *N*-acetilgalactosamina más una galactosa y uno ó dos ácidos siálicos. La función de estos azúcares unidos podría ser para que funcionaran como postes para mantener al receptor extendido en la superficie de la membrana y así una a su ligando (Goldstein *et al.*, 1985a; Cummings *et al.*, 1983). A pesar de que en fibroblastos de hamster en cultivo no son esenciales para que el receptor funcione (Davis *et al.*, 1986a), la delección de este exón en dos familias con HF de manera heterocigota ha mostrado una segregación con la hipercolesterolemia (Kajinami *et al.*, 1988; Koivisto *et al.*, 1992), lo que sugiere que el dominio de unión a cadenas de azúcares juega un papel específico en la función del receptor en el hígado.

A parte del conjunto de cadenas de carbohidratos unidos a dicho dominio existen otras cadenas esparcidas a lo largo de toda la proteína, sin embargo no se conoce su posición exacta pero se postula que la confieren estabilidad al receptor (Goldstein *et al.*, 2001b).

El exón 16 y el extremo 5' del exón 17 codifican para el dominio transmembranal, el cual es una secuencia que contiene 22 aminoácidos hidrofóbicos. Esta secuencia no se encuentra muy conservada entre especies. A pesar de que el LDLR humano y el bovino funcionan de manera muy similar, en el humano hay un residuo de cisteína el cual en bovino se encuentra sustituido por una alanina lo que parece indicar que la cisteína transmembranal de humano se encuentra en un estado reducido (Goldstein *et al.*, 1985a).

El extremo 3' del exón 17 y el extremo 5' del exón 18 codifican para una secuencia de 50 aminoácidos que forman el dominio citoplasmático incluyendo al COOH terminal. Dicha secuencia es importante para la localización en la superficie celular del receptor durante el proceso de endocitosis, ya que contiene la secuencia señal (NPXY) necesaria para mediar la internalización del LDLR a través de los poros recubiertos por la proteína clatrina (Chen *et al.*, 1990). De hecho los primeros 22 aminoácidos son suficientes para que ocurra la internalización de una manera rápida, sobre todo el residuo en la posición 807 debe de ser aromático (Thy, Phe, Trp) (Davis *et al.*, 1987a). Al principio de la membrana, la cola citoplasmática contiene un grupo de aminoácidos cargados positivamente, 3 de los 6 primeros residuos son lisinas o argininas, característica típica de las proteínas de membrana plasmática. Posteriormente se encuentra la secuencia señal NPVY y cerca del extremo del COOH terminal hay un grupo de residuos cargados negativamente Glu-Asp-Asp (EDD). También contiene 3 residuos de tirosinas y varios de serina y de treonina los cuales pueden llegar a fosforilarse. Por último, el dominio también contiene una cisteína que puede formar puentes disulfuro (Goldstein *et al.*, 1985a).

El resto del exón 18 se refiere a la región 3' del ARNm de 2.6 kb la cual no es traducida.

3B.- REGULACIÓN Y SÍNTESIS DEL RECEPTOR LDL

El número de receptores LDL expresados en hígado es controlado por una autorregulación negativa, mecanismo por el cual se mantienen constantes los niveles intracelulares de colesterol en los hepatocitos y en otro tipo de células. El gen que codifica para el receptor LDL (*ldlr*) se encuentra parcialmente suprimido en condiciones normales, de ahí la importancia del reciclaje del receptor. Cuando la concentración de colesterol en las células hepáticas aumenta, la transcripción del gen *ldlr* se inhibe y por lo tanto la LDL queda en plasma. Por el contrario, cuando los niveles de colesterol hepático descienden, se induce la transcripción del receptor lo que lleva a una unión e internalización de la LDL y como resultado la concentración de LDL en plasma disminuye (Brown & Goldstein, 1975b; Goldstein & Brown, 1992, 2001a).

En presencia de colesterol la autorregulación negativa también consiste en la supresión de la actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa),

enzima involucrada en el paso limitante de la síntesis de colesterol. La supresión en la actividad de la enzima da por resultado la inhibición de la síntesis de colesterol en la célula (Brown *et al.*, 1974). Otro efecto de la autorregulación negativa es la activación de la enzima acil-CoenzimaA colesterol aciltransferasa (ACAT) la cual tiene como función esterificar el colesterol para almacenarlo en forma de ésteres de colesterol en caso de que haya un exceso (Goldstein *et al.*, 1974b).

La manera en que se censa la necesidad de transcribir el gen *ldlr* es por secuencias de ADN en *cis* localizadas en la región flanqueante 5' del gen, las cuales son responsables de regular mediante esteroides la expresión de genes en células animales (Südhof *et al.*, 1987; Goldstein & Brown, 1990).

El receptor precursor se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso siendo su peso molecular de 120 kDa (Tolleshaug *et al.*, 1982). Contiene cadenas de carbohidratos ricas en manosa unidas al NH₂ de la cadena lateral de los residuos de asparagina (*N*-oligosacárido) y el azúcar central (*N*-acetilglucosamina) de los *O*-oligosacáridos (Cummings *et al.*, 1983). Después de un lapso de 30 a 60 minutos aproximadamente de que se sintetizó, ya siendo su peso molecular de 160 kDa, se transporta hacia el aparato de Golgi. El aumento en el peso molecular coincide con la conversión y con la adición de azúcares a los *N*-oligosacáridos y los *O*-oligosacáridos respectivamente (Cummings *et al.*, 1983). Sin embargo la cantidad de carbohidratos no es suficiente para aumentar el peso molecular 40 kDa, por lo que se cree que el decremento en la movilidad electroforética radica en un cambio de conformación como consecuencia de la elongación del grupo de los *O*-oligosacáridos (Cummings *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1986a). Finalmente la proteína contiene aproximadamente 2 *N*-oligosacáridos del tipo complejo en residuos de asparagina y 18 *O*-oligosacáridos en residuos de serina/treonina, de los cuales dos tercios se encuentran en la región de la molécula que colinda con la membrana plasmática (Cummings *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1986a).

Posteriormente a la síntesis del receptor éste se dirige hacia la superficie celular donde es capaz de reconocer y por lo tanto unir a la LDL (Goldstein *et al.*, 1985a) para que

posteriormente se lleve a cabo la endocitosis mediada por el receptor. Dicho proceso inicia en unas regiones especializadas de la membrana plasmática llamadas “poros recubiertos de clatrina” (Brown & Goldstein, 1986; Goldstein & Brown, 1990).

Los receptores solos o junto con su ligando se difunden a través de la membrana hasta que se asocian con los poros en proceso de formación, los cuales están formados por las proteínas AP-2 y clatrina (Schmid, 1997). Ya que el conjunto de proteínas ha formado los poros, después de unos cuantos minutos estos poros sufren una invaginación y posteriormente se encapsulan con todo y receptor/ligando separándose de la membrana dando lugar a las vesículas endocíticas recubiertas por clatrina. Una vez que las vesículas quedan libres del recubrimiento de clatrina y de AP-2 se fusionan entre ellas para formar los endosomas tempranos cercanos a la periferia celular (Alberts *et al.*, 1994; Goldstein *et al.*, 1985a).

Una vez en el compartimiento endosomal, la LDL se distribuye hacia los lisosomas a través de los endosomas tardíos. En los lisosomas los ésteres de colesterol de las partículas LDL se hidrolizan mediante la lipasa lisosomal ácida (Goldstein *et al.*, 1975) a colesterol libre para ser utilizado de nuevo (Brown *et al.*, 1975a) y la apolipoproteína es hidrolizada por proteasas a aminoácidos (Goldstein & Brown, 1974a).

La hidrólisis del colesterol es posible debido al aumento de acidificación que sufre el interior de los endosomas tempranos, tardíos y lisosomas, siendo los últimos los más ácidos. El lumen se mantiene con un pH ácido debido a la ATPasa localizada en la membrana que bombea H⁺ del citosol hacia el interior del compartimiento (Goldstein *et al.*, 1979a). Desde los endosomas tempranos el ligando se separa de su receptor, y a través de un segmento de la membrana endosomal regresa de nuevo a la membrana plasmática (Brown *et al.*, 1983; Basu *et al.*, 1981) para así unir a otro ligando. Cada receptor LDL realiza un viaje completo de modo continuo cada 10 minutos aproximadamente esté o no unido a una LDL (Basu *et al.*, 1981).

4.- HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR (HF)

Mutaciones en el gen que codifica para el receptor LDL resultan en una enfermedad llamada Hipercolesterolemia Familiar (HF), la cual se encuentra clasificada dentro de las hiperlipoproteinemias con fenotipo II-a (Tabla 3). Dichas mutaciones afectan la función y/o estructura del receptor, alterando así el metabolismo celular de la lipoproteína LDL. La consecuencia de la deficiencia funcional del receptor ocasiona un decremento en la remoción de la LDL plasmática hacia el interior celular y por lo tanto su acumulación en el plasma sanguíneo.

4A.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA HF

Clínicamente la HF se caracteriza por niveles elevados tanto de colesterol total como de colesterol LDL (Kwiterovich *et al.*, 1974). Los valores normales de colesterol LDL son < 130 mg/dl, mientras que para colesterol total, < 200 mg/dl es un valor deseable. De 200-239 mg/dl es un valor límite y > 240 mg/dl es un valor de alto riesgo (Nicoll, 2001). El aumento de colesterol LDL ocasiona a su vez que los macrófagos lo ingieran dando lugar a las células espumosas. La presencia de células espumosas en piel y tendones se conoce como xantomas. Los xantomas en el tendón de aquiles (Figura 5b) y en el tendón extensor de las manos (Figura 5c) son otra característica clínica específica de la HF, así como también la presencia de ateromas (placa de la íntima arterial engrosada y degenerada). Los ateromas son importantes ya que dan lugar a la aterosclerosis que ocasiona cardiopatías, entre la que destaca por su alto índice de mortalidad el infarto al miocardio. En México, las enfermedades isquémicas del corazón representan el 9.9% de las causas de mortalidad (Dir Gen Est. Inf. SSA, 2001). De hecho la HF fue el primer desorden genético reconocido como causa de dicho evento cardiaco (Müller, 1938), y hasta la fecha continúa siendo la relación causal más directa entre altos niveles de colesterol en sangre y aterosclerosis coronaria (Goldstein *et al.*, 2001b).

Otras características clínicas de la HF, mas no específicas de dicha dislipidemia, son la xantelasma (xantomas planos en los párpados) (Figura 5a) y el arco corneal o arcus corneae

Tabla 3.- Clasificación de las Hiperlipoproteinemias

Hyperlipoproteinemias			
Fenotipo	Denominación genérica	Lipoproteína en exceso	Trastornos genéticos primarios
I	Hiperlipemia exógena	Quilomicrones	Deficiencia familiar de lipoproteinlipasa Deficiencia familiar de apolipoproteína C-II No clasificada
II-a	Hipercolesterolemia	LDL	Hipercolesterolemia Familiar Hiperlipidemia familiar combinada Hipercolesterolemia poligénica
II-b	Hiperlipidemia combinada	LDL, VLDL	Hiperlipidemia familiar combinada No clasificada
III	Hiperlipidemia remanente	β -VLDL	Disbetalipoproteinemia familiar No clasificada
IV	Hiperlipemia endógena	VLDL	Hipertrigliceridemia familiar (leve) Hiperlipidemia familiar combinada Hipertrigliceridemia esporádica Enfermedad de Tangier
V	Hiperlipemia mixta	VLDL, quilomicrones	Hipertrigliceridemia familiar (grave) Deficiencia familiar de lipoproteinlipasa Deficiencia familiar de apolipoproteína C-II

(Adaptado de Anderson, 1997b ; Havel, 2001)

(Figura 5d), anillo opaco grisaseo o blanco situado al margen de la córnea. A pesar de que el arco corneal se encuentra presente en un 50% de los heterocigotos mayores de 30 años de

edad, también puede ocurrir al igual que la xantelasma, en personas con niveles lipídicos normales (Goldstein *et al.*, 2001b), ya que dicho arco puede ocurrir por depósito de colesterol o bien por hialinosis del estroma corneal. Puede asociarse a defectos oculares o a hiperlipidemias familiares (Anderson, 1997a).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5.- Características clínicas de la HF



(Familial Heart Association, 2002)

A pesar de que los síntomas son claros, existen otras enfermedades que también presentan xantomas tendinosos como la sitosterolemia (Björkhem *et al.*, 2001), el ligando deficiente de apoB-100 familiar (FDB) (Kane & Havel, 2001), la hipercolesterolemia familiar recesiva (ARH) y en una proporción menor en individuos con hiperlipoproteinemia tipo 3 (Mahley & Rall, 2001).

Las personas heterocigotas para HF presentan niveles de colesterol entre 350-550 mg/dl (Schrott *et al.*, 1972; Kevin & Snack, 1968), desarrollan xantomas tendinosos y aterosclerosis coronaria después de la segunda y tercera década de vida respectivamente (Goldstein *et al.*, 2001b). En cuanto a los homocigotos para HF sus niveles de colesterol son de 650-1200 mg/dl, los xantomas cutáneos aparecen en los primeros cuatro años de vida y pueden llegar a presentar xantomas cutáneos planos de color naranja-amarillo en las extremidades, en los glúteos y en las manos, especialmente en el tejido interdigital entre el primer y segundo dedo (Khachaturian & Uthman, 1973). En estos pacientes la enfermedad

de las coronarias empieza desde la niñez ocasionando frecuentemente la muerte antes de los veinte años de edad (Goldstein *et al.*, 2001b).

A partir de los datos clínicos se puede decir que existe una dosis génica para el efecto de la HF, ya que en los homocigotos los síntomas y las características son más graves. La explicación a dicha observación radica en que los heterocigotos presentan en la superficie celular la mitad de los receptores, o bien sólo la mitad de los receptores son funcionales a comparación de personas sin HF (Goldstein *et al.*, 1976), ya que sólo el gen de un alelo es funcional. Por esto los niveles de colesterol para heterocigotos aumentan al doble aproximadamente. Sin embargo en el caso de los homocigotos ambos alelos se encuentran afectados, lo que ocasiona que prácticamente todos los receptores en superficie celular no sean funcionales o no existan. En ciertas ocasiones los que fenotípicamente parecen ser homocigotos, en realidad son heterocigotos compuestos, es decir en vez de heredar dos alelos idénticos para el locus *ldlr* heredan dos alelos mutantes diferentes. La única forma de distinguir entre un homocigoto y un heterocigoto compuesto es a nivel genético.

4B.- TRATAMIENTO PARA LA HF

El tratamiento para la HF consiste en reducir las concentraciones de colesterol LDL en plasma, lo cual se lleva a cabo disminuyendo la ingestión de colesterol a través de la dieta, así como inhibiendo la síntesis de colesterol con drogas conocidas como las estatinas, las cuales actúan sobre la HMG-CoA reductasa, enzima encargada de reducir el HMG-CoA a mevalonato, un precursor del colesterol. De esta manera reduciendo la síntesis hepática de colesterol se aumenta la transcripción del gen *ldlr* (Goldstein & Brown, 1990) y por lo tanto la actividad de los receptores LDL en dicho órgano, lo que conlleva a un incremento en el catabolismo de la LDL y un decremento proporcional de la lipoproteína en plasma.

La experiencia en el uso de este tipo de drogas en niños y en adolescentes es limitada, sin embargo tratamientos de tiempos cortos parecen ser seguros (Lambert *et al.*, 1996; Knipscheer *et al.*, 1996; Stein *et al.*, 1999), pero hasta que no se cuenten con más datos, estos agentes deben de ser usados con cuidado. Las estatinas solamente son efectivas en los

heterocigotos verdaderos o compuestos, ya que los homocigotos son relativamente resistentes a este tipo de medicamentos que actúan estimulando a los receptores LDL (Uauy *et al.*, 1988), por lo que como alternativa se recurre a la cirugía o a otro medio físico como la remoción de la LDL mediante el cambio de plasma o aféresis de la LDL. Un tratamiento adecuado con una combinación de diferentes drogas, puede reducir el índice de progresión de la enfermedad y en algunos casos incluso hasta revertir la aterosclerosis coronaria (Kane *et al.*, 1990).

4C.- CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA HF

La HF es una enfermedad con un patrón de herencia autosómico dominante (Goldstein & Brown, 1979b) siendo más común en la forma heterocigota. En la mayoría de las poblaciones la frecuencia para los heterocigotos es de 1 en 500 (Goldstein *et al.*, 1973), lo cual indica que la HF es uno de los errores innatos del metabolismo más frecuente, mientras que para homocigotos la frecuencia disminuye a 1 en un millón.

Existen tres lugares en el mundo en donde la ocurrencia de la HF cambia significativamente lo cual se puede atribuir a un efecto fundador. En Líbano la frecuencia estimada es de 1 en 10,000 para homocigotos y de 1 en 171 para heterocigotos. En la provincia de Québec en Canadá la frecuencia para heterocigotos es de 1 en 270 (Moorjani *et al.*, 1989) y de 1 en 154 en la región noreste entre los franceses canadienses. Esto se explica por el hecho de que los 5.3 millones de franceses canadienses modernos descienden de cerca de 8000 colonizadores franceses que emigraron del este de Francia hacia la provincia de Québec entre los años de 1608 y 1763 y fundaron una población agraria que ha permanecido física y socialmente aislada (Goldstein *et al.*, 2001b). Por último en Sudáfrica existen tres poblaciones con una alta frecuencia de HF: los sudafricanos blancos heterocigotos y los sudafricanos indios ambos con una frecuencia de 1 en 100 (Jenkins *et al.*, 1980; Rubinsztein *et al.*, 1992) y los judíos askenazis con una frecuencia de 1 en 67 (Seftel *et al.*, 1989), la cual es la frecuencia más alta de todo el mundo.

La frecuencia de HF entre los sudafricanos blancos es cinco veces mayor que la frecuencia de la población europea de donde se originaron (Seftel *et al.*, 1980) y tres mutaciones explican el 90% de los casos con HF (Leitersdorf *et al.*, 1989b; Kotze *et al.*, 1991). Esta alta frecuencia se puede explicar debido a que los sudafricanos blancos son descendencia de aproximadamente 2000 colonizadores, la mayoría originarios de Holanda, Alemania y Francia que emigraron al Cabo de Sudáfrica en los siglos XVII y XVIII. El linaje de un individuo con una de las tres mutaciones fue rastreado a un pequeño pueblo de los Países Bajos (Ankijik), que fue el sitio de salida de alguno de los primeros emigrantes hacia Sudáfrica (Defesche *et al.*, 1996). Otra de las tres mutaciones comunes parece que tiene sus orígenes en Inglaterra (Botha & Beighton, 1983). Los sudafricanos tienen frecuencias altas de varios desórdenes genéticos además de la HF ya que en el siglo XIX cuando se movieron hacia el interior del país se mantuvieron aislados de las poblaciones vecinas y mantuvieron un índice de fertilidad bastante alto. Este hecho permitió que la población creciera dramáticamente hasta alcanzar su tamaño actual de 3 millones de personas aproximadamente.

La alta frecuencia de la HF en los judíos askenazis del sur de África se puede atribuir al origen de una población genéticamente aislada de ~ 40,000 lituanos judíos que emigraron hacia Sudáfrica entre los años 1880 y 1910. Bajo dicha hipótesis una mutación identificada en un paciente de Nueva Jersey estuvo presente en 8 de 10 judíos askenazis sudafricanos evaluados. Esta misma mutación comprendió el 35% de las mutaciones en el gen *ldlr* de judíos askenazis de Israel de los cuales el 64% son de origen lituano (Meiner *et al.*, 1991).

En general las poblaciones europeas y las norteamericanas muestran un efecto pleiotrópico de las mutaciones del receptor LDL; cada mutación se encuentra con una frecuencia muy baja y limitada prácticamente a una misma familia. Sin embargo para este fenómeno también existen unas cuantas excepciones. En población finlandesa cuatro alelos mutados se encuentran presentes en el 75 % de las personas con HF (Koivisto *et al.*, 1995). Tres mutaciones responden al 43 % de los receptores LDL deficientes en 476 noruegos heterocigotos para HF (Leren *et al.*, 1997). Una mutación de corte y empalme (splicing) se encontró en el 60 % de los islandeses heterocigotos para HF (Gudnason *et al.*, 1997) y en

Dinamarca el 42% de los individuos con HF tienen una de las tres mutaciones encontradas en esa población (Jensen *et al.*, 1996, 1997).

En otras regiones de Europa se han identificado grupos de pacientes con HF no relacionados entre ellos que comparten el mismo alelo mutado. En Grecia por ejemplo, el 60 % de 150 heterocigotos para HF tienen una de las seis diferentes mutaciones (Mavroidis *et al.*, 1997; Traeger-Synodinos *et al.*, 1998). En la región de Aragón en España dos mutaciones se encuentran presentes en el 30% de pacientes con HF de forma heterocigota (Cenarro *et al.*, 1996). En Manchester y en la parte sur de Inglaterra existen dos mutaciones cada una con una frecuencia del 10 % aproximadamente (Descamps *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1992). Y por último en Japón, el 30 % de los heterocigotos para HF tienen una de las cinco diferentes mutaciones de las cuales ninguna tiene una frecuencia mayor al 15% (Maruyama *et al.*, 1995).

La mayoría de las mutaciones en el gen de la HF (*ldlr*) son altamente penetrantes y el efecto no es dependiente de la edad (Schrott *et al.*, 1972), es decir más del 95% de las personas que presentan alguna mutación en el gen *ldlr*, tienen un valor de colesterol en plasma mayor que el percentil 95 del valor de la población normal.

4D.- MUTACIONES CAUSANTES DE LA HF

A la fecha se conocen a nivel mundial 840 mutaciones que afectan al gen *ldlr* (Villegier *et al.*, 2002), sin embargo sólo para enero de 2001 se conocían 683 mutaciones, de las cuales el 58.9% eran mutaciones equívocas (cambio de aminoácido), el 21.1% eran rearrreglos menores, el 13.5% eran rearrreglos mayores y por último el 6.6% eran mutaciones en los sitios de corte y empalme. De las 402 mutaciones equívocas encontradas hasta la fecha, sólo el 11.4% ocurren en los sitios CpG. Las mayoría de las mutaciones se han encontrado en dos de los dominios funcionales, el 42% en el dominio de unión al ligando (exónes 2-6) y el 47% en el dominio homólogo al precursor del factor de crecimiento epidermal (exones 7-14) (Heath *et al.*, 2001).

Existen dos bases de datos en internet; *www.umd.necker.fr* (Varret *et al.*, 1997, 1998) y *www.ucl.ac.uk/fhl* (Heath *et al.*, 2001; Wilson, *et al.*, 1998) y varios artículos (Varret *et al.*, 1997, 1998; Day *et al.*, 1997) que describen la mayoría de las mutaciones encontradas en diferentes poblaciones así como sus características (cambio en nucleótidos, en aminoácidos, población, datos clínicos de los pacientes, etc).

Las mutaciones que afectan al gen del receptor de la LDL se han dividido en cinco tipos o clases, dependiendo del efecto fenotípico provocado en la proteína o bien de la función afectada (Figura 6).

Mutaciones de clase 1: Alelos nulos

En este caso diferentes tipos de mutaciones provocan que no exista proteína inmunoprecipitable. Las mutaciones pueden ocurrir en el promotor ocasionando que no se transcriba el gen y pueden ser desde la delección del promotor (Hobbs *et al.*, 1987) así como mutaciones sin sentido, de marco de lectura o de corte y empalme. Se trata de mutaciones graves, con cifras muy elevadas de colesterol en la sangre.

Mutaciones de clase 2: Alelos defectuosos en transporte

La presencia de mutaciones tipo dos en el gen *ldlr* codifican para receptores en donde el transporte del retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi se encuentra alterado. Este tipo de mutaciones se subdivide a su vez en dos categorías (Hobbs *et al.*, 1990):

2 A: Bloqueo completo del transporte

La proteína que se sintetiza es incapaz de transportarse fuera del retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi, es decir en estos casos no se detecta proteína madura de 160 KDa.

2 B: Bloqueo parcial del transporte

La más común de las mutaciones tipo 2B son aquellas en donde una porción variable de la proteína recién sintetizada se transporta hacia el aparato de Golgi a una velocidad más baja de lo normal.

Las mutaciones de tipo 2 ocurren generalmente en los exones que codifican para el dominio de unión al ligando (exones 2-6) y en el dominio homólogo al precursor de EGF (exones 7-14) y son mutaciones sin sentido o deleciones cortas en marco de lectura que alteran el plegamiento de la proteína ya sea de forma parcial o total. La omisión del transporte hacia la superficie, sugiere que las células cuentan con un mecanismo que detecta proteínas mal plegadas y previene su movimiento del retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi (Yamamoto *et al.*, 1986).

La Colección Dallas del grupo del Dr. Michael S. Brown, esta formada por fibroblastos en cultivo obtenidos de biopsias de piel de pacientes con HF no relacionados entre ellos durante un período de 20 años (1972-1992) (Hobbs *et al.*, 1992), aproximadamente el 50% de estas muestras tienen por lo menos una mutación clase 2.

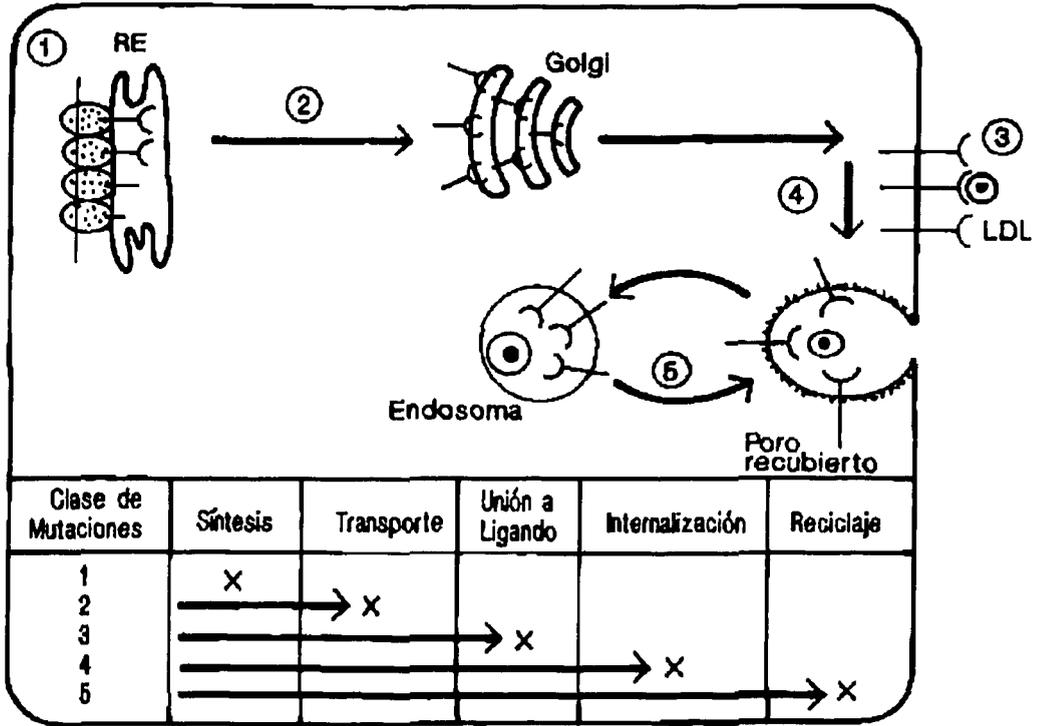
Mutaciones de clase 3: Alelos deficientes en unir al ligando

Los receptores con estas mutaciones se sintetizan, se transportan del retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi y posteriormente hacia la superficie, sin embargo son incapaces de unir a su ligando. La mayoría de estos alelos contienen rearrreglos en el marco de lectura en las repeticiones ricas en cisteínas tanto en el dominio de unión al ligando como en el dominio homólogo al precursor de EGF, sin embargo también inserciones en el primer dominio mencionado pueden dar un fenotipo clase 3. En varias ocasiones un mismo paciente además de presentar mutaciones tipo 2B también presenta la tipo 3, es decir aquellos receptores que lograron llegar a superficie no pueden unir a su ligando.

Mutaciones de clase 4: Alelos deficientes en la internalización

Estudios a través de microscopio electrónico muestran que los receptores clase 4 se encuentran distribuidos de manera difusa en la superficie celular y por lo tanto no se encuentran concentrados en los poros recubiertos (Goldstein *et al.*, 1985a; Goldstein *et al.*, 1979a), por lo que no pueden transportar a la LDL unida a ellos. Este tipo de mutaciones son muy raras pero importantes a nivel histórico ya que mostraron la primera evidencia de

Figura 6.- Clases de mutaciones dependiendo de la función afectada



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(Adaptado de Hobbs *et al.*, 1990)

que los receptores de superficie celular debían de agruparse en los poros recubiertos por clatrina (Brown & Goldstein, 1986; Goldstein *et al.*, 1979a).

Las mutaciones de clase 4 también se han subdividido en dos clases dependiendo de la región afectada de la proteína.

4 A: Mutaciones localizadas únicamente en el dominio citoplasmático (exón 18 y la región 3' del exón 17) (Davis *et al.*, 1986b; Lehrman *et al.*, 1985b; Lehrman *et al.*, 1985a; Lehrman *et al.*, 1987; Aalto-Setela *et al.*, 1989).

4 B: Mutaciones localizadas tanto en el dominio citoplasmático como en el dominio transmembranal (exones 16, 17 y 18) (Hobbs *et al.*, 1990).

Mutaciones de clase 5: Alelos deficientes en reciclaje

Los receptores con este tipo de mutaciones se transportan perfectamente del retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi y de este último hacia la superficie donde unen a su ligando y posteriormente se internalizan. Sin embargo, estos receptores no se pueden reciclar, es decir no pueden localizarse de nuevo en la superficie para unir a otra molécula y transportarla hacia el interior de las células. El dominio homólogo al precursor de EGF (exones 7-14) es el que media la disociación dependiente de ácido del ligando unido al receptor, evento llevado a cabo en el endosoma y esencial para un correcto reciclaje del receptor (Davis *et al.*, 1987). El 22% de las líneas fibroblastoides de la Colección Dallas contienen mutaciones de tipo 5, de las cuales 11 son mutaciones equívocas ubicadas en dicho dominio.

Algo que llama la atención es que dos diferentes mutaciones pertenecientes a la misma clase o tipo de mutación, den lugar a diversos efectos clínicos. Incluso existen datos que muestran que individuos homocigotos para la misma mutación tienen diferente concentración de LDL en plasma y diferente grado de severidad de aterosclerosis coronaria (Rose *et al.*, 1982; Hobbs *et al.*, 1987); uno de los pacientes murió a los tres años de edad a causa de una aterosclerosis coronaria avanzada, mientras que el otro paciente a pesar de que padeció angina de pecho por un largo período de tiempo falleció a los 33 años de edad a causa de un melanoma maligno. Este hecho podría hacer alusión a que otros genes también podrían estar involucrados y jugar papeles importantes. Sin embargo no hay que olvidar a los factores ambientales, especialmente la dieta la cual juega un papel importante, sobretodo en los heterocigotos para HF (Goldstein *et al.*, 2001b).

JUSTIFICACIÓN

Los ataques cardíacos fueron reconocidos hasta el siglo XX en Estados Unidos como un problema de salud pública (Brown & Goldstein, 1996). En México, a lo largo de las tres últimas décadas, la incidencia y la frecuencia de las enfermedades del corazón ha aumentado convirtiéndose en la primera causa de muerte del país (Dir. Gen. Est. Inf. SSA, 2001). Un hecho que resalta este dato es que, a pesar de que en los resultados de la estadística sobre mortalidad en México del año 1999, se utiliza la nueva Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10) donde el paro cardíaco desaparece de las enfermedades cardiovasculares puesto que, tratándose de una forma de morir, no constituye una causa, las enfermedades del corazón siguen ocupando la principal causa de muerte del país (15.6 %) (Dir. Gen. Est. Inf. SSA, 2001).

Estudios realizados en México revelan que en el 22.8% de la población, los valores de colesterol total se encuentran en el límite (5.17-6.20 nmol/l o bien 200-239 mg/dl), mientras que el 10.6% presenta valores arriba de 6.20 nmol/l (240 mg/dl), cifra que sitúa a los pacientes como de alto riesgo de padecer enfermedad coronaria.

Se ha reportado que los valores de colesterol total varían significativamente según la zona geográfica del país; la frecuencia más elevada de alto riesgo para hipercolesterolemia se presenta en Baja California Norte (22.8%), mientras que la frecuencia más baja (4%) pertenece al estado de Guerrero (Posadas-Romero *et al.*, 1995).

Otro estudio, también llevado a cabo en el país, indica que de una muestra representativa de la población mexicana urbana adulta el 11.2% posee valores de colesterol LDL 4.21 nmol/l (162 mg/dl) y el 46.2% de los hombres y el 28.7 % de las mujeres presentan niveles de colesterol HDL por debajo de 0.9nmol/l (35 mg/dl), características favorables para desarrollar enfermedades cardiovasculares (Aguilar-Salinas *et al.*, 2001).

Dadas las cifras mencionadas, las hipercolesterolemias son enfermedades que deben de ser estudiadas; la HF proporciona un excelente modelo para demostrar como la prevención de

las enfermedades se puede facilitar mediante una caracterización a nivel molecular de dicho padecimiento genético.

Debido a que en algunos casos la medición de los niveles de colesterol en los familiares de los pacientes con HF no es suficiente para determinar la presencia o ausencia de la enfermedad, últimamente se han utilizado estudios de ultrasonografía en el tendón de Aquiles se utilizan para complementar el diagnóstico clínico (Descamps *et al.*, 2001). Sin embargo, un examen de ADN es de mucha utilidad sobre todo en aquellos individuos que no muestren valores de colesterol LDL elevado. De hecho el examen de ADN ha permitido una evaluación más exacta acerca del riesgo absoluto a padecer una enfermedad cardiovascular asociado a la HF (Schuster, 2002).

Una de las ventajas que ofrece el diagnóstico molecular de la enfermedad dentro de una familia donde se conoce el defecto genético, es que se obtiene una respuesta certera y binaria excluyente (sí ó no) sobre el padecimiento, ya que después de todo, las concentraciones de colesterol en los individuos pueden estar variando continuamente. También permite conocer la presencia del padecimiento desde el nacimiento. El diagnóstico molecular es una prueba definitiva para caracterizar el trazo familiar y útil para diferenciar a los pacientes de alto riesgo (Schuster & Luft, 1998), ya que si se espera a que aquellos individuos susceptibles desarrollen y presenten los síntomas antes de decidir en tratarlos, las consecuencias podrían ser en ocasiones fatales (Brown & Goldstein, 1996). Por lo tanto es importante hacer y crear conciencia de la medicina preventiva.

Debido a que las mutaciones en el gen *ldlr* varían considerablemente entre las poblaciones, el primer requisito para implementar una prueba genética a nivel nacional para diagnosticar la HF es genotipificar a la población en cuestión para el gen *ldlr* (Fouchier *et al.*, 2001).

A partir de que se identificó el gen y se clonó una porción del ARN mensajero del receptor LDL en el año de 1983 (Russell *et al.*, 1983), comenzó la caracterización de las mutaciones presentes en el gen *ldlr* en pacientes con HF (Lehrman *et al.*, 1985b), hecho que se sigue reportando actualmente a nivel mundial; se han realizado estudios masivos (todos los

exones con una gran muestra de individuos) (García-García *et al.*, 2001; Kuhrova *et al.*, 2002; Hattori *et al.*, 2002; Khoo *et al.*, 2000), diversos estudios con individuos de una población específica pero de diferente ascendencia y edades (Leitersdorf *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2001, Assouline *et al.*, 1995), análisis que incluyen únicamente el promotor del gen (Mozas *et al.*, 2002), uno (Pongrapeeporn *et al.*, 2001b) o varios exones (Tatishcheva *et al.*, 2001), un dominio (Pongrapeeporn *et al.*, 2001a), un caso único (Takahashi M. *et al.*, 2001) o bien una mutación *de novo* (Pisciotta *et al.*, 2002).

Es sorprendente que en un lapso de año y medio la base de datos *UMD-LDLR* ha aumentado un 40% (Villager *et al.*, 2002), hecho que demuestra el esfuerzo mundial que se esta llevando a cabo.

Sin embargo en México, y prácticamente en toda Latinoamérica (Salazar *et al.*, 2002) el trabajo que ahora se presntasta es el primer estudio que se realiza con respecto a la caracterización de las mutaciones presentes en el gen *ldlr* en personas que padecen HF diagnosticada clínicamente.

La HF debería servir como paradigma de la medicina molecular, ya que se conoce y se entiende el defecto genético, se cuentan con las herramientas necesarias para identificar aquellos individuos que tienen alto riesgo de padecer la enfermedad ya que poseen el defecto genético y aún más existen terapias que pueden prevenir, en este caso, las enfermedades del corazón (Schuster, 2002).

OBJETIVO GENERAL

Conocer y analizar genotípicamente de manera parcial una muestra de la población mexicana diagnosticada clínicamente con hipercolesterolemia familiar para el gen *ldlr*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar tres de los dieciocho exones (6, 14 y 17) que constituyen al gen *ldlr* por ser representativos de los dominios que forman parte del receptor LDL maduro.

Determinar la frecuencia de mutaciones en estos 3 exones del gen *ldlr* en una muestra de población mexicana con hipercolesterolemia familiar.

Establecer si las mutaciones encontradas en estos 3 exones del gen *ldlr*, se han reportado en otra población, o son nuevas.

MATERIAL Y MÉTODOS

PACIENTES CON HF

Se obtuvieron muestras de sangre de 110 pacientes diagnosticados clínicamente con HF y de 12 controles sanos; de las 110 muestras de los pacientes con HF, 18 de ellas fueron proporcionadas por la Unidad de Rehabilitación Cardíaca del Hospital de Cardiología del Instituto Mexicano del Seguro Social Siglo XXI, mientras que las 92 restantes y los controles sanos fueron proporcionados por el Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, de la Secretaría de Salud Ambiental.

De los 110 pacientes con HF, 72 son de sexo femenino y 38 son de sexo masculino. Varios son familiares entre sí, por lo que se puede decir que se estudiaron a 50 familias o bien a 50 individuos no relacionados entre sí.

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO (Lahiri & Nurnberger, 1991)

Colectar 5 ml de sangre total en tubos vacutainer que contengan 100 µl de EDTA al 15%. Transferir posteriormente la sangre a tubos de centrifugado de 15 ml.

Congelar la muestra a -72°C., descongelar la muestra de sangre por lo menos dos veces antes de que sea procesada.

Añadir 5 ml de la solución A (Tris-HCl 10mM pH 7.6, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM y EDTA 2 mM) y 125 µl de Nonidet P-40. Mezclar varias veces por inversión.

Centrifugar a 2200 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Decantar el sobrenadante despacio y añadir 5 ml de solución A para lavar el botón, centrifugar igual que el paso anterior. Repetir el lavado una vez más.

Resuspender cuidadosamente el botón en 800 µl de la solución B (Tris-HCl 10mM pH 7.6, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 0.4M y EDTA 2 mM) y transferirlo a un tubo eppendorf.

Añadir 50 µl de SDS al 10% y mezclar la suspensión pipeteando varias veces.

Incubar a 55°C durante 10 minutos.

Añadir 600 μ l de NaCl 3M, mezclar bien.

Centrifugar a 12000 rpm en microfuga a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Recuperar el sobrenadante y dividirlo en dos partes en tubos eppendorf.

A cada tubo agregar 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente.

Invertir el tubo varias veces hasta que se formen las hebras de ADN.

Con una pipeta pasteur obtener las hebras de ADN de los dos tubos y transferirlas a un tubo eppendorf que contenga 1 ml de etanol al 70% frío.

Centrifugar a 12000 rpm a 4°C en microfuga durante 20 minutos.

Decantar con mucho cuidado lo más que se pueda del sobrenadante. En horno de vacío evaporar el resto de etanol por 20 minutos aproximadamente.

Resuspender el botón en 500 μ l de agua bidestilada estéril previamente calentada a 60°C.

Incubar a 65°C durante 15 minutos.

Cuantificar la muestra de ADN por espectrofotometría a una longitud de onda de 260/280 nm (1 D.O._{260 nm} equivale a 50 mg/ml de ADN).

En un gel de agarosa al 0.8% (agarosa, solución amortiguadora TBE 0.5 X y 5 μ l de una solución de bromuro de etidio a una concentración de 10mg/ml por cada 100 ml de volumen final) correr 2 μ l de la muestra ADN con 1 μ l de colorante 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilen cyanol FF 0.25% y Ficoll tipo 400 15% en agua) y como solución amortiguadora de corrida TBE 0.5 X (Tris-borato 0.045 M y EDTA 0.001 M). El gel se corre a 100 volts constantes durante 45 minutos.

Diluir la muestra de ADN a una concentración de 100 ng/ μ l.

Almacenar la muestra a -20°C.

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos se diseñaron en las secuencias correspondientes a los intrones que flanquean a los exones 6, 14 y 17 respectivamente, a una distancia entre 40 y 60 pb del inicio y término de los exones.

Exón 6

Oligonucleótido Sentido

5'- CAC CTG ACC TTC CTC CTT C -3'

Oligonucleótido Antisentido

5'- CCC CAC AAA CTC TGC AAG CC -3'

Oligonucleótido Antisentido Largo

5' GAA TCG CTT GAA CCT GGG - 3'

Exón 14

Oligonucleótido Sentido

5'- GCT GAT GAT CTC GTT CCT GCC C -3'

Oligonucleótido Antisentido

5'- CAG TTG GAG GAC ACA GGA CGC AG -3

Exón 17

Oligonucleótido Sentido

5'- CAC GGA GCT GGG TCT CTG GTC - 3'

Oligonucleótido Antisentido

5'- TCG GCC TGG TCC CTT GAG G - 3'

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

(PCR: POLYMERASE CHAIN REACTION)

Los 3 exones se amplificaron por separado por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.

Reacción de 15 µl:

Concentración final

Solución amortiguadora para PCR 10X

(Tris-HCl 200mM pH 8.4 y KCl 500 mM)

1 X

DMSO	10 %
MgCl ₂ 50mM	1.5 mM
Mezcla de dNTP 10 mM	0.2 μM c/uno
Oligo Sentido	150 ng
Oligo Antisentido	150 ng
ADN genómico	200 ng
ADN Polimerasa <i>TaqPlatinum</i>	0.375 unidades
[α- ³² P]dCTP ♣	0.72μCi
Agua bidestilada estéril para alcanzar los 15 μl	

♣ Únicamente cuando el *PCR* vaya a ser utilizado para *SSCP*, no para secuencia.

PROGRAMA UTILIZADO EN EL TERMOCICLADOR

Para llevar a cabo la reacción de PCR en el termociclador se utilizó un programa de cuatro fases. La primera fase del programa tiene una duración de cuatro minutos y medio a una temperatura de 95°C. La segunda fase se compone por una repetición de 30 ciclos, cada ciclo con 3 subfases; 95°C, temperatura específica para cada exón (Tabla 4) y 72°C con duración de treinta segundos cada una. La tercera fase se lleva a cabo a 72°C durante cinco minutos. Por último, la cuarta fase es a 4°C infinitamente (Figura 7).

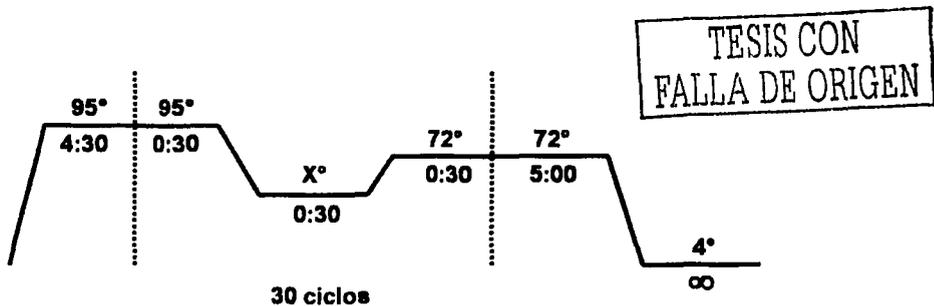


Figura 7.- Programa utilizado para llevar a cabo el PCR

Tabla 4.- Temperaturas específicas para amplificar cada exón

Exón	X °C	Pares de bases (pb)
6	52	199
6 largo	55	376
14	56	241
17	56	302

Verificar la amplificación de los productos de PCR en geles de agarosa al 1.8%

***POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA
(SSCP; SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM)***

(Humphries *et al.*, 1997; Bailey, 1995; Sambrook *et al.*, 1989)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se realiza la electrofóresis de los productos de PCR marcados radioactivamente, diluidos y desnaturalizados en geles de poliacrilamida de 30 x 40 cm. y 0.4 mm. de grosor.

MUESTRAS (pacientes y controles)

a) 7 μ l de la reacción de PCR más 168 μ l de solución desnaturalizante (EDTA 10mM y SDS 0.1%).

b) 7 μ l de la dilución *a* más 7 μ l de colorante-formamida (formamida 95%, Xylen cyanol 0.25% y Azul de bromofenol 0.25%).

Calentar las diluciones *b* a 95°C durante 5 minutos. Posterior e inmediatamente incubar las muestras en hielo.

CONTROLES SIN DESNATURALIZAR

Dos de las muestras al azar

a') 2 μ l de la reacción de PCR más 48 μ l de buffer TE (Tris-HCl 10mM y EDTA 0.1%).

b') 7 μ l de la dilución a' más 7 μ l de colorante-glicerol (Glicerol 30% en agua, Xylen cyanol 0.25% y Azul de bromofenol 0.25%).

Cargar 2.5 μ l de las diluciones b y b' en el gel de poliacrilamida en condiciones nativas al 6% (Tabla 5) con peine de dientes de tiburón.

Tabla 5.- Gel de poliacrilamida al 6% en condiciones nativas

Gel de Poliacrilamida al 6%	100 ml
Agua	70 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 %	20 ml
TBE 10X	10 ml
Persulfato de amonio al 10% £	330 μ l
Temed £	75 μ l

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

£ Adicionar justo al momento de hacer el gel

TBE 10X (Por 100 ml de solución final : 108g. Tris base, 55g. ácido bórico y 40 ml EDTA 0.5M pH 8)

Correr el gel a 4 Watts constantes con solución amortiguadora TBE 0.5 X durante un periodo de 10 a 14 horas o bien hasta que el frente de corrida salga del gel.

Transferir el gel a papel de cromatografía *Whatman* y secarlo una hora a 80°C en un secador de geles. Exponer el gel a una película de rayos X en cassettes de alta emisión y dejarlo a -72°C por un periodo de 7-15 días.

Para revelar la película de rayos X, sumergirla en revelador (*developer and replenisher GBX Kodak* al 5.2%) durante 5 minutos. aproximadamente o hasta que se vean las bandas,

enjuagarla en agua y sumergirla en solución fijadora (*fixer and replenisher GBX Kodak* al 21.7%), enjuagarla de nuevo en agua y dejarla secar.

PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Los productos de PCR que vayan a ser secuenciados se purifican mediante el kit “Rapid PCR purification System” de Gibco.

A 100 μ l de reacción de PCR adicionar 400 μ l de la solución de unión H1 (guanidina hidrociorada concentrada, EDTA, Tris-HCl, e isopropanol)*, mezclar bien con vortex y pasarlo a la columna[†], la cual debe de estar dentro del tubo de lavado de 2 ml[†].

Centrifugar a 12000 rpm a temperatura ambiente en microfuga durante 1 minuto, desechar la solución recuperada.

Añadir 700 μ l del buffer de lavado (NaCl, EDTA, Tris-HCl, etanol absoluto)* a la columna la cual de nuevo debe de estar dentro del mismo tubo de lavado.

Centrifugar a 12000 rpm a temperatura ambiente en microfuga durante 1 minuto, desechar la solución recuperada y centrifugar una vez más en las mismas condiciones.

Transferir la columna a un tubo eppendorf y adicionar 80 μ l de agua bidestilada estéril precalentada a 70°C. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos y centrifugar a 12000 rpm a temperatura ambiente en microfuga durante 2 minutos.

En horno de vacío a 50°C concentrar la muestra a un volumen final de 20 μ l.

Correr 4 μ l de la muestra para verificar los productos en un gel de agarosa al 1.8%.

* Fórmula secreta de Gibco BRL

† Material provisto por el kit

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SECUENCIACIÓN

La secuenciación automática de los productos de PCR se llevó a cabo en un secuenciador marca ABIPRISM modelo 3100 versión 3.7 en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular en colaboración con la Dra. Laura Ongay.

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA

Las secuencias fueron analizadas con la ayuda del programa de computación *DNAMAN para Windows*, versión 2.6 y fueron comparadas con las secuencias reportadas en la base de datos GenBank® del National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (NLM) y del National Institute of Health (NIH) (NCBI-NLM-NIH) y de la base de datos Universal Mutation Database (UMD-LDLR).

La numeración utilizada para los nucleótidos y los codones del LDLR es la descrita por Yamamoto (Yamamoto *et al.*, 1984) y la nomenclatura para las mutaciones es de Beaudet y de Dunnen (Beaudet & Tsui, 1993; Dunnen & Antonarakis, 2001).

POLIMORFISMO DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP; RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

Los productos de PCR del exón 6 se digieren con la enzima de restricción *Nsi I* a 37°C durante 14 horas. El sitio de restricción que reconoce la enzima es:

5'... A T G C A[^]T ... 3'

3'... T[^]A C G T A ... 5'

Reacción de 25 µl:

Concentración final

Solución amortiguadora para *Nsi I* 10X

(NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, pH 8.4 @ 25°C)

Producto de PCR

Enzima de restricción *Nsi I*

Agua bidestilada estéril para alcanzar los 25 µl

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1 X

10 µl

5 unidades

Después de que se lleva a cabo la restricción, se corren los 25 µl de la reacción en un gel de agarosa al 3%.

RESULTADOS

EXONES 14 Y 17

El exón 14 pertenece al dominio homólogo al precursor del factor de crecimiento epidérmico. Constituye la repetición C y la última parte del dominio. Codifica para 52 aminoácidos, de los cuales seis son residuos de cisteínas. Este dominio sirve para posicionar al dominio de unión al ligando en la superficie celular y se requiere para la disociación del receptor y la lipoproteína en el endosoma.

El exón 17 codifica para 53 aminoácidos. El extremo 5' del exón codifica para una parte del dominio transmembranal y el extremo 3' codifica para la primera región del dominio citoplasmático, la cual es importante para que se lleve a cabo la endocitosis

Los análisis de SSCP para el exón 14 y para el exón 17 de las 109 muestras de los pacientes con HF, no revelaron ningún patrón de migración diferente en comparación de las muestras de los pacientes sanos como controles, así como tampoco presentaron diferencias en el patrón de migración entre las mismas muestras para cada exón respectivamente.

Para descartar la presencia de falsos negativos debido a que la confiabilidad de la técnica es de ~80-90% en condiciones óptimas en comparación de otros métodos que sirven para detectar mutaciones puntuales desconocidas (como heteroduplex y electroforesis en gel con gradiente desnaturante mejor conocido como DGGE por sus siglas en inglés) (Screening for mutations, 2002), se secuenciaron de manera automática los productos amplificados de 6 muestras del exón 14 (HF: 14, 50, 82, 87, 94 y 96) y de 3 muestras del exón 17 (HF: 45, 65 y 75) las cuales parecían migrar muy ligeramente más abajo. En ambos casos todas las secuencias de dichas muestras presentaron un 100% de homología con la secuencia reportada en las bases de datos de secuencias, hecho que nos brindó una alta confiabilidad.

El SSCP del exón 17 reveló la presencia de un falso positivo (HF 112) ya que a pesar de que la migración de las bandas era diferente al de los demás casos, se realizó un segundo SSCP y secuencia automática. El SSCP resultó normal y la secuencia no presentó ningún cambio de base.

EXÓN 6

El exón 6 codifica para 42 aminoácidos, dando lugar a la séptima repetición del dominio de unión al ligando. Al igual que todas las repeticiones también posee seis residuos de cisteínas que forman tres puentes disulfuro entre ellos

Los análisis de SSCP para el exón 6 de las 109 muestras de los pacientes con HF, mostraron que ocho de ellas (Figura 8) tenían un patrón de bandeo y de migración anormal o diferente en comparación de las muestras de los demás pacientes y de los pacientes sanos como controles.

Figura 8.- SSCP del exón 6 del gen *ldlr*.



En la figura se aprecian tres de las ocho muestras que presentan un patrón de bandeo y migración diferente a los demás.

Con fines de organización y simplificación las ocho muestras fueron reenumeradas individualmente y por familia para su posterior referencia (Tabla 6).

Tabla 6.- Numeración original y nueva de los pacientes que presentaron bandeo y migración anormal en el estudio de SSCP para el exón 6.

No. identificador del paciente (<i>original</i>)	No. identificador del paciente (<i>nuevo</i>)	Identificador de la Familia	Parentesco
HF 15	HF1	A	Hija
HF 115	HF2		Madre
HF98	HF3	B	Hija
HF99	HF4		Madre
HF100	HF5		Padre
HF69	HF6	C	Primos
HF 1	HF7		hermanos
HF 20	HF8	D	-

Los datos clínicos de los pacientes que mostraron cambios en la secuencia se muestran a continuación en la Tabla 7.

Los productos de PCR del exón 6 de las ocho muestras se secuenciaron de manera automática mostrando los siguientes cambios en la secuencia:

Pacientes HF1 y HF2 (Familia A)

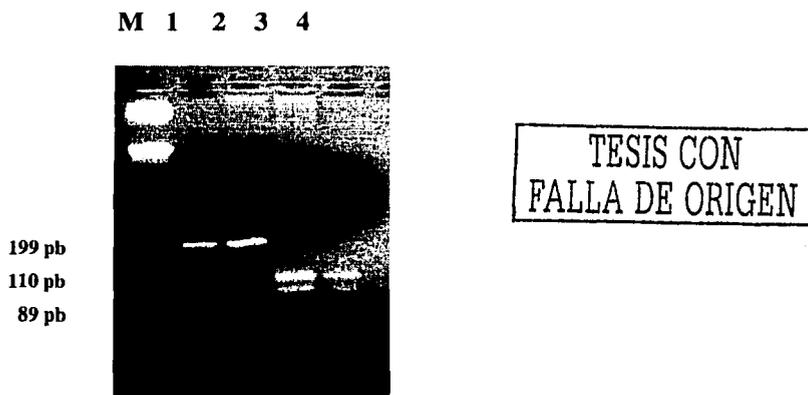
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ambas muestras presentan una transición de T → C de manera heterocigota para la posición 865 de nucleótidos del ADN complementario (cDNA) del LDLR. La mutación ocasiona la conversión del codón 268 TGC que codifica para cisteína por el codón CGC que codifica para arginina en la proteína. La sustitución ocurre en uno de los dos alelos de cada paciente (Figura 9). Dicha mutación denominada C268R es nueva, ya que no se encontró reportada en ninguna otra población analizada a nivel mundial.

Para confirmar el cambio de base se realizó el ensayo de RFLP con la enzima *Nsi I* en los productos de PCR del exón 6. La enzima al reconocer el sitio de restricción 5'...A T G C A[^]T...3' presente en dicho exón del receptor, genera dos productos en pacientes sin la mutación, uno de 110 pb y el otro de 89 pb. Por el contrario, cuando ocurre el cambio de T → C de manera heterocigota, se pierde el sitio de restricción en el alelo afectado.

El patrón de restricción confirmó la transición, ya que en los pacientes HF1 y HF2 se observan tres bandas: la primera banda corresponde a un tamaño de 199 pb que corresponde al alelo mutado, en el cual se perdió el sitio de restricción a causa del cambio de base y las otras dos bandas de 110 y 89 pb respectivamente corresponden al alelo silvestre. En los pacientes controles sólo se observan las dos bandas de menor tamaño (Figura 10).

Figura 10.- RFLP del exón 6 con la enzima de restricción *Nsi I*.

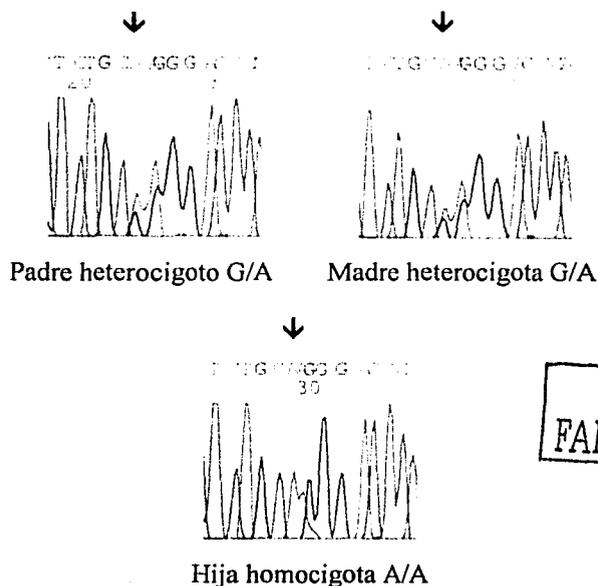


Los carriles 1 y 2 corresponden a las muestras de los pacientes HF1 y HF2 respectivamente, en donde la banda de 199 pb corresponde al alelo mutado debido a que el sitio de restricción se perdió a causa de la mutación. Los carriles 3 y 4 corresponden a muestras de pacientes controles.

Pacientes HF3, HF4 y HF5 (Familia B)

Las tres muestras presentan una transición de G → A, de manera heterocigota en los padres (HF4 y HF5) y de manera homocigota en la hija (HF3) (Figura 11). Dicho cambio se localiza en la posición 829 de nucleótidos del ADN complementario (cDNA) del LDLR. La mutación ocasiona la conversión del codón 256 GAG que codifica para glutamato por el codón GTG que codifica para lisina en la proteína. Los padres sólo presentan la mutación en uno de los dos alelos, mientras que la hija la presenta en ambos. Dicha mutación, E256K, ya ha sido reportada con anterioridad en población sueca (Ekstrom *et al.*, 1995), española (Cenarro *et al.*, 1998), cubana de ascendencia española (Pereira *et al.*, 1995), belga (Descamps *et al.*, 1997), del sureste de Asia (Khoo *et al.*, 2000) e italiana (Bertolini *et al.*, 2000).

Figura 11.- Histograma de la secuencia automática del exón 6 de la familia B.



Por otro lado se ha encontrado que estos mismos pacientes también presentan la mutación W(-18)X en el exón 1 (Comunicación Personal, Dra. Alejandra Huerta-Zepeda), lo cual indica que ambas mutaciones se encuentran en el mismo alelo [W(-18)X ; E256K], esta doble mutación ha sido reportada en tres pacientes de población española (Cennarro *et al.*, 1997; Mozas *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2002).

Pacientes HF6 y HF7 (Familia C)

Ambos pacientes presentan la mutación E256K de manera heterocigota. La mutación E256K es la misma que se encontró en la familia B. Posteriormente se logró colectar sangre de un familiar más con HF, HF7bis el cual es la tía paterna de HF7 (Tabla 7). Dicha muestra también presenta la misma mutación. Los integrantes de esta familia también presentan la mutación W(-18)X del exón 1 en el mismo alelo. A pesar de que hasta el momento sólo se cuenta con tres muestras de la familia C, 11 miembros de ésta padecen HF.

Paciente HF 8 (Familia D)

El análisis de la secuencia del exón 6 del paciente HF8 mostró la presencia de cinco variaciones en la secuencia, de las cuales cuatro son cambios puntuales y el otro es una deleción de dos pares de bases. Los cinco cambios ocurren de manera heterocigota y debido a que la deleción y las mutaciones observadas dentro del exón se localizaban en la parte final del producto amplificado del exón 6, resultaba difícil su caracterización exacta sobre todo en la secuencia con el oligonucleótido antisentido, por lo que se diseñó otro oligonucleótido localizado 159 pb río abajo del oligonucleótido antisentido original. Este producto de mayor tamaño permitió analizar con más claridad los datos (Figura 12a y 12b), así como detectar con claridad la mutación en el intrón (Figura 13a y 13b).

I.- La primera substitución se refiere a una transición de A → G en la posición 932 a nivel de nucleótidos (Figura 12b), lo cual ocasiona la conversión del codón 290 AAA que codifica para lisina por el codón AGA que codifica para arginina en la proteína.

Figura 12a.- Histograma de la secuencia sentido del exón 6 del paciente HF8.

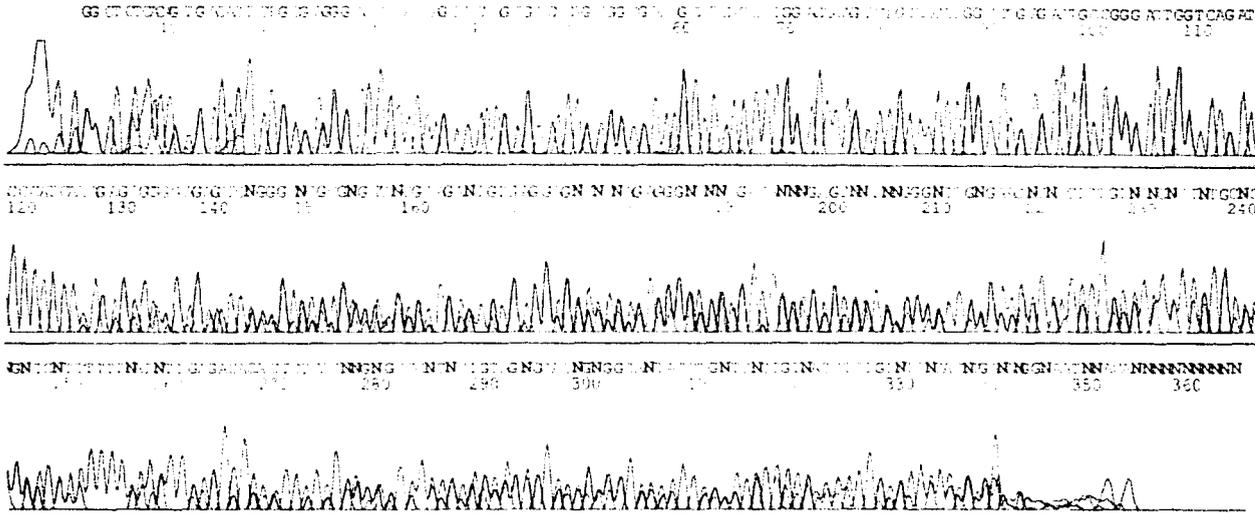
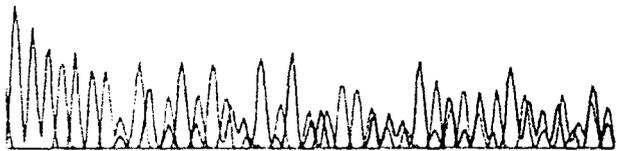


Figura 12b.- Acercamiento a la región donde se presentan las mutaciones.



CGCCGACGAGAGGGGGGAGGCTGNGGGG NCGCGNGGCGND
 120 130 140 150 160



Tres cambios heterocigotos: A/G A/T T/C y una deleción CG

I II III IV

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

La mutación K290R ya ha sido reportada con anterioridad en población francesa y alemana (Loux *et al.*, 1992).

II.- El segundo cambio es una transversión de A → T en el nucleótido 935 (Figura 12b) provocando que el codón 291 con secuencia GAG que codifica para glutamato cambie a GTG y por lo tanto codifique para valina; este cambio, denominado E291V no ha sido reportada en ninguna otra población.

III .- El tercer cambio corresponde a una transición de T → C en el nucleótido 935 (Figura 12b), el cual causa que el codón 292 que codifica para una cisteína con la secuencia TGC, codifique ahora para una arginina con la secuencia CGC, el nombre de esta posible mutación es C292R.

IV.- La delección encontrada afecta a los nucleótidos CG localizados en la posición 939 y 940 respectivamente de un solo alelo, por lo cual se denomina 939delCG. La secuencia a partir de ese punto muestra dos bases diferentes para un mismo sitio (Figura 12a y 12b), lo cual se debe a la misma delección; el histograma de un alelo va dos pares de bases desfasado a comparación del otro (Figura 14). La C deletada corresponde a la tercera posición del codón 292 que codifica para una cisteína y la G pertenece a la primera base del siguiente codón 293 que codifica para una glicina. Sin embargo la segunda y tercera base de ese último codón para glicina pertenecen al exón 7, la delección ocasiona por consecuencia que ocurra un cambio en el marco de lectura a partir del codón 292, convirtiendo a éste en triptófano (C292W) y ocasionando un codón de término prematuro en el codón 309.

Al obtener de manera teórica, la secuencia reversa complementaria a partir de la secuencia propuesta del paciente HF8 (Figura 14), esta concuerda de manera exacta con la secuencia antisentido (Figura 13a). De hecho los tres cambios puntuales del exón y la delección se aprecian mejor.

V.- El cambio de secuencia en el intrón 6 se refiere a la transición G → A, la cual ocurre de manera heterocigota en el nucleótido 936 + 40, dicha variación nunca antes se había

reportado. Debido a la deleción que ocurre, resulta difícil leer la secuencia sentido a partir de ésta, sin embargo en la secuencia antisentido se logra apreciar muy bien el cambio en el intrón (Figura 13a y 13b).

Figura 14.- Comparación de la parte final del exón 6; paciente HF8 vs control.

Secuencia de paciente control

Alelo I GAA CCC ATC AAA GAG TGC G GTGAGTCTCGGT

Alelo II GAA CCC ATC AAA GAG TGC G GTGAGTCTCGGT

Secuencia del paciente HF8

Alelo I GAA CCC ATC AAA GAG TGC G GTGAGTCTCGGT

Alelo II GAA CCC ATC AGA GTG CGG T GAGTCTCGGT

Secuencia reversa complementaria del paciente HF8

Alelo I ACCGAGACTCACCGCACTCTTTGATGGGTTC

Alelo II ACCGAGACTCACCGCACTCTGATGGGTTC

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En este modelo, para simplificación todas las variaciones se presentan en un mismo alelo, sin embargo en realidad unas pueden ocurrir e un alelo y el resto en el segundo alelo.

Al analizar las secuencias del abuelo materno, de los padres y de los dos hermanos de la paciente HF8, ninguno de los integrantes de esta familia presentó dichas variaciones a pesar de que varios de ellos muestran niveles de colesterol superiores a los valores normales (Tabla 8).

Tabla 8.- Perfil lipídico (mg/dl) de integrantes de la Familia D

Parentesco de HF8	CT	C-LDL	C-HDL	TG	
HF8	1068	1010	35	113	CT.- Colesterol Total
Hermano	284	222	47	73	C-LDL.- Colesterol LDL
Madre	342	246	32	318	C-HDL.- Colesterol HDL
Abuelo Materno	256	187	35	169	TG.- Triglicéridos

DISCUSIÓN

De manera general, una mutación es un cambio heredable en una secuencia particular a comparación de la secuencia de referencia. Sin embargo, de manera más específica se considera una mutación cuando el cambio en la secuencia tiene algún efecto en el fenotipo, por el contrario si el cambio no altera el fenotipo se dice que es un cambio neutral conocido como polimorfismo (Cotton & Scriver, 1998). Para que un cambio en la secuencia de ADN sea validado como tal, más del 1% de la población lo debe de presentar (Brookes, 1999).

En una era en donde la detección de mutaciones esta aumentando, es importante evaluar los requisitos que se necesitan para determinar si una mutación es causante de alguna enfermedad, es decir, si un cambio en la secuencia de ADN modifica el fenotipo y si es necesariamente un componente causante de alguna enfermedad.

En el gen *ldlr* existen 45 polimorfismos (UMD-LDLR), en la región codificante (exones) se han detectado 21 polimorfismos, en los intrones se han detectado 9 y en las regiones que flanquean al gen se han encontrado 15 polimorfismos. Existen solamente tres casos en donde el polimorfismo consiste en un cambio de aminoácido (Weiss *et al.*, 1998; Lombardi *et al.*, 1997), el resto de los polimorfismos encontrados en los exones son cambios de base que no modifican al aminoácido por afectar la tercera posición del codón. En estos tres casos, el cambio de secuencia no cosegrega con la hipercolesterolemia dentro de las familias estudiadas y también se han encontrado en personas normolipídicas.

Debido al gran aumento de mutaciones encontradas en varios genes se han sugerido algunos criterios para determinar si un cambio en la secuencia es en realidad una mutación (Cotton & Scriver, 1998), siendo las siguientes:

- El tipo de mutación: aquellas que cambien el marco de lectura u ocasionen codones de término prematuros, generalmente alteran el fenotipo.
- Análisis extenso del gen en cuestión: con esto se descarta la presencia de alguna otra mutación que en realidad sea la causante de la enfermedad.
- Pruebas de cosegregación: que la mutación y el fenotipo se presenten de manera conjunta.
- Por el aminoácido afectado: los aminoácidos conservados generalmente tienen alguna función importante en la proteína. Si los aminoácidos conservados se reemplazan a causa

de una mutación, por aminoácidos con características físicas diferentes, es más probable que se altere la estructura y por lo tanto la función de la proteína.

- La frecuencia de la mutación: el cambio en la secuencia no debe de estar presente en personas sanas o en aquellos individuos que no presenten la enfermedad de estudio.

- Y por último, los análisis de expresión y funcionalidad: con estas pruebas se corrobora si la mutación tiene la capacidad de modular el fenotipo.

Es de esperarse que la mutación C268R, la cual nunca antes se ha reportado, sea la responsable de que los pacientes HF1 y HF2 (Familia A) padezcan hipercolesterolemia familiar ya que sus datos clínicos de colesterol son similares entre sí y muestran un cuadro clínico característico de dicha enfermedad (Tabla 7) y en ninguno de los controles sanos se encontró dicho cambio, el cual elimina la tercera cisteína de la séptima repetición del dominio de unión al ligando. Los residuos de cisteína juegan un papel crucial para el correcto plegamiento de la proteína por formar puentes disulfuro. La cisteína 268 es un residuo conservado entre diferentes especies como xenopus 1 y 2, hamster, rata y conejo (Mehta *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1986). Las propiedades físicas de la cisteína y de la arginina son diferentes, la cisteína es un aminoácido polar no cargado, mientras que la arginina está cargado positivamente. De hecho, la mayoría de las cisteínas del dominio de unión al ligando se encuentran mutadas en pacientes con HF (34 de 42 ó bien el 80%) por los aminoácidos tirosina, arginina, triptófano, serina, fenilalanina, glicina y por codones de términos, ocupando arginina el segundo lugar (Tabla 8); 17 de las 42 cisteínas del dominio de unión al ligando cambian por arginina y en 2 de ellas (C88R y C152R) se sabe que se ocasiona un fenotipo de alelos deficientes en transporte parcial (Hobbs *et al.*, 1992), es decir mutación de tipo 2B. La mayoría de las mutaciones clase 2 que se localizan en el dominio de unión al ligando son mutaciones equívocas que afectan a residuos conservados, destacando los residuos de cisteínas y la secuencia consenso cargada negativamente (SDE) la cual se encuentra al final de cada repetición (Hobbs *et al.*, 1992). Como la mayoría de las mutaciones que afectan al dominio de unión al ligando son de tipo 2, se cree que las células cuentan con un mecanismo que detecta proteínas mal plegadas y previene su movimiento del retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi (Yamamoto *et al.*, 1986)

El hermano de la paciente HF1, el cual radicaba en Brasil falleció a los 42 años de edad a causa de un accidente cardiovascular durante la realización del trabajo, por lo que fue imposible conseguir una muestra de sangre, sin embargo también padecía HF. A parte de este hermano, varios familiares de la paciente HF1 también padecen la enfermedad; abuela materna, dos hermanas de su mamá, dos hermanas de ella y 3 sobrinos. Con el propósito de confirmar si la mutación C268R cosegrega con la enfermedad y por lo tanto es la responsable de que integrantes de la familia A padezcan HF, se analizará una muestra de sangre de todos los miembros de la familia para un estudio de ADN. De igual manera, la paciente HF1 tiene dos hijos pequeños a los que también se les pretende tomar muestra de sangre tanto para un perfil lipídico como para un estudio de ADN con el fin de saber si heredaron la mutación y mantenerlos bajo observación médica.

Con respecto a las familias B y C, se ha observado que en población sueca la mutación E256K también cosegrega con otra mutación del exón 9 denominada I407T en el mismo alelo [E256K ; I407T] (Lind *et al.*, 1998), sin embargo estudios de expresión muestran que la mutación E256K *in vitro* por sí sola no ocasiona un efecto modulador detectable a nivel de fenotipo, mientras que I407T sí lo hace (Ekstrom *et al.*, 2000). Sin embargo, los autores no descartan la posibilidad de que *in vivo* el fenotipo si se vea alterado al interactuar el receptor mutado (E256K) con otros factores ambientales o genéticos (como por ejemplo el genotipo de la apolipoproteína E). De hecho, concluyen que a primera vista ambas mutaciones [E256K ; I407T] deben de considerarse patogénicas ya que ninguna se encontró en pacientes sanos y ambas cosegregan con el fenotipo de hipercolesterolemia. Incluso de manera teórica proponen que el glutamato 256 es un residuo importante para la proteína por estar situado junto a una cisteína.

La paciente HF3 es el primer caso reportado con estas dos mutaciones de manera homocigota [W(-18)X ; E256K] + [W(-18)X ; E256K], hecho que explica sus altos niveles de colesterol a pesar de su corta edad (Tabla 7).

Ninguna de las variaciones observadas en la paciente HF 8 se encontraron en los pacientes sanos como controles.

A pesar de que el residuo glutamato 291 (E291) nunca se ha visto afectado por mutaciones

Tabla 9.- Análisis de las 42 cisteínas del dominio de unión al ligando.

Repetición	Exón	Cisteína	Arg	Tyr	Trp	Stop	Ser	Phe	Gly
1	2	6			*				
		13							
		18							
		25						*	
		31			*				
		42	*						
2	3	47							
		54		*					
		61		*		*			
		68	*	*	*				
		74	*			*	*		*
		83							*
3	4	88	*	*			*		
		95	*					*	
		100							
		107							
		113	*		*	*		*	
		122	*	*		*			
4	4	127		*	*				
		134	*			*			*
		139		*					*
		146		*		*			
		152	*	*	*	*			*
		163	*	*	*				
5	4	176	*	*				*	
		183							
		188		*					
		195							
		201		*		*		*	
		210		*		*			*
6	5	215	*						
		222	*						
		227		*				*	*
		234	*						
		240						*	
		249	*	*					
7	6	255	*	*	*	*			
		263	*						
		268							
		275				*			
		281		*	*				
		292		*	*	*			
TOTAL		42	17	20	9	12	3	7	6

El número de las cisteínas corresponde a los codones y el * se refiere a que se ha encontrado mutado por el aminoácido correspondiente

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

puntuales, se encuentra conservado, excepto en hamster entre diferentes especies (Mehta *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1986) y se localiza junto a una cisteína, las cuales son importantes para la estructura del receptor. El glutamato es un aminoácido cargado negativamente mientras que la valina es no polar y alifático.

La última cisteína de la séptima repetición del dominio de unión al ligando (C292) se ha encontrado mutado por tirosina (C292Y) en población británica (Day *et al.*, 1997) y sueca (Lind *et al.*, 1998), por triptófano (C292W) en población francesa y belga (Descamps *et al.*, 1997) y a codón de término (C292X) en población griega (Hobbs *et al.*, 1992), sin embargo nunca antes se había detectado un cambio a arginina. Como ya se mencionó anteriormente, las cisteínas son residuos conservados e importantes para la estructura terciaria de la proteína y muchas de las mutaciones ya reportadas en residuos de cisteínas cambian por arginina (Tabla 8). Dicha cisteína, al igual que la 268 esta conservada entre especies (Mehta *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1986).

En caso de que la mutación C292R y la delección 939delCG ocurrieran en el mismo alelo, el cambio en el marco de lectura empezaría a partir del codón 293. De esta manera el codón 292 permanecería como arginina y no como triptófano, con la diferencia de que la secuencia codificante sería CGG y no CGC como en la mutación original. El codón de término quedaría igual que en el caso en que, tanto la mutación C292R y la delección 939delCG ocurrieran en alelos diferentes, es decir en el codón 309.

A pesar de que la delección afecta a los dos últimos nucleótidos del exón 6, es de esperarse que el proceso de corte y empalme (splicing) no se afecte ya que el sitio de splicing donador 5' GT no cambia, simplemente ocurre dos pb antes en uno de los dos alelos.

El intrón 6 mide 3135 pb y contiene 9 repeticiones *Alu* (Amellem *et al.*, 2002), sin embargo solo se ha reportado un sitio polimórfico detectado con la enzima de restricción *Sph I* (Leitersdorf *et al.*, 1989a), de tal manera que el cambio G → A 936 + 40 podría ser el segundo polimorfismo del intrón 6, sin embargo como los controles no se secuenciaron hasta esa parte del intrón no se sabe si este cambio también ocurre con una frecuencia mayor al 1% en personas sanas.

La Familia D, por la línea materna presenta en el exón 4 de manera heterocigota las mutaciones C88R y C163W en el mismo alelo (Comunicación Personal Dra. Alejandra Huerta-Zepeda), sin embargo la paciente HF8 es el único integrante de la Familia D con valores de colesterol LDL por arriba de los 1000 mg/dl (Tabla 8), lo que indica que además de esta doble mutación en el exón 4, dicha paciente también presenta otras mutaciones que hacen que sus niveles de colesterol se eleven drásticamente. Debido a que todos los cambios (exón 4 y exón 6) ocurren de manera heterocigota y por sus niveles de colesterol, la paciente HF8 es un heterocigoto compuesto (dos alelos afectados por distintas mutaciones).

El hecho de que los familiares de la paciente HF 8 no presenten los cambios en el exón 6 se puede deber a dos causas esencialmente, a no paternidad o a mutaciones *de novo*. La primera opción podría indicar que la paciente HF8 heredó todas las mutaciones del exón 6 de su padre biológico. Por el contrario, en caso de que el estudio de paternidad resulte positivo se puede decir que las mutaciones ocurrieron *de novo*. Incluso habría que considerar, si todos los cambios del exón 6 se presentan en el mismo alelo; es decir, si las mutaciones *de novo* ocurrieron en sólo una línea germinal y en cuál de las dos. En caso de que los cambios en la secuencia del exón 6 se presentaran en ambos alelos respectivamente, esto indicaría que las mutaciones ocurrieron *de novo* en ambas líneas germinales.

De los cinco cambios encontrados en la paciente HF 8, cuatro son nuevos y una mutación que previamente se ha reportado en población francesa y alemana (K290R), sin embargo dicha paciente es indígena y físicamente no parece tener rasgos característicos de esa zona europea. Esto refuerza la idea de que las mutaciones ocurrieron *de novo*, así como también indica que una misma mutación puede ocurrir en diferentes poblaciones sin relación.

A pesar de que existen alrededor de 840 mutaciones reportadas en la literatura del gen *ldlr*, sólo existen 5 reportes de mutaciones *de novo* en dicho gen (Kotze *et al.*, 1995; Koivisto *et al.*, 1997; Cassanelli *et al.*, 1998; Thiart *et al.*, 2000; Pisciotta *et al.*, 2002). El hecho de que existan tan pocas mutaciones *de novo* en el gen *ldlr* documentadas es sorprendente si lo

comparamos con el gran número de mutaciones encontradas hasta la fecha para este gen y por la presencia de varios sitios frágiles (hot spots) propensos a mutaciones (dinucleótidos CG, repeticiones cortas directas e invertidas en secuencias codificantes y el gran número de secuencias *Alu*).

Es probable que la baja frecuencia aparente de mutaciones *de novo* en el gen que codifica para el receptor de la LDL simplemente refleje la vía de selección de los pacientes, ya que en ausencia de una historia familiar con síntomas característicos de la HF, el paciente sea mal diagnosticado y por ende su muestra no se analice (Cassanelli *et al.*, 1998).

Otro factor importante es que muchas veces solamente se toma a un solo miembro de cada familia para el estudio y en caso de presentar alguna mutación se estudia al resto de la familia, este procedimiento ayuda en el sentido de reducir las muestras, sin embargo disminuye en gran medida la posibilidad de encontrar mutaciones *de novo*.

A pesar de que en una primera instancia es raro este caso (múltiples mutaciones *de novo* en la paciente HF8), en la literatura existen varios reportes de diversos pacientes con dobles mutaciones en un mismo alelo en el gen *ldlr* (Kotze *et al.*, 1997; Cenarro *et al.*, 1997; Lind *et al.*, 1998; Ebhardt *et al.*, 1999; Van Leuven *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2002), de hecho en un caso ambas mutaciones ocurren en el exón 6 [K290R ; C292W] (Van Leuven *et al.*, 2001). Algo que llama la atención es que en este paciente (HF8) los residuos K290 y C292 también se encuentran alterados, siendo sólo en un caso la misma mutación, K290R y C292R. En la literatura también existe un heterocigoto compuesto con cuatro mutaciones en el gen *ldlr*, dos en cada alelo (Castillo *et al.*, 2002). Un hecho que hace pensar que las dobles mutantes no sean tan raras, es que en el gen *CFTR*, responsable de fibrosis quística, también se han encontrado en un mismo alelo dos y hasta tres mutaciones causantes de la enfermedad (Savov *et al.*, 1995).

Es sorprendente que cada vez que se evalúa al gen *ldlr* para una población distinta, por lo general aparecen mutaciones nuevas; tal pareciera que va a llegar un momento en que casi la mayoría de los aminoácidos se encontrarán cambiados por otros. El alto contenido de repeticiones *Alu* en el gen *ldlr* puede reflejar los mecanismos de expansión genómica mediante retroposición de secuencias *Alu* en este locus. Poco después de que se clonó el

gen *ldlr*, los primeros experimentos de Southern blot revelaron que las repeticiones *Alu* darían lugar a entrecruzamientos irregulares durante la recombinación meiótica y a grandes rearrreglos génicos, dando así lugar a la HF; estos grandes rearrreglos se han venido observando en pacientes con HF (Lehrman *et al.*, 1985a; Lehrman *et al.*, 1987). Incluso hay un reporte de un paciente con HF que presenta la duplicación de los exones 13, 14 y 15 del gen *ldlr*. Se cree que esta duplicación es el resultado de un entrecruzamiento irregular durante la recombinación meiótica entre secuencias repetidas, localizadas en el intrón 12 y 15 del gen (Lelli *et al.*, 1991). A pesar del gran número de repeticiones intragénicas *Alu* que teóricamente favorecen a muchos entrecruzamientos irregulares (>4000) y a grandes rearrreglos, la mutagénesis natural puede generar algún grado de divergencia en las secuencias de ADN para prevenir de esta manera que dichos eventos de recombinación no sean tan frecuentes como se observa en la actualidad en pacientes con HF (Amsellem *et al.*, 2002). De tal manera que la alta frecuencia de mutaciones que afectan al gen *ldlr* se puede ver desde un punto de vista preventivo o bien como un mecanismo de defensa para evitar los entrecruzamientos irregulares y los grandes rearrreglos.

Otros aspectos que indirectamente se benefician a partir de este tipo de estudios en diferentes poblaciones son las cuestiones íntimamente ligadas con el paciente. Herramientas nuevas para el diagnóstico, pronóstico o tratamiento han modificado la manera en que enfermedades frecuentes y silenciosas se manejen a nivel clínico. De hecho, las dislipoproteinemias se encuentran dentro de las enfermedades pioneras en la medicina del nuevo milenio, las cuales progresivamente evolucionan desde una medicina basada en hechos hasta la prevención individualizada (Benlian, 2001).

Actualmente existen métodos específicos para diagnosticar pacientes de alto riesgo a padecer HF con base en un análisis de 19 mutaciones comunes. Este tipo de estudios es útil para poblaciones en donde ya se conocen las mutaciones frecuentes o bien donde estas son altamente recurrentes (Baron *et al.*, 1996). En España, la Fundación de Hipercolesterolemia Familiar esta por sacar un biochip genético con el propósito de diagnosticar de manera rápida a pacientes con HF. Sin embargo, al igual que el caso anterior es necesario el

conocimiento previo de las mutaciones más frecuentes que afectan a la población (Fundación Hipercolesterolemia Familiar, 2002).

También se han desarrollado técnicas más sofisticadas, en cuanto a diagnóstico, como es la fusión del receptor de la LDL con la proteína verde fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) para así poder determinar a manera de tiempo real y con más exactitud la localización de los receptores con mutaciones específicas las cuales ocasionan proteínas defectuosas (Holst *et al.*, 2001).

Uno de los mayores retos con este tipo de estudios es poder predecir con base en la mutación, la historia cardiovascular que presentara el paciente. Sin embargo dentro de los pacientes heterocigotos para HF existe una variación substancial tanto en la severidad de la hipercolesterolemia como en el comienzo de la aterosclerosis (Smilde *et al.*, 2001). De hecho, existen reportes que muestran que sólo una parte de la variabilidad del fenotipo se explica con los defectos en el gen *ldlr* (Sun *et al.*, 1998) y que el tipo de mutación no influye en tal variabilidad (Sijbrands *et al.*, 2000). Efectivamente, al ser la aterosclerosis una enfermedad compleja, existen otros componentes genéticos y ambientales que intervienen como factores de riesgo (Lusis, 2000; Stein *et al.*, 2002).

En cuanto al tratamiento de la HF existen métodos innovadores en investigación como es la terapia génica, ya sea por transducción de vectores retrovirales que contengan el cDNA del *ldlr* junto con un gen de expresión hepática específico y un segundo vector con un promotor constitutivo para corregir la deficiencia de receptor en los fibroblastos (Pages *et al.*, 1996) o bien por inyección intravenosa del adenovirus recombinante deficiente en replicación con el gen *ldlr* y con el promotor del citomegalovirus (Ishibashi *et al.*, 1993). También existen otros modelos de transferencia génica mediante liposomas (Tomita *et al.*, 2002) o por células epiteliales amnióticas de humano (Takahashi S. *et al.*, 2001). A pesar de que la terapia génica del *ldlr* ha mostrado resultados asombrosos a nivel de investigación, aún existen metas para hacerla más efectiva y poderla aplicar en pacientes con HF, tales como incrementar la eficiencia en la transducción y desarrollar vectores más

seguros que proporcionen una expresión más duradera del gen (Pages *et al.*, 1996; Rader, 2001).

Un asunto que es importante y no hay que olvidar es el aspecto psicosocial de la HF, ya que existen severas diferencias entre hacer tamizaje para enfermedades, tales como el hipotiroidismo neonatal, y hacer tamizaje para determinar el riesgo de padecer una enfermedad. Tal es el caso de la HF y de una futura enfermedad cardiovascular, aún cuando el riesgo a padecer la enfermedad sea extremadamente alto (Ose, 1999). Es importante tomar en cuenta que existen casos en donde se habla de un gen dominante con capacidad de suprimir la HF; ciertos pacientes de una misma familia muestran niveles normales de colesterol LDL a pesar de tener una mutación en el gen *ldlr* la cual ocasiona que el receptor sea deficiente y que el resto de la familia padezca HF (Hobbs *et al.*, 1989). De hecho también se habla de un nuevo locus responsable de HF en el cromosoma 1 (Varret *et al.*, 1999).

Los pacientes con HF tienen que enfrentarse al problema de ser identificados como enfermos, lo que dificulta la obtención de un empleo y de un seguro. El médico del paciente se enfrenta al problema ético de la necesidad de informar a los familiares y al problema de la asesoría acerca de la procreación (Ose, 1999), siendo este último punto más severo cuando ambos padres poseen la enfermedad.

CONCLUSIONES

- ❖ Las secuencias de los exones 14 y 17 del gen *ldlr* de los pacientes mexicanos analizados con hipercolesterolemia familiar no presentan alteraciones.
- ❖ Dentro de la muestra analizada de pacientes mexicanos con hipercolesterolemia familiar, el exón 6 del gen *ldlr* representa una región importante debido a la variedad de mutaciones encontradas (Tabla 9). La mutación E256K se encontró con mayor frecuencia.
- ❖ En las familias B y C ahora será fácil poder determinar quienes de sus integrantes padecen hipercolesterolemia familiar a partir de un diagnóstico molecular, incluso desde recién nacidos.
- ❖ En la familia A, después de estudios de cosegregación de la mutación con el fenotipo de colesterol elevado, también se podrá saber con certeza quiénes de sus integrantes padecen hipercolesterolemia familiar desde un punto de vista molecular.
- ❖ El paciente HF 8 resulta un excelente ejemplo de las grandes modificaciones que pueden afectar al gen *ldlr* en personas que padecen hipercolesterolemia familiar.
- ❖ Es importante evaluar a todos los integrantes de una misma familia que padezcan hipercolesterolemia familiar con métodos de pre-diagnósticos (como SSCP) con el propósito de no omitir las mutaciones *de novo*.
- ❖ La hipercolesterolemia familiar es un buen modelo para empezar a utilizar y aplicar la medicina molecular.

Tabla 10.- Mutaciones encontradas

Exón/ Intrón	Posición nucleótidos	codón	Codón WT	Codón mutado	Evento	Dominio afectado	Nombre mutación	AA WT	AA Mut	Genotipo	pac
Ex 6	865	268	TGC	CGC	T → C	UL rep. 7	C268R	Cys	Arg	Het	
Ex 6	829	256	GAG	AAG	G → A	UL rep. 7	E256K	Glu	Lys	Het	
Ex 6	829	256	GAG	AAG	G → A	UL rep. 7	E256K	Glu	Lys	Hom	
Ex 6	932	290	AAA	AGA	A → G	UL rep. 7	K290R	Lys	Arg	Het	
Ex 6	935	291	GAG	GTG	A → T	UL rep. 7	E291V	Glu	Val	Het	
Ex 6	937	292	TGC	CGC	T → C	UL rep. 7	C292R	Cys	Arg	Het	
Ex 6	937	292	TGC	del2c	Stop codon 309	UL rep. 7	939delCG	Cys	Fr	Het	
In 6	940+36	-	-	-	G → A	-		-	-	Het	

WT.- Wild Type (silvestre)

UL.- Unión al Ligando

rep.- repetición

AA.- aminoácido

Mut.- mutado

Het.- heterocigoto

Hom.- homocigoto

S.- sueca

E.- española

B.- belga

I.- italiana

Ase.- sureste de Asia

F.- francesa

A.- alemana

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PERSPECTIVAS

Para poder establecer con absoluta certeza si las variaciones encontradas en la paciente HF8 son mutaciones y si son *de novo* primero habrá que evaluar paternidad, para descartar que las haya heredado de su padre biológico. Segundo, mediante subclonas, establecer la localización exacta de los múltiples cambios encontrados en la paciente HF8 en los alelos. Con esto se podrá saber qué cambios ocurren en cada uno de los alelos correspondientes, y así señalar si se presentan como dobles o hasta triples.

Para considerar a las variaciones encontradas en la paciente HF8, como mutaciones reales y causantes de hipercolesterolemia familiar severa, habrá que realizar para cada mutación por separado ensayos de expresión del receptor en superficie celular en respuesta a diferentes concentraciones de colesterol intracelular, así como también ensayos de funcionalidad, lo cual incluye capacidad de unir al ligando, internalización con el mismo, y de reciclaje. Sería interesante evaluar cosegregación en la descendencia, sin embargo su corta edad (Tabla 7) dificulta el asunto.

Los estudios de expresión y de funcionalidad del receptor con las mutaciones nuevas encontradas, ayudaran a clasificar el tipo o clase de mutaciones que son.

Debido a la cantidad de mutaciones encontradas en el exón 6 del gen *ldlr* en pacientes con hipercolesterolemia familiar resultaría importante e interesante evaluar a más pacientes para este exón, con el fin de tener una muestra un poco más representativa.

Esta recolección de más muestras también implica a la mayor cantidad posible de integrantes de las familias en donde ya se detectaron mutaciones.

La evaluación del intrón 6 en pacientes controles sanos mostraría si el cambio encontrado en dicho intrón corresponde a un polimorfismo, o si bien tiene un efecto a nivel de fenotipo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aalto-Setälä, K., Helve, E., Kovanen, P. and Kontula, K., (1989) **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 phenotype.** *J Clin Invest.* 84 : 499-505
- Aguilar-Salinas, C., Olaiz, G., Valles, V., Ríos, J., Gómez, F., Rull, J., Rojas, R., Franco, A. and Sepúlveda, J., (2001) **High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in Mexican nationwide survey.** *J Lipid Res.* 42 : 1298-1307
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J., (1994) **Vesicular traffic in the secretory and endocytic pathways (Transport from the plasma membrane via endosomes: endocytosis).** En *Molecular Biology of the Cell*, Chapter 13-19, pp. 618-626, New York: Garland Publishing, Inc. 3ª ed.
- Amsellem, S., Briffaut, D., Carrié, A., Rabès, J., Girardet, J., Fredenrich, A., Moulin, P., Krempf, M., Reznik, Y., Vialettes, B., de Gennes, J., Brukert, E. and Benlian, P., (2002) **Intronic mutations outside Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia.** *Hum Genet.* 111 : 501-510
- Anderson, D., (1997a) **Arcus corneae.** En *Diccionario enciclopédico ilustrado en medicina Dorland*, Vol I, pp 144, Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 28ª ed.
- Anderson, D., (1997b) **Hiperlipoproteinemias.** En *Diccionario enciclopédico ilustrado en medicina Dorland*, Vol I, pp 940-941, Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 28ª ed.
- Assouline, L., Levy, E., Feoil-Fonseca, J., Godbout, C. and Lambert, M., (1995) **Familial hypercholesterolemia: molecular, biochemical and clinical characterization of a French-Canadian pediatric population.** *Pediatrics.* 96 : 239-246
- Bailey, A., (1995) **Single-stranded conformational polymorphisms.** In *PCR Strategies*, ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand and J. J. Sninsky, chapter 9, pp. 121-129, USA: Academic Press.
- Baron, H., Fung, S., Aydin, A., Baring, S., Luft, F. and Schuster, H., (1996) **Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the diagnosis of familial hypercholesterolemia.** *Nature Biotech.* 14 : 1279-1282
- Baron, R., (2001) **Anomalías de los Lípidos.** En *Diagnóstico Clínico y Tratamiento*, ed. L. M. Tierney, Jr., S. J. Mcphee y M. A. Papadakis, Capítulo 28, pp. 1197-1208, México: Manuel Moderno, 36ª ed.
- Basu, S., Goldstein, J., Anderson, R. and Brown, M., (1981) **Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblast.** *Cell.* 24 : 493 – 502
- Beaudet, A. and Tsui, L., (1993) **A suggested nomenclature for designating mutations.** *Hum Mutat.* 2 : 245-248
- Benlian, P., (2001) **[New progress and new tools for the study of molecular genetics in dyslipoproteinemia].** *Bull Acad Natl Med.* 185 : 21-31
- Berge, K., Tian, H., Graf, G., Yu, L., Grishin, N., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R. and Hobbs, H., (2000) **Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters.** *Science.* 290 : 1771-1775
- Bertolini, S., Cantafora, A., Averna, M., Cortese, C., Motti, C., Martini, S., Pes, G., Postiglione, A., Stefanutti, C., Blotta, I., Pisciotta, L., Roller, M., Langheim, S., Ghisellini, M., Rabbone, I. and Calandra, S., (2000) **Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor**

- gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. *Arterioscler Tromb Vasc Biol.* 20 : E41-E52**
- Björkhem, I., Muri, K. and Leitersdorf, E., (2001) **Inborn error in bile acid biosynthesis and storage of sterols other than cholesterol.** In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, Volume II, ed. C.R. Scriver, A. L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, B. Childs, K.W. Kinzler and B. Vogelstein, Chapter 123, pp. 2961-2988. New York: McGrawHill. 8th ed.
- Botha, M. and Beighton, P., (1983) **Inherited disorders in the Afrikaner population of southern Africa. Part I. Historical and demography background, cardiovascular, neurological, metabolic and intestinal conditions. *S Afr Med J.* 64 : 609-612**
- Brookes, A., (1999) **The essence of SNPs. *Gene.* 234 : 177-186**
- Brown, M., Dana, S. and Goldstein, J., (1974) **Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblast. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 249 : 789-796**
- Brown, M., Faust, J. and Goldstein, J., (1975a) **Role of the low density lipoprotein receptor in regulating the content of free and esterified cholesterol in human fibroblast. *J Clin Invest.* 55 : 783-793**
- Brown, M. and Goldstein, J., (1975b) **Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblast. *Cell.* 6 : 307-316**
- Brown, M., Anderson, R. and Goldstein, J., (1983) **Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell.* 32 : 663-667**
- Brown, M. and Goldstein, J., (1985) **The receptor model for transport of cholesterol in plasma. *Ann NY Acad Sci.* 454 : 178-82**
- Brown, M. and Goldstein, J., (1986) **A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232 : 34-47**
- Brown, M. and Goldstein, J., (1990) **Lipoprotein receptors: therapeutic implications. *J Hypertens.* 8 (Suppl 1) : S33-S36**
- Brown, M. and Goldstein, J., (1996) **Heart Attacks: Gone with the century? *Science.* 272 : 629**
- Cassanelli, S., Bertolini, S., Rolleri, M., De Stefano, F., Casarino, L., Elicio, N., Naselli, A. and Calandra S., (1998) **A "de novo" point mutation of the low-density lipoprotein receptor gene in an Italian subject with primary hypercholesterolemia. *Clin Genet.* 53 : 391-395**
- Castillo, S., Reyes, G., Tejedor, D., Mozas, P., Suárez, Y., Lasuncion, M., Cénarro, A., Civeira, F., Alonso, R., Mata, P. and Pacovi, M., (2002) **A double mutant [N543H + 2392del9] allele in the LDL receptor gene in Familial Hypercholesterolemia: effect on plasma cholesterol levels and cardiovascular disease. Mutation in Brief # 558. Online. *Hum Mutat.* 20 : 447**
- Cénarro, A., Jensen, H., Civeira, F., Casao, E., Ferrando, J., Gonzalez-Bonillo, J., Pocovi, M. and Gregersen, N., (1996) **Two novel mutations in the LDL receptor gene: common causes of familial hypercholesterolemia in Spanish population. *Clin Genet.* 49 : 180-185**
- Cénarro, A., Jensen, H., Casao, E., Civeira, F., Gonzalez-Bonillo, J., Rodríguez-Rey, J., Gregersen, N. and Pocovi, M. (1997) **Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in Spanish patients with Familial Hypercholesterolemia. Mutation in Brief # 135. Online. *Hum Mutat.* 11 : 413**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Chen, W., Goldstein, J. and Brown, M., (1990) **NPXY, a sequence often found in cytoplasmatic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor.** *J Biol Chem.* 256 : 3116-3123

Cotton, R. and Scriver C., (1998) **Proof of "disease causing" mutation.** *Hum Mutat.* 12 : 1-3

Cummings, R., Kornfeld, S., Schneider, W., Hobgood, K., Tolleshaug, H., Brown, M. and Goldstein, J., (1983) **Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor.** *J Biol Chem.* 258 : 15261-15273

Davis, C., Elhammer, A., Russell, D., Schneider, W., Kornfeld, S., Brown, M. and Goldstein, J., (1986a) **Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblast.** *J Biol Chem.* 261 : 2828-2838

Davis, C., Lehrman, M., Russell, D., Anderson, R., Brown, M. and Goldstein, J., (1986b) **The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors.** *Cell.* 45 : 15-24

Davis, C., Driel, I., Russell, D., Brown, M. and Goldstein, J., (1987a) **The low density lipoprotein receptor.** *J Biol Chem.* 262 : 4075-4082

Davis, C., Goldstein, J., Südhof, T., Anderson, R., Russell, D. and Brown, M., (1987b) **Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region.** *Nature.* 326 : 760-765

Day, I., Whittall, R., O'Dell, S., Haddad, L., Bolla, M., Gudnason, V. and Humphries, S., (1997) **Spectrum of LDL receptor gene mutations in heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Hum Mutat.* 10: 116-127

Defesche, J., Van Diermen, D., Hayden, M. and Kastelein, J., (1996) **Origin and migration of an Afrikaner founder mutation FHAfrikaner-2 (V408M) causing familial hypercholesterolemia.** *Gene Geogr.* 10 : 1-10

Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM., (2000) **Colesterol.** En Apuntes de Bioquímica, <http://laguna.fmedic.unam.mx/~cvazquez/colesterol.html>

Descamps, O., Hondekijn, J., Van Acker, P., Deslypere, J. and Heller, F., (1997a) **Familial hypercholesterolemia and familial apolipoprotein B in Belgium.** *Atherosclerosis.* 130 (supplement) : S26

Descamps, O., Hondekijn, J., Van Acker, P., Deslypere, J. and Heller, F., (1997b) **High prevalence of a novel mutation in the exon 4 of the low-density lipoprotein receptor gene causing familial hypercholesterolemia in Belgium.** *Clin Genet.* 51 : 303-308

Descamps, O., Leysen, X., Van Leuven, F. and Heller, F., (2001) **The use of Achilles tendon ultrasonography for the diagnosis of familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis.* 157 : 514-518

Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, México., (2001) **Principales resultados de la estadística sobre mortalidad en México, 1999.** *Salud Pública de México.* 43 : 67-73

Dunnen, J. and Antonarakis, E., (2001) **Nomenclature for the description of human sequence variations.** *Hum Genet.* 109 : 121-124

Ebhardt, M., Schmidt, H., Doerk, T., Tietge, U., Haas, R., Manns, M., Schmidtke, J. and Stuhmann, M., (1999) **Mutation analysis in 46 German families with Familial Hypercholesterolemia: identification of 8 new mutations.** *Mutation in Brief # 226. Online. Hum Mutat.* 13 : 257

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Eckardstein, A., Nofer, J. and Assmann, G., (2001) **High density lipoproteins and arteriosclerosis role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21 : 13-27
- Ekstrom, U., Abrahamson, M., Sveger, T., Lombardi, P. and Nilsson-Ehle, P., (1995) **An efficient screening procedure detecting six novel mutations in the LDL receptor gene in Swedish children with hypercholesterolemia.** *Hum Genet.* 96 : 147-150
- Ekstrom, U., Abrahamson, M., Sveger, T., Sun, X., Soutar, A., and Nilsson-Ehle, P., (2000) **Expression of an LDL receptor allele with two different mutations (E256K and I402T).** *Mol Patol.* 53 : 31-36
- Esser, V., Limbird, L., Brown, M., Goldstein, J. and Russell, D., (1988) **Mutational analysis of the ligand domain of the low density lipoprotein receptor.** *J Biol Chem.* 263 (26) : 13282-13290
- Family heart association, (2002) **Familial hypercholesterolaemia.**
<http://www.familyheart.org/pages/factpdf/hypefact.pdf>
- Farmer, J. y Gotto, A. Jr., (2001) **Dislipidemia y otros factores de riesgo de la arteriopatía coronaria.** En *Tratado de Cardiología*, Vol II, ed. E. Braunwald, Capítulo 35, pp 1225-1264, México: McGraw-Hill Interamericana, 5ª ed.
- Fass, D., Blacklow, S., Kim, P. and Berger, J., (1997) **Molecular basis of familial hypercholesterolemia from structure of LDL receptor module.** *Nature.* 388 : 691-693
- Fouchier, S., Defesche, J., Umans-Eckenhausen, M. and Kastelein, J., (2001) **The molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands.** *Hum Genet.* 109 : 602-615
- Fundación Hipercolesterolemia Familiar, (2002) **El Biochip.**
<http://www.colesterolfamiliar.com/genetca.html>
- Gaffney, D., Reid, J., Cameron, I., Vass, K., Caslake, M., Shepherd, J. and Packard, C., **Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidemia.** *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 15 : 1025-1029
- García-García, A., Real, T., Puig, O., Cebolla, E., Marín-García, P., Martínez, J., García-Sogo, M., Civera, M., Ascaso, J., Camarena, R., Armengod, E. and Chaves, J., (2001) **Molecular genetic of familial hypercholesterolemia in Spain: Ten novel LDLR mutations and population analysis.** *Hum Mutat.* 18 : 458-459
- García, C., Wilund, K., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Maioli, M., Calandro, S., Bertolini, S., Cossu, F., Grishin, N., Barnes, R., Cohen, J. and Hobbs, H., (2001) **Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein.** *Science.* 292 : 1394-1398
- Goldstein, J., Schrott, H., Hazzard, W., Bierman, E. and Motulsky A., (1973) **Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia.** *J Clin Invest.* 52 : 1544-1568
- Goldstein, J. and Brown, M., (1974a) **Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblast. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia.** *J Biol Chem.* 249 : 5153-5162
- Goldstein, J., Dana, S., and Brown, M., (1974b) **Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblast and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia.** *Proc Natl Acad Sci.* 71 : 4288 – 4292

- Goldstein, J., Dana, S., Faust, J., Beaudet, A. and Brown, M., (1975) **Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblast from patient with cholesteryl ester storage disease.** *J Biol Chem.* 250 : 8487-8495
- Goldstein, J., Sobhani, M., Faust, J. and Brown, M., (1976) **Heterozygous familial hypercholesterolemia: failure of normal allele to compensate for mutant allele at a regulated genetic locus.** *Cell.* 9 : 195-203
- Goldstein, J., Anderson, R. and Brown, M., (1979a) **Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis.** *Nature.* 279 : 679-685
- Goldstein, J. and Brown, M., (1979b) **The LDL receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia.** *Annu Rev Genet.* 13 : 259-289
- Goldstein, J., Brown, M., Anderson, R., Russell, D. and Schneider, W., (1985a) **Receptor-mediated endocytosis: Concepts emerging from the LDL receptor system.** *Annu Rev Cell Biol.* 1 : 1-39
- Goldstein, J. and Brown, M., (1985b) **The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism.** *J. Cell Sci Suppl.* 3 : 131-137
- Goldstein, J. and Brown, M., (1987) **Regulation of low-density lipoprotein receptor: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis.** *Circulation.* 76 : 504-507
- Goldstein, J. and Brown, M., (1990) **Regulation of the mevalonate pathway.** *Nature.* 343 : 425- 430
- Goldstein, J. and Brown, M., (1992) **Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels.** *Eur Heart J.* 13 Suppl B : 34-6
- Goldstein, J. and Brown, M., (2001a) **Molecular Medicine the cholesterol quartet.** *Science.* 292 : 1310-1312
- Goldstein, J., Hobbs, H. and Brown, M., (2001b) **Familial hypercholesterolemia.** In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, Volume II, ed. C.R. Scriver, A. L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, B. Childs, K.W. Kinzler and B. Vogelstein, Chapter 120, pp. 2863-2913. New York: McGrawHill. 8th ed.
- Gómez, F. y Aguilar C. (1996) **Hiperlipoproteinemias primarias.** En *Dislipidemias y aterosclerosis*, ed. Posadas, C. Capítulo 8, pp. 87-104. México: McGrawHill.
- Gotto, A. Jr., Pownall, H. and Havel, R., (1986) **Introduction to the plasma lipoproteins.** *Methods Enzymol.* 128 : 3-41
- Gudnason, V., Sigurdsson, G., Nissen, H. and Humphries, S., (1997) **Common founder mutation in the LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia in the Icelandic population.** *Hum Mutat.* 10 : 36-44
- Hattori, H., Hirayama, T., Nobe, Y., Nagano, M., Kujiraoka, T., Egashira, T., Ishii, J., Tsuji, M. and Emi, M., (2002) **Eight novel mutations and functional impairments of the LDL receptor in familial hypercholesterolemia in the north of Japan.** *J Hum Genet.* 47 : 80-87
- Havel, R. and Kane, J., (2001) **Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins.** In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, Volume II, ed. C.R. Scriver, A. L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, B. Childs, K.W. Kinzler and B. Vogelstein, Chapter 114, pp. 2705-2716. New York: McGrawHill. 8th ed.
- Heath, K., Gahan, M., Whittall, R. and Humphries, S., (2001) **Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolemia: update, new features and mutation analysis.** *Atherosclerosis.* 154 : 243-246

Hegele R., (2001) **Monogenic Dislipidemias: Window on determinants of plasma lipoprotein metabolism.** *Am J Hum Genet.* 69 : 1161-1177

Hobbs, H., Leitersdorf, E., Leffert, C., Cryer, D., Brown M. and Goldstein, J., (1986) **Evidence for a dominant gene that suppresses hypercholesterolemia in a family with defective low density lipoprotein receptors.** *J Clin Invest.* 84 : 656-664

Hobbs, H., Brown M., Russell, D., Davignon, J. and Goldstein, J., (1987) **Deletion in the gene for the low-density lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia.** *N Engl J Med.* 317 : 734-737

Hobbs, H., Russell, D., Brown, M. and Goldstein, J., (1990) **The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: Mutational analysis of a membrane protein.** *Ann Rev Genet.* 24 : 133-170

Hobbs, H., Brown, M. and Goldstein, J., (1992) **Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia.** *Hum Mutat.* 1 : 445-466

Holst, H., Dagnaes-Hansen, F., Corydon, T., Andreasen, P., Jorgensen, M., Kolvraa, S., Bolund, L. and Jensen, T., (2001) **LDL receptor-GFP fusion proteins: new tools for the characterization of disease-causing mutations in the LDL receptor gene.** *Eur J Hum Genet.* 9 : 815-822

Humphries, S., Gudnason, V. and Whitali, R., (1997) **Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia.** *Clin Chem.* 43 : 427-435

Ishibashi, S., Brown, M., Goldstein, J., Gerard, R., Hammer, R. and Herz, J., (1993) **Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery.** *J Clin Invest.* 92 : 883-893

Jenkins, T., Nicholls, E., Gordon, E., Mendelsohn, D., Seftel, H. and Andrew, M., (1980) **Familial hypercholesterolemia – a common genetic disorder in the Afrikaans population.** *S. Afr Med.* 57 : 943-947

Jensen, H., Jensen, L., Hansen, P., Faergeman, O. and Gregersen, N., (1996) **The Trp23-Stop and Trp66-Gly mutations in the LDL receptor gene: common causes of familial hypercholesterolemia in Denmark.** *Atherosclerosis.* 120 : 57-66

Jensen, H., Holst, H., Jensen, L., Jorgensen, M., Andreasen, P., Jensen, T., Andresen, B., Heath, F., Hansen, P., Neve, S., Kristiansen, K., Faergeman, O., Kolvraa, S., Bolund, L. and Gregersen, N., (1997) **A common W556S mutation in the LDL receptor gene of Danish patients with familial hypercholesterolemia encodes a transport-defective protein.** *Atherosclerosis.* 131 : 67-72

Kajinami, K., Mabuchi, H., Ito, H., Michishita, I., Takeda, M., Wakasugi, T., Koizumi, J. and Takeda, R., (1988) **New variant of low density lipoprotein receptor. FH-Tonami.** *Arteriosclerosis.* 8 : 187 – 192

Kane, J., Malloy, M., Ports, T., Phillips, N., Diehl, J. and Havel, R., (1990) **Regression of coronary atherosclerosis during treatment of Familial hypercholesterolemia with combined drug regimens.** *JAMA.* 264 : 3007-3012

Kane, J. and Havel, R. (2001) **Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins.** In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, Volume II, ed. C.R. Scriver, A. L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, B. Childs, K.W. Kinzler and B. Vogelstein, Chapter 115, pp. 2717-2751. New York: McGrawHill. 8th ed.

Kannel, W., Castelli, W., Gordon, T., and McNamara, P., (1971) **Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease.** *Ann Intern Med.* 74: 1-12

Keys, A., (1980) **Seven Countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease.** Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.

Khachadurian, A. and Uthman, S., (1973) **Experiences with homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients.** *Nutr Metab.* 15 : 132-140

Khoo, K., van Acker, P., Defesche, J., Tan, H., van de Kerkhof, L., Heijnen-van, S., Kastelein, J. and Deslypere, J., (2000) **Low-density lipoprotein receptor gene mutations in a Southeast Asian population with familial hypercholesterolemia.** *Clin Genet.* 58 : 98-105

Knipscheer, H., Boelen, C., Kastelein, J., van Diermen, D., Groenemeijer, B., van den Ende, A., Buller, H., Bakker, H., (1996) **Short-term efficacy and safety of pravastatin in 72 children with familial hypercholesterolemia.** *Pediatr Res.* 39 : 867-871

Koivisto, P., Koivisto, U., Miettinen, T. and Kontula, K., (1992) **Diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. DNA analysis complements clinical examination and analysis of serum lipid levels.** *Arterioscler Thromb.* 12 : 584-592

Koivisto, U., Viikari, J. and Kontula, K., (1995) **Molecular characterization of minor gene rearrangements in Finnish patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: identification of two common missense mutations (Gly823→Asp and Leu380→His) and eight rare mutations of the LDL receptor gene.** *Am J Hum Genet.* 57 : 789-797

Koivisto, U., Gylling, H., Miettinen, T. and Kontula, K., (1997) **Familial moderate hypercholesterolemia caused by Asp235→Glu mutation of the LDL receptor gene and co-occurrence of a De novo deletion of the LDL receptor gene in the same family.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17 : 1392-1399

Kotze M., Langenhoven, E., Warnich, L., du Plessis, L. and Retief, A., (1991) **The molecular basis and diagnosis of familial hypercholesterolemia in South African Afrikaners.** *Am Hum Genet.* 55 (Pt 2) : 115-121

Kotze, M., Theart, L., Peeters, A. and Langenhoven, E., (1995) **A de novo duplication in the low density lipoprotein receptor gene.** *Hum Mutat.* 6: 181-183

Kotze, M., Villiers, J., Loubser, O., Thiart, R., Scholtz, C. and Raal, F., (1997) **A double mutant LDL receptor allele in a Cypriot family with heterozygous Familial Hypercholesterolemia.** *Hum Genet.* 100: 101-103

Kuhrova, V., Francova, H., Zapletalova, P., Freiburger, T., Fajkusova, L., Hrabincova, E., Slovackova, R., Kozak, L. and Slovakova, R., (2002) **Spectrum of low density lipoprotein receptor mutations in Czech hypercholesterolemic patients.** *Hum Mutat.* 19 : 80

Kwiterovich, P. Jr., Fredrickson, D. and Levy, R., (1974) **Familial hypercholesterolemia (one form of familial type II hyperlipoproteinemia). A study of its biochemical, genetic and clinical presentation in childhood.** *J Clin Invest.* 53 : 1237-1249

Lahiri, D. and Nurnberger, J. Jr., (1991) **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** *Nuc Acids Res.* 19 : 5444

Lambert, M., Lupien, P., Gange, C., Levy, E., Blaichman, S., Langlois, S., Hayden, M., Rose, V., Clarke, J., Wolfe, B., Clarkson, C., Parsons, H., Stephure, D., Potvin, D. and Lambert, J., (1996) **Treatment of familial hypercholesterolemia in children and adolescents: effect of lovastatin. Canadian lovastatin in children study group.** *Pediatrics.* 97 : 619-628

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Lehrman, M., Schneider, W., Sudhof, T., Brown, M., Goldstein, J. and Russell, D., (1985a) **Mutation in the LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains.** *Science.* 227 : 140-146

Lehrman, M., Goldstein, J., Brown, M., Russell, D. and Schneider, W., (1985b) **Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain.** *Cell.* 41 : 735-743

Lehrman, M., Russell, D., Goldstein, J. and Brown, M., (1987) **Alu-Alu recombination deletes splice acceptor sites and produces secreted low density lipoprotein receptor in a subject with familial hypercholesterolemia.** *J Biol Chem.* 262 : 3354-3361

Leitersdorf, E., Chakravarti, A. and Hobbs, H., (1989a) **Polymorphic DNA haplotypes at the LDL receptor locus.** *Am J Hum Genet.* 44 : 409-421

Leitersdorf, E., Van der Wasthuyzen, D., Coetzee, G. and Hobbs, H., (1989b) **Two common low density lipoprotein receptor gene mutations cause familial hypercholesterolemia in Afrikaners.** *J Clin Invest.* 84 : 954-961

Leitersdorf, E., Tobin, E., Davignon, J. and Hobbs H., (1990) **Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population.** *J Clin Invest.* 85 : 1014-1023

Lelli, N., Ghisellini, M., Calandra, S., Gaddi, A., Ciarrocchi, A., Coviello, D. and Bertolini, S., (1991) **Duplication of exons 13, 14 and 15 of the LDL-receptor gene in a patient with heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Hum Genet.* 86 : 359-362

Leren, T., Tonstad, S., Gundersen, K., Bakken, K., Rodningen, O., Sundvold, H., Ose, L. and Berg, K., (1997) **Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Norway.** *J Intern Med.* 241 : 185-194

Lind, S., Eriksson, M., Rystedt, E., Wiklund, O., Angelin, B. and Eggertsen G., (1998) **Low frequency of the common Norwegian and Finnish LDL-receptor mutations in Swedish patients with familial hypercholesterolemia in Norway.** *J Intern Med.* 244 : 19-25

Lindgren, V., Luskey, K., Russell, D. and Francke, U., (1985) **Human genes involved in cholesterol metabolism: Chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase with cDNA probes.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 82 : 8567-8571

Lombardi, P., Sijbrands, E., Kamerling, S., Gevers Leuven, J. and Havekes, L., (1997) **The T705I mutation of the low density lipoprotein receptor gene(FH Paris-9) does not cause familial hypercholesterolemia.** *Hum Genet.* 99 : 106-107

Loux, N., Saint-Jore, B., Collod, G., Dairou, F., Benlian, P., Truffert, J., Dastugue, B., Douste-Blazy, P., de Gennes, J., Junien, C., et al., (1992) **Screening for new mutations in the LDL receptor gene in seven French familial hypercholesterolemia families by the single strand conformation polymorphism method.** *Hum Mutat.* 1 : 325-332

Lusis, A., (2000) **Atherosclerosis** *Nature.* 407 : 233-241

Mahley, R. and Rall, S. Jr., (2001) **Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism.** In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, Volume II, ed. C.R. Scriver, A. L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, B. Childs, K.W. Kinzler and B. Vogelstein, Chapter 119, pp. 2835-2862. New York: McGrawHill. 8th ed.

Maruyama, T., Miyake, Y., Tajima, S., Harada-Shiba, M., Yamamura, T., Tsushima, M., Kishino, B., Horiguchi, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., (1995) **Common mutations in the low-density-lipoprotein-**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

receptor gene causing familial hypercholesterolemia in Japanese population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15 : 1713-1718

Mavroidis, N., Traeger-Synodinos, J., Kanavakis, E., Drogari, E., Matsaniotis, N., Humphries, S., Day, I. and Kattamis, C., (1997) **A high incidence of mutations in exon 6 of the low-density lipoprotein receptor gene in Greek familial hypercholesterolemia patients including a novel mutation.** *Hum Mutat.* 9 : 274-276

Mehta, K., Chen, W., Goldstein, J. and Brown, M., (1991) **The low density lipoprotein receptor in *Xenopus laevis*. I- Five domains that resemble the human receptor.** *J Biol Chem.* 266 : 10406-10414

Meiner, V., Landsberger, D., Berkman, N., Reshef, A., Segal, P., Seftel, H., van der Westhuyzen, D., Jeenah, M., Coetzee, G. and Leitersdorf, E., (1991) **A common Lithuanian mutation causing familial hypercholesterolemia in Ashkenazi Jews.** *Am J Hum Genet.* 49 : 443-449

Moorjani, S., Roy, M., Gange, C., Davignon, J., Brun, D., Toussaint, M., Lambert, M., Campeau, L., Blauchman, S. and Lupien, P. (1989) **Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec Province.** *Arteriosclerosis.* 9 : 211-216

Mozas, P., Cenarro, A., Civeira, F., Castillo, S., Ros, E. and Pocovi, M., (2000) **Mutation analysis in 36 unrelated Spanish subjects with Familial Hypercholesterolemia: identification of 3 novel mutations in the LDL receptor gene.** *Hum Mutat.* 15 : 483-484

Mozas, P., Galetto, R., Albajar, M., Ros, E., Pocovi, M. and Rodríguez-Rey, J., (2002) **A mutation (-49C>T) in the promotor of the low density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia.** *J Lipid Res.* 43 : 13-18

Müller, C., (1938) **Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris.** *Acta Med Scand (suppl).* 89 : 75-84

NCBI-NLM-NIH : National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine and National Institute of Health.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html> clave de acceso: AF217403

Nevin, N. and Slack, J., (1968) **Hyperlipidaemic xanthomatosis. II. Mode of inheritance in 55 families with essential hyperlipidaemia and xanthomatosis.** *J Med Genet.* 5 : 9-28

Nicoll, C., (2001) **Determinación de fármacos terapéuticos y valores de laboratorio de referencia.** En *Diagnóstico Clínico y Tratamiento*, ed. L. M. Tierney, Jr., S. J. Mcphee y M. A. Papadakis, Apéndice, pp. 1613-1623, Méxio: Manuel Moderno, 36ª ed.

Nissen, H., Hansen, P., Faergeman, O. and Horder, M., (1995) **Mutation screening of the codon 3500 region of the apolipoprotein B gene by denaturing gradient-gel electrophoresis.** *Clin Chem.* 41 : 419-423

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Ose, L., (1999) **An update on familial hypercholesterolemia.** *Ann Med.* 31 Suppl 1 : 13-18

Pages, J., Andreoletti, M., Loux, N., Vons, C., Mahieu, D., Bargy, F., Chapman, J., Briad, P., Franco, D. and Weber, A., (1996) **[Towards gene therapy in familial hypercholesterolemia].** *C R Seances Soc Biol Fil.* 190 : 53-65

Pereira, E., Ferreira, R., Hermelin, B., Thomas, G., Bernard, C., Bertrand, V., Nassiff, H., Menez del Castillo, D., Bereziat, G. and Benlian, P., (1995) **Recurrent and novel LDL receptor gene mutations causing heterozygous familial hypercholesterolemia in La Habana.** *Hum Genet.* 96 : 319-322

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Pisciotta, L., Cantadora, A., De Stefano, F., Langheim, S., Calandra, S. and Bertolini, S., (2002) A "de novo" mutation of the LDL-receptor gene as the cause of familial hypercholesterolemia. *Biochim Biophys Acta.* 1587 : 7-11
- Pongrapeeporn, K., Leowattana, W., Nuchpramool, W., Kerdsaeng, K., Thepsuriyanon, P., Kiertivich, S., Yamwong, P., Ong-Ajyooth, S., Amornrattana, A., Kasemsuk, L., Laungsuwan, S. and Sribhen, K., (2001a) Screening for mutations in exons encoding the ligand-binding domain of the LDL receptor gene using PCR-RFLP and PCR-SSCP. *J Med Assoc Thai.* Suppl 3: S619-S627
- Pongrapeeporn, K., Yamwong, P., Nuchpramool, W., Sribhen, K., Thepsuriyanon, P., Leowattana, W. and Ong-Ajyooth, S., (2001b) Homozygous DNA variants in exon 9 of the LDL receptor gene in a Thai patient with primary hypercholesterolemia phenotype. *Med Assoc Thai.* Suppl 3 : S690-S695
- Posadas-Romero, C., Tapia-Conyer, R., Lerman-Garber, I., Zamora-González, J., Cardoso-Saladaña, G., Salvatierra-Izaba, B. and Sepúlveda-Amor, J., (1995) Cholesterol levels and prevalence of hypercholesterolemia in Mexican adult population. *Atherosclerosis.* 118 : 275-284
- Pownall, H. and Gotto, A. Jr., (1999) Structure and dynamics of human plasma lipoproteins. In *Lipoproteins in Health and Diseases*, ed. D.J. Betteridge, D.R. Illingworth and J. Shepherd, Chapter 1, pp. 6, Gran Bretaña: Arnold
- Pullinger, C., Hennessy, L., Chatterton, J., Liu, W., Love, J., Mendel, C., Frost, P., Malloy, M., Schumaker, V. and Kane, J., (1995) Familial ligand-defective apolipoprotein B. Identification of a new mutation that decreases LDL-receptor binding affinity. *J Clin Invest.* 95 : 1225-1234
- Rader, D., Hoeg, J. and Brewer, B. Jr., (1994) Quantitation of plasma apolipoproteins in the primary and secondary prevention of coronary artery disease. *Ann Intern Med.* 120: 1012-1025
- Rader, D., (2001) Gene therapy for familial hypercholesterolemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 11 Suppl 5 : 40-44
- Rifkind., B, (1982) The plasma lipoproteins. *Angiology.* 33 : 555-561
- Rose, V., Wilson, G. and Steiner, G., (1982) Familial hypercholesterolemia: report of coronary death at age 3 in a homozygous child and prenatal diagnosis in a heterozygous sibling. *J Pediatr.* 100 : 757-759
- Rubinsztein, D., Coetzee, G., Marais, A., Leitersdorf, E., Seftel, H., van der Westhuyzen, D., (1992) Identification and properties of proline664-leucine mutant LDL receptor in South Africans of Indian origin. *J Lipid Res.* 33 : 1647-1655
- Russell, D., Yamamoto, T., Schneider, W., Slaughter, C., Brown, M. and Goldstein, J., (1983) cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein: Feedback regulation of a receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80 : 7501-7505
- Russell, D., Schneider, W., Yamamoto, T., Luskey, K., Brown, M. and Goldstein, J., (1984) Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell.* 37 : 577-585
- Russell, D., Esser, V. and Hobbs, H., (1989) Molecular basis of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis Suppl I.* 9 : I-8 - I-13
- Russell, D., Brown, M. and Goldstein, J., (1989) Different combinations of cysteine-rich repeats mediated binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J Biol Chem.* 264 : 21682-21688
- Salazar, L., Hirata, M., Cavalli, S., Nakandakare, E., Forti, N., Diament, J., Giannini, S., Bertolami, M., Hirata, R., (2002) Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: Identification of seven novel LDLR gene mutations. *Hum Mutat.* 19 : 462-463

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Salen, G., Shefer, S., Nguyen, L., Ness, G., Tint, G. and Shore, V., (1992) **Sitosterolemia.** *J Lipid Res.* 33 : 945-955

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maiatis, T., (1989) **Polyacrilamide gel electrophoresis.** In *Molecular cloning, a laboratory manual*, Volume 1, ed. N. Ford, C. Nolan and M. Ferguson, Chapter 6, pp. 6.36-6.45. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2th ed.

Savov, A., Angelicheva, D., Balassopoulou, A., Jordanova, A., Noussia-Arvanitakis, S. and Kalaydjieva, L., (1995) **Double mutant alleles: are they rare?** *Hum Mol Genet.* 4 : 1169-1171

Scanu, A. and Wisdom, C., (1972) **Serum lipoproteins structure and function.** *Annu Rev Biochem.* 41 : 703-730

Schaefer, E., (2002) **Lipoproteins, nutrition, and heart diseases.** *Am J Clin Nutr.* 75 : 191-212

Schmid, C., (1998) **Does SINE evolution preclude Alu function?** *Nucleic Acids Res.* 26 : 4541-4550

Schmid, S., (1997) **Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: An integrated process.** *Annu Rev Biochem.* 66 : 511-548

Schrott, H., Goldstein, J., Hazzard, W., McGoodwin, M. and Motulsky, A., (1972) **Familial hypercholesterolemia in a large indred. Evidence for a monogenic mechanism.** *Ann Intern Med.* 76 : 711-720

Schuster, H. and Luft, F., (1998) **Clinical criteria versus DNA diagnosis in heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18 : 331-332

Schuster, H., (2002) **High risk/high priority: familial hypercholesterolemia – a paradigm for molecular medicine.** *Atheroscler Suppl.* 2 : 27-32

Screening for mutations., (2002) **Screening methods for detection o unknown point mutations.**
http://www-users.med.cornell.edu/~jawagne/screening_for_mutations.html

Seftel, H., Baker, S., Sandler, M., Forman, M., Joffe, B., Jenkins, T., Mendesohn, D. and Mieny, C., (1980) **A host of hypercholesterolemia homozygotes in South Africa.** *Br Med J.* 281 : 633-636

Seftel, H., Baker, S., Jenkins, T. and Mendesohn, D., (1989) **Prevalence of familial hypercholesterolemia in Johannesburg Jews.** *Am J Med Genet.* 34 : 545-547

Sijbrands, E., Westendorp, R., Lombardi, P., Havekes, L., Frants, R., Kastelein, J. and Smelt, A., (2000) **Additional risk factors influences excess mortality in heterozygous familial hypercholesterolemia.** *Atherosclerosis.* 149 : 421-425

Smidle, T., van Wissen, S., Wollersheim, H., Kastelein, J. and Stalenhoef, A., (2001) **Genetic and metabolic factors predicting risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia.** *Neth J Med.* 59 : 189-195

Soria, L., Ludwig, E., Clarke, H., Vega, G., Grundy, S. and McCarthy, B., (1989) **Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 86 : 587-591

Stein, E., Illingworth, D., Kwiterovich, P. Jr., Liacouras, C., Siimes, M., Jacobson, M., Brewster, T., Hopkins, P., Davidson, M., Graham, K., Arensman, F., Knopp, R., DuJovne, C., Williams, C., Isaacsohn, J., Jacobsen, C., Laskarzewski, P., Ames, S. and Gormley, G., (1999) **Efficacy and safety of lovastatin in adolescent**

males with heterozygous familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *JAMA.* 281 : 137-144

Stein, O., Thierly, J. and Stein, Y., (2002) **Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis?** *Atherosclerosis.* 160 : 1-10

Südhof, T., Goldstein, J., Brown, M. and Russell, D., (1985a) **The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins.** *Science.* 228 : 815-822

Südhof, T., Russell, D., Goldstein, J. and Brown, M., (1985b) **Cassette of eight exons shared by genes for the LDL receptor and EGF precursor.** *Science.* 228 : 893-895

Südhof, T., Russell, D., Brown, M. and Goldstein, J., (1987) **42 pb element from LDL receptor gene confers end product repression by sterols when inserted into a viral TK promoter.** *Cell.* 48 : 1061-1069

Sun, X., Patel, D., Knight, B. and Soutar, A., (1998) **Influence of genotype at the low density lipoprotein (LDL) receptor gene locus on the clinical phenotype and response to lipid-lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolemia. The Familial Hypercholesterolemia Regression Study Group.** *Atherosclerosis.* 136 : 175-185

Takahashi, M., Ikeda, U., Takahashi, S., Hattori, H., Iwasaki, T., Ishihara, M., Egashira, T., Homma, S., Asano, Y. and Shimada, K., (2001a) **A novel mutation in exón 2 of the low-density lipoprotein-receptor gene in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia.** *Clin Genet.* 59 : 290-292

Takahashi, S., Ohsugi, K., Yamamoto, T., Shiomi, M. and Sakuragawa, N., (2001b) **A novel approach to ex vivo gene therapy for familial hypercholesterolemia using human amniotic epithelial cells as a transgene carrier.** *Tohoku J Exp Med.* 193 : 279-292

Tatishcheva, I., Mandel'shtam, M., Golubkov, V., Lipovestskii, B. and Gaitskhoki, V., (2001) **[Four new mutations and polymorphic variants of the low density lipoprotein receptor in patients with familial hypercholesterolemia in Saint Petersburg].** *Genetika.* 37 : 1290-1295

Thiart, R., Scholtz, C., Vergotine, J., Hoogendijk, C., de Villiers, J., Nissen, H., Brusgaard, K., Gaffney, D., Hoffs, M., Vermaak, W. and Kotze, M., (2000) **Predominance of a 6 bp deletion in exón 2 of the LDL receptor gene in Africans with familial hypercholesterolemia.** *J Med Genet.* 37 : 514-519

Tolleshaug, H., Goldstein, J., Schneider, W. and Brown, M., (1982) **Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in Familial hypercholesterolemia.** *Cell.* 30 : 715-724

Tomita, N., Morishita, R., Koike, H., Hashizume, M., Notake, M., Fujitani, B., Kaneda, Y., Horiuchi, M. and Ogihara, T., (2002) **Therapeutic approach to familial hypercholesterolemia by HVJ-liposomes in LDL receptor knockout mouse.** *Int J Mol Med.* 10 : 137-143

Traeger-Synodinos, J., Mavroidis, N., Kanavakis, E., Drogari, E., Humphries, S., Day, I., Kattamis, C. and Matsaniotis, N., (1998) **Analysis of the low density lipoprotein receptor gene mutations and microsatellite haplotypes in Greek FH homozygous children: six independent ancestors account for 60% of probands.** *Hum Genet.* 102 : 343-347

Uauy, R., Vega, G., Grundy, S. and Bilheimer, D., (1988) **Lovastatin therapy in receptor-negative homozygous familial hypercholesterolemia: lack of effect on low-density lipoprotein concentrations or turnover.** *J Pediatr.* 113 : 387-392

UMD-LDLR: Universal Mutation Database <http://www.umd.necker.fr/LDLR/mutation.html>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LA BIBLIOTECA

Van Leuven, F., Thiry, E., Lambrechts, M., Stas, L., Boon, T., Bruynseels, K., Muls, E. and Descamps, O., (2001) **Sequencing of the coding exons of the LRP1 and LDLR genes on individual DNA samples reveals novel mutations in both genes.** *Atherosclerosis*. 154 : 567-577

Varret, M., Rabés, J-P., Collod-Bérout, G., Junien, C., Boileau, C. and Bérout, C., (1997) **Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene.** *Nuc Acids Res*. 25 : 172-180

Varret, M., Rabés, J-P., Thiart, R., Kotze, M., Baron, H., Cenarro, A., Descamps, O., Ehardt, M., Hondeljin, J-C., Kostner, G., Miyake, Y., Pocovi, M., Schmidt, H., Schmidt, H., Schuster, H., Stuhmann, M., Yamamura, T., Junien, C., Bérout, C. and Boileau, C., (1998) **LDLR Database (second edition): new additions to the database and the software, and results of the first molecular analysis.** *Nuc Acids Res*. 26 : 248-252

Varret, M., Rabés, J-P., Saint-Jore, B., Cenarro, A., Marroni, J-C., Civeira, F., Devillers, M., Krempf, M., Coulon, M., Thiart, R., Kotze, M., Schmidt, H., Buzzi, J-C., Kostner, G., Bertolini, S., Pocovi, M., Rosa, A., Farnier, M., Martínez, M., Junien, C. and Boileau, C. (1999) **A third major locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32.** *Am J Hum Genet*. 64 : 1378-1387

Vega, G. and Grundy, S., (1986) **In vivo evidence for reduced binding of low density lipoprotein to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia.** *J Clin Invest*. 78 : 1410-1414

Villager, L., Abifadel, M., Allard, D., Rabes, J., Thiart, R., Kotze, M., Beroud, C., Junien, C., Boileau, C. and Varret, M., (2002) **The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database.** *Hum Mutat*. 20 : 81-87

Wang, J., Huff, E., Janecka, L. and Hegele, R., (2001) **Low density lipoprotein receptor (LDLR) gene mutations in Canadian subjects with familial hypercholesterolemia, but not of French descent.** *Hum Mutat*. 18 : 359

Webb, J., Sun, M., Patel, D., McCarthy, S., Knight, B. and Soutar, A., (1992) **Characterization of two new point mutations in the low density lipoprotein receptor genes of an English patient with homozygous familial hypercholesterolemia.** *J Lipid Res*. 33 : 689-698

Weiss, N., Binder, G. and Keller, C., (1998) **Heterozygosity for the missense mutation Ala370- ->Thr in exon 8 of the low density lipoprotein receptor gene does not cause hypercholesterolemia.** *Eur J Med Res*. 3 : 20-24

Wilson, D., Gahan, M., Haddad, L., Heath, K., Whittall, R., Williams, R., Humphries, S. and Day, I., (1998) **A World Wide Web site for low-density lipoprotein receptor gene mutations in familial hypercholesterolemia: sequence-based, tabular, and direct submission data handling.** *Am J Cardiol*. 81 : 1509-1511

Yamamoto, T., Davis, G., Brown, M., Schneider, W., Casey, M., Goldstein, J. and Russell, D., (1984) **The human LDL receptor: a cystein-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA.** *Cell*. 39 : 27-38

Yamamoto, T., Bishop, R., Brown, M., Goldstein, J. and Russell, D., (1986) **Deletion in cystein-rich region of the LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit.** *Science*. 232 : 1230-1237

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN