

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

BÚSQUEDA DE LOS GENES RESPONSABLES DE LA HIPERLIPIDEMIA FAMILIAR COMBINADA EN FAMILIAS MEXICANAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

M. en C. ADRIANA HUERTAS VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. TERESA TUSÍE LUNA

MÉXICO, D. F.

2005

0352128



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.

DEDICATORIAS

A mis padres Elsa y Abel, por ser lo mas importante en mi vida,
por el apoyo incondicional que me han brindado
y por todo el amor y la atención que siempre he recibido.

A mi hermana Angélica, por todas las cosas que hemos compartido.

A mi sobrino, por ser una nueva luz en mi familia.

A mi ángel por cuidarme desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

Mi mas profunda gratitud a todas aquellas personas, que de una u otra manera, contribuyeron en la realización de este trabajo.

A la Dra. Ma. Teresa Tusié Luna, por la dirección y el apoyo recibido para la realización de esta tesis.

Al Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas, por su valiosa participación en la parte clínica, por la colección y caracterización de las familias en estudio.

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros, por brindarme su amistad, por su apoyo incondicional en todo momento y por ser parte fundamental en mi formación académica.

A la Dra. Paivi Pajukanta, por sus enseñanzas y por permitirme realizar parte de mi tesis en su laboratorio.

Al Dr. Jake Lusi, por sus atinados consejos, por ser un ejemplo a seguir y por la confianza que siempre deposito en mí.

Al Biólogo Salvador Ramírez, por su amistad, por su apoyo y por la participación en la extracción y purificación de las muestras de ADN.

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

A mis compañeros de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica por los momentos que compartimos juntos.

A los miembros del jurado, Dra. Susana Helena Kofman Epstein , Dr. Fabio Salamanca Gómez, Dr. Luis Eguiarte Fruns, Dra. Socorro Duran Vargas, Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela, Dr. Marco A. Juárez Oropeza y Dra. Ma. Teresa Tusié Luna por la evaluación y revisión crítica del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

Al Instituto Científico Pfizer (ICP), por la beca recibida para la realización de estancias cortas en el extranjero.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por permitirme realizar mis estudios de doctorado.

A las familias que participaron en este estudio, mi más profundo agradecimiento.

**Búsqueda de los genes responsables de la Hiperlipidemia Familiar Combinada en
Familias Mexicanas**

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4

I. INTRODUCCIÓN

1. 1 “La complejidad de las enfermedades complejas”.....	5
1.2 Estrategias metodológicas para el mapeo y la identificación de los genes que contribuyen al desarrollo de las enfermedades.....	6
1.2.1 Ligamiento genético.....	6
1.2.2 Estudios de asociación.....	8
1.2.3 Desequilibrio de ligamiento.....	9

2. La aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular: una etiología compleja

2.1 Generalidades.....	10
2.2 Lípidos y lipoproteínas en plasma.....	11
2.3 Apolipoproteínas.....	12

3. La hiperlipidemia familiar combinada (HLFC)

3.1 Generalidades.....	13
3.2 Bases bioquímicas de la HLFC.....	14
3.3 Aspectos genéticos de la HLFC.....	16
3.3.1 Genes candidatos en la HLFC.....	16
3.3.2 Regiones previamente ligadas a la HLFC.....	21
3.3.3 Región en cromosoma 1q21-q23 ligada a la HLFC.....	22
3.3.4 USF1 implicado en el fenotipo de la HLFC.....	24
3.4 Modelos animales para el estudio de la HLFC.....	26

II. Planteamiento del problema.....	27
III. Hipótesis.....	28
IV Objetivos.....	29
V. MÉTODOS	
Familias en estudio	
1 Características clínicas.....	30
1.1 Criterios diagnósticos de inclusión.....	31
1.2 Criterios diagnósticos de exclusión	31
2. Métodos analíticos de laboratorio.....	32
3. Extracción de ADN.....	32
4. Genotipificación de marcadores microsatélites.....	32
4.1 Marcadores microsatélites para el estudio de genes candidatos funcionales.....	32
4.2 Marcadores microsatélites para el análisis de la región 1q21-q23.....	33
4.3. Marcadores microsatélites para el estudio de las regiones 2p, 9q, 10p, 11p, 16q y 21q.....	33
5. Genotipificación de SNPs.....	33
6. Análisis de secuencia del gen TXNIP.....	34
7. Análisis de secuencia de gen USF1.....	34
8. Análisis estadístico.....	35
8.1 Análisis estadístico para el estudio de la región 1q21-q23.....	35
8.2 Análisis estadístico para el estudio del gen USF1.....	35
8.3 Análisis estadístico para el estudio de las regiones 2p, 9q, 10p, 11p, 16q y 21q.....	36

VI. RESULTADOS

1. Resultados clínicos y mediciones laboratorio.....	38
2. Análisis de ligamiento en genes candidatos funcionales.....	39
3. Análisis de ligamiento en dos puntos para la región 1q21-q23.....	40
3.1 Análisis de ligamiento en dos puntos por familia.....	41
4. Análisis de secuencia del gen TXNIP.....	41
5. Estudios de asociación para el gen USF1.....	42
5.1 Análisis de haplotipos.....	43
6. Análisis de secuencia del gen USF1.....	45
7. Análisis de ligamiento para las regiones 2p, 9q, 10p, 11p, 16q y 21q.....	46

VII. DISCUSION

1. Análisis de genes candidatos funcionales.....	47
2. Evidencia de ligamiento para la región 1q21q23.....	48
3. Análisis de secuencia del gen TXNIP.....	49
4. USF1 asociado con el fenotipo de la HLFC.....	51
5. Análisis de secuencia del gen USF1	53
6. Análisis de ligamiento para las regiones 2p, 9q, 10p, 11p, 16q y 21q.....	54

VIII. CONCLUSIONES.....56

IX. PERSPECTIVAS.....58

X. REFERENCIAS.....59

XI. ANEXOS

Anexo I. Carta de consentimiento informado

Anexo II. Árboles genealógicos de las 24 familias incluidas en este estudio

Anexo III. Resultados de ligamiento para las diferentes regiones cromosómicas analizadas

Anexo IV. Publicaciones

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Defectos en el metabolismo de lípidos en la HLFC.....	15
Figura 2. Región 1q21-q23 asociada con la HLFC, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico en diferentes poblaciones.....	23
Figura 3. SNPs asociados con la HLFC en familias de la población finlandesa.....	24
Figura 4. Desequilibrio de ligamiento entre los SNPs incluidos en este estudio SNPs asociados con el gen USF1 en la población finlandesa en contraste con los SNPs asociados en la población mexicana	44
Figura 5. SNPs asociados con el gen USF1 en la población finlandesa en contraste con los SNPs asociados en la población mexicana.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes candidatos funcionales que participan en la expresión de la HLFC.....	17
Tabla 2. Loci identificados en las familias con HLFC en diferentes poblaciones.....	21
Tabla 3. Estructura de las 24 familias con HLFC incluidas en este estudio.....	30
Tabla 4. Características fenotípicas de los miembros de las familias en estudio.....	38
Tabla 5. Valores de HLOD obtenidos en el estudio de cuatro genes candidatos funcionales....	39
Tabla 6. Valores de HLOD y NPL obtenidos en el análisis de la región 1q21-q23.....	40
Tabla 7. Resultados del análisis de ligamiento en dos puntos para la región 1q21-q23	41
Tabla 8. Resultados del análisis de asociación con SNPs para el análisis del gen USF1 para el rasgo de triacilgliceroles e HLFC	42
Tabla 9. Análisis de haplotipos para los rasgos de HLFC y TG usando el programa HBAT.....	43
Tabla 10. Variantes identificadas en la secuencia del gen USF1.....	45
Tabla 11. Resultados del análisis de ligamiento paramétrico de dos puntos y no paramétrico en pares de hermanos (ASP) para el análisis del cromosoma 16 asociado al rasgo de CT.....	46

RESUMEN

La hiperlipidemia familiar combinada (HLFC), es la más común de las dislipidemias de tipo familiar, con una prevalencia de 1-2% en población general, que se caracteriza porque los pacientes presentan niveles elevados de colesterol total (CT) y/o triacilgliceroles (TG) en suero. Para investigar el componente genético de la HLFC, se analizaron 24 familias multigeneracionales de la población mexicana diagnosticadas con HLFC, 314 individuos fueron incluidos en el estudio. Se analizaron 7 genes candidatos involucrados en el metabolismo de lípidos, con un papel potencial en la fisiopatología de la HLFC. No se observó evidencia de ligamiento para los 7 genes estudiados. Adicionalmente, se analizó la contribución de la región 1q21-q23, esta región ha sido previamente ligada a la HLFC en diferentes poblaciones. Un total de 11 marcadores microsatélites fueron genotipificados. El análisis de dos puntos para el fenotipo de la HLFC y los niveles elevados de TG resultó en valores de LOD score de heterogeneidad (HLOD) máx. de 1.67 ($\alpha = 0.49$) y 1.93 ($\alpha = 0.43$) para el marcador DIS2768 respectivamente. El análisis de múltiples puntos de heterogeneidad y no paramétrico (NPL) para el fenotipo de la HLFC y TG resultó en valores de HLOD de 1.27 ($\alpha = 0.46$) y 1.64 ($\alpha = 0.38$), y valores de NPL de 4.00 ($P = 0.0001$) y 3.68 ($P = 0.0003$) cerca del marcador DIS2768, respectivamente. Asimismo, se analizó la participación del gen USF1 localizado en la región 1q21-q23. Se genotipificaron 13 SNPs. Se observó evidencia de asociación para los fenotipos de HLFC y TG con tres SNPs hCV1459766, rs3737787, y rs2073658, resultando en valores de p de 0.05 y 0.0009. Adicionalmente, se analizaron 26 marcadores microsatélites en siete diferentes regiones cromosómicas previamente ligadas con la HLFC en familias de población Caucásica. Las regiones 16q24 y 10q mostraron evidencia sugestiva de ligamiento para los rasgos de colesterol total y TG respectivamente. El presente reporte es el primer estudio que de manera extensa investiga el componente genético de la HLFC en familias de la población mexicana. Los datos obtenidos en este estudio confirman la participación del locus 1q21-q23 en la expresión de la HLFC, consistente con lo observado en otras poblaciones, asimismo se demostró la participación de USF1 en la expresión de la HLFC y evidencia sugestiva de ligamiento con las regiones 16q24 y 10q asociadas con el rasgo de niveles elevados de colesterol y triacilgliceroles respectivamente.

ABSTRACT

Familial combined hyperlipidemia (FCHL) is the most common familial dyslipidemia, with a prevalence of 1-2% in the general population. To investigate the largely unknown genetic component of the FCHL, we analyzed 24 extended Mexican FCHL families. We analyzed seven candidate genes putatively involved in the expression of FCHL. No evidence for linkage was observed in any of these investigated candidate genes. In addition we analyzed the contribution of the 1q21-q23 region; this region has been linked to FCHL in several populations. A total of 11 markers were genotyped. Two point linkage analysis for the FCHL phenotype, and for the elevated triglyceride (TG) trait, gave a maximum HLOD of 1.67 ($\alpha = 0.49$) and 1.93 ($\alpha = 0.43$) at DIS2768 respectively. Heterogeneity and non-parametric (NPL) multipoint analyses for the FCHL phenotype and the TG trait showed maximum HLODs of 1.27 ($\alpha = 0.46$) and 1.64 ($\alpha = 0.38$), and NPLs of 4.00 ($P = 0.0001$) and 3.68 ($P = 0.0003$) near DIS2768, respectively. Furthermore, we analyzed the Upstream Transcription Factor 1 (USF1) located on 1q21q23 region. We genotyped 13 SNPs. The FCHL and TG traits showed significant evidence for association with 3 SNPs, hCV1459766, rs3737787, and rs2073658, and haplotype analyses further supported these findings (probability values of 0.05 to 0.0009 for SNPs and their haplotypes). We also analyzed 26 microsatellite markers residing in the seven chromosomal regions previously linked to FCHL in Caucasians. The regions 16q24.1 and 10q, showed suggestive evidence for linkage for total cholesterol and the TG trait respectively. This study is the first to extensively investigate the genetic component of the FCHL in Mexicans; our data confirm the involvement of a major susceptibility locus on chromosome 1q21-q23, consistent with findings in other populations and also provides independent evidence for the role of USF1 in FCHL and links the 16q24.1 and 10q regions.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 “La complejidad de las enfermedades complejas”

Las enfermedades complejas se definen como aquellas enfermedades comunes causadas por diversos factores ambientales que adicionalmente son influenciadas por la interacción de variantes alélicas en múltiples genes. Estas enfermedades comunes representan un problema de salud pública a nivel mundial y se estima un incremento considerable en las próximas décadas.

El componente genético de las enfermedades complejas y la evidencia de la interacción entre genes y factores ambientales ha sido previamente demostrado (Boomsma et al. 2002; Konkenvuo et al. 1992; Mosteller et al. 1993; Austin, 1996; Scheuner, 2001; Hunter, 2005). Asimismo, diferentes estrategias metodológicas han sido desarrolladas para la identificación de los genes que participan en la expresión de las enfermedades complejas. Las estrategias mas utilizadas para la identificación y el mapeo genético son el análisis de ligamiento y los estudios de asociación (Lander y Schork, 1994; Lander y Kruglyak, 1995; Baron, 2001; Belmont y Leal, 2005; Vink y Boomsma 2002; Botstein y Rich, 2003). Adicionalmente, los recientes avances en el estudio y la comprensión de la estructura del genoma humano, han permitido desarrollar nuevas tecnologías para el estudio y la identificación de los genes implicados en la manifestación de la enfermedad. En este sentido, la culminación del proyecto HapMap, que tiene como objetivo la identificación de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) distribuidos en el genoma en diferentes poblaciones y la caracterización de haplotipos y patrones de desequilibrio de ligamiento (DL) (Cardon y Abecasis 2003, Liu et al, 2004) serán sin duda una herramienta valiosa para la identificación de variantes alélicas asociadas con la enfermedad y proveerá con precisión, información para el diagnóstico, que facilitará el diagnóstico temprano, la prevención y el tratamiento de las enfermedades.

Estudios recientes, han demostrado que las variantes de secuencia (SNPs) que afectan el corte y empalme y la regulación genética, pueden jugar un papel importante en la determinación de la susceptibilidad genética individual (Peltonen y McKusick 2001; Cavalli-Sforza, 2005). En el

genoma humano, los SNPs ocurren en promedio una vez cada 200 pares de bases (pb). Actualmente, más de 9 millones de SNPs han sido identificados y reportados en diferentes bases de datos (Sherry et al. 2001; The Internacional HapMap Consortium, 2003). Sin embargo solo un pequeño número de los millones de SNPs presentes en el genoma humano tienen impactos funcionales, por lo que la identificación de estos SNPs y su impacto en la salud es importante.

1.2 Estrategias metodológicas para el mapeo de los genes que contribuyen al desarrollo de las enfermedades

Las herramientas más utilizadas para el mapeo y la identificación de los genes que predisponen al desarrollo de las enfermedades son el análisis de ligamiento genético y los estudios de asociación. En principio, el ligamiento y la asociación son fenómenos distintos. El análisis de ligamiento es una relación entre loci, mientras que el análisis de asociación es la relación entre alelos o fenotipos. El ligamiento tiene una relación genética específica, mientras que la asociación es solo una prueba estadística.

1.2.1 Ligamiento genético

El análisis de ligamiento genético se define como la tendencia de alelos muy cercanos ubicados en un mismo cromosoma a transmitirse juntos como una unidad intacta a través de la meiosis. El análisis de ligamiento genético consiste en determinar la co-segregación de marcadores genéticos polimórficos en relación a un fenotipo clínico determinado. El estudio de ligamiento genético puede utilizarse para definir la posible participación de distintos genes candidatos de forma independiente, sin necesidad de estudiar la estructura (secuencia) completa de cada gen. Para ello se utilizan marcadores intragénicos o cercanos a cada uno de los genes que se quiere analizar. También es posible, mediante esta estrategia, definir la participación de una región cromosómica determinada o bien, realizar el escrutinio completo del genoma en busca del *locus* o *loci* implicados en un determinado padecimiento.

En el análisis de ligamiento genético se calcula una serie de valores de verosimilitud (*odds* relativas) para varios valores posibles de θ , con un intervalo que va de $\theta = 0.0$ (sin recombinación) a $\theta = 0.5$ (distribución aleatoria). Las verosimilitudes calculadas se expresan generalmente como el $\log_{10}$ de esta razón y se denominan puntuación lod. El uso de logaritmos permite combinar mediante adición simple, los datos recogidos de diferentes familias. La probabilidad de co-segregación se expresa en valores de LOD score (logaritmo de las *odds*). El LOD score es un término estadístico, que se determina para evaluar la significancia de los resultados de ligamiento. Por convención, valores de LOD score ≥ 3 (equivalente a más de 1000:1 *odds* a favor de ligamiento) se considera una prueba definitiva de que los loci están ligados, valores de -2 se han considerado como valores de exclusión de ligamiento (Ott, 1991).

El análisis de ligamiento genético puede dividirse en paramétrico y no paramétrico (NPL por sus siglas en inglés: no parametric LOD score) (Kruglyak et al. 1996). En el análisis de ligamiento paramétrico o estándar, se requiere de un modelo genético específico para su análisis. Los parámetros que son considerados en este modelo son: el modo de herencia (dominante, recesivo o ligado al sexo), la frecuencia de la enfermedad y la penetrancia. No obstante en el estudio de las enfermedades complejas, estos parámetros no se conocen con certeza. En el análisis de ligamiento no paramétrico no se requiere un modelo genético para su análisis.

Los marcadores genéticos más utilizados para el análisis de ligamiento genético son secuencias repetidas de di, tri y tetranucleótidos conocidos como marcadores microsatélites, aunque recientemente, los SNPs han sido ampliamente utilizados en el análisis de ligamiento genético (Carlson et al. 2004; Strachan y Read 2004). Diferentes ventajas y desventajas se han atribuido a la utilización de marcadores microsatélites y SNPs para la identificación de genes asociados con enfermedades complejas, por ejemplo, los marcadores microsatélites proveen mayor informatividad con respecto a los SNPs debido a que son multi-alélicos, sin embargo en la actualidad es más fácil genotificar SNPs a gran escala mediante métodos automatizados que marcadores microsatélites (Cullis, 2002).

1.2.2 Estudios de asociación

Los estudios de asociación han sido ampliamente utilizados para analizar genes candidatos o para redefinir la localización de un gen asociado con enfermedades monogénicas y multifactoriales. La asociación no es específicamente un fenómeno genético, si no una prueba estadística que determina la co-ocurrencia de alelos o fenotipos entre casos y controles (Cardon y Bell, 2001).

Es importante mencionar que en los estudios de ligamiento o asociación para enfermedades complejas, no siempre se observa una co-segregación perfecta entre un marcador específico y la enfermedad, algunos de los parámetros que afectan los resultados de asociación y ligamiento son:

- Penetrancia incompleta: se refiere a aquellos individuos que heredaron el alelo de riesgo pero que no manifiestan la enfermedad. Si la penetrancia del alelo en la enfermedad es de 100%, entonces todos los individuos que porten el alelo expresarán la enfermedad.
- Heterogeneidad genética: Mutaciones en uno o diferentes genes pueden resultar en la expresión de fenotipos idénticos. Una región cromosómica puede co-segregar en algunas familias pero no en otras.
- Herencia poligénica: se requiere de la presencia simultánea de mutaciones en múltiples genes para que se manifieste la enfermedad.
- Estratificación de la población: La presencia de diferentes sub-poblaciones con diferentes frecuencias alélicas dentro de una misma población.

Estos parámetros deben ser considerados en el análisis y la interpretación de los resultados, asimismo estos parámetros influyen de manera determinante cuando se requiere evaluar la participación de diferentes genes previamente identificados en otras poblaciones (réplica)

(Campell y Rudan, 2002; Neale y Sham, 2004; Gordon y Finch, 2005; Mayeux, 2005; Newton-Cheh y Hirschhorn, 2005). Finalmente, los estudios de ligamiento genético y el análisis de asociación son herramientas complementarias en la identificación y mapeo de los genes que contribuyen con la manifestación de la enfermedad; por ejemplo los estudios de asociación pueden ser utilizados como una herramienta útil para restringir el intervalo de una región cromosómica que ha sido previamente identificada por ligamiento (Borecki y Suárez 2001).

1.2.3 Desequilibrio de ligamiento

Otra aproximación del mapeo genético es medir el desequilibrio de ligamiento (DL) entre un marcador y la enfermedad, usando una población de individuos afectados e individuos control o un grupo de familias nucleares. El entendimiento del DL en poblaciones humanas, puede facilitar el descubrimiento de genes que participan en la expresión de las enfermedades complejas. (Abecasis et al. 2005; Ardlie et al. 2002; Morton 2005).

El uso del DL en el mapeo génico de una enfermedad, requiere de un grupo control para efectos comparativos. La presencia de DL y ligamiento genético indica que un locus principal está muy cerca a esa región, mientras que el DL sin evidencia de ligamiento indica que el locus es un factor de susceptibilidad. La interpretación de los datos toma en consideración la capacidad de detectar ligamiento para poder discriminar entre un locus principal o un locus que confiere susceptibilidad. El DL también puede ser el resultado de mezclas recientes de poblaciones genéticamente diferentes (Abecasis et al. 2005). En teoría un alto grado de DL entre dos genes separados por 10-20 cM pueden originarse y persistir en poblaciones que tienen una historia reciente de mezcla (3-20 generaciones), tal como ha ocurrido en las poblaciones mestizas.

2. La aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular: una etiología compleja

2.1 Generalidades

La aterosclerosis es un síndrome progresivo caracterizado por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las grandes arterias (Ross, 1993; Lusis, 2000, 2004; Libby, 2002). En la actualidad, múltiples genes han sido relacionados con el proceso aterosclerótico. (Doevendans et al. 2001; Ordovas y Shen, 2002). La aterosclerosis se inicia como consecuencia de un proceso lento de daño sobre el endotelio, lo que desencadena una respuesta inflamatoria en la pared vascular. Cuando el endotelio se lesiona, se provoca un desequilibrio en la producción de citosina, quimiocinas y factores de crecimiento producidos por las células endoteliales, que conduce a la migración de monocitos y linfocitos T, a la migración y proliferación de células musculares lisas (CML), al depósito de matriz extracelular y de lípidos, así como a la síntesis de proteínas que favorecen la progresión de la lesión aterosclerótica. Diversos estudios en familias y gemelos (Scheuner, 2001; Austin, 1996; Mosteller, 1993 y Koskenvuo et al. 1992.) han demostrado que los procesos que determinan el infarto al miocardio y en general toda la patología que conlleva al desarrollo de la aterosclerosis tiene un componente hereditario.

La acumulación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial parece ser uno de los primeros episodios asociados al desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Las LDL retenidas en la pared sufren procesos de oxidación (LDLox) y generan productos con actividad quimiotáctica para monocitos y células musculares lisas (CML). Los monocitos atraviesan el endotelio, y se diferencian a macrófagos, captan de forma masiva LDLox y se transforman en células espumosas, cuya acumulación en la íntima origina la formación de la estría grasa. (Brown y Goldstein 1983; Jang et al. 1994, Klatt y Esterbauer, 1996; Lin et al. 1996; Drexler, 1997). La disfunción endotelial está considerada como el estadio inicial en el desarrollo del proceso aterogénico (Suwaidi et al. 2000) y se ha asociado con factores de riesgo cardiovascular.

2.2 Lípidos y lipoproteínas en plasma

Los lípidos más importantes en el cuerpo son los triacilgliceroles (TG), el colesterol (colesterol libre y colesterol esterificado) y los fosfolípidos (Hegele, 2001). Los triacilgliceroles sirven como una fuente de energía y son almacenados en el tejido adiposo. El colesterol sirve como un componente de la membrana celular y es precursor de las hormonas esteroideas y ácidos biliares. Los fosfolípidos son el mejor componente de la membrana celular. Las lipoproteínas plasmáticas son partículas que tienen un núcleo hidrofóbico formado por lípidos no polares (colesterol esterificado y triacilgliceroles) y por una capa superficial más hidrofílica que contiene colesterol no esterificado, fosfolípidos y unas proteínas específicas solubles en agua denominadas apolipoproteínas. La función de las apolipoproteínas es transportar los lípidos (insolubles en el plasma) desde el intestino y el hígado a los tejidos periféricos, y desde éstos, regresar el colesterol al hígado para su eliminación en forma de ácidos biliares (Hegele, 2001).

Las lipoproteínas se diferencian entre sí por la distinta proporción de colesterol, triacilgliceroles y fosfolípidos que contienen, así como por las distintas apoproteínas integradas en su estructura (apoB, apoE, apoC, apoA-I, apoA-II y apoA-IV). En la actualidad, las lipoproteínas plasmáticas se clasifican según su densidad específica en: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL, lipoproteína a) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Genest, 2003).

Los quilomicrones son secretados al sistema linfático de la mucosa intestinal y finalmente, al torrente circulatorio donde entrarán en contacto con la lipasa lipoproteica (LPL), cuya acción consiste en hidrolizar los triacilgliceroles de los quilomicrones, permitiendo que los ácidos grasos derivados de ellos penetren en el tejido adiposo como almacenamiento energético o en el tejido muscular para la producción de dicha energía. El resultado es una partícula lipoproteica con un menor contenido en triacilgliceroles que se conoce como remanente de quilomicrón que finaliza su etapa metabólica en el hígado.

En el hepatocito, los ácidos grasos que no siguen la vía oxidativa para la producción de energía o cuerpos cetónicos, son esterificados pasando a formar parte de los triacilgliceroles. Los triacilgliceroles junto a ésteres de colesterol forman parte de las partículas VLDL, que alcanzan

el torrente circulatorio, donde son objeto de intercambios metabólicos, mediante los cuales ceden apoC y apoE a las HDL e interaccionan al igual que los quilomicrones, con la LPL, dando lugar a las IDL. La disminución del núcleo de la partícula produce una pérdida de ciertos componentes de su zona superficial, fosfolípidos, colesterol y apoproteínas que son el origen plasmático de las HDL nacientes. Las IDL pueden ser internalizadas directamente por los hepatocitos, o bien dar origen a las partículas LDL.

Las partículas IDL pierden triacilglicerol y prácticamente toda la apoE, convirtiéndose en partículas LDL, ricas en ésteres de colesterol y que contienen una única molécula de apoB-100 como apoproteína. La función básica de las LDL es transportar colesterol a los tejidos periféricos y al hígado, donde son catabolizadas. El receptor de las LDL es una proteína transmembrana que se une a la apoB-100, tras lo cual se internaliza toda la partícula LDL y se libera el colesterol en el interior de la célula, ejerciendo la regulación del metabolismo endógeno del mismo (Kwiterovich, 2000).

2.3 Apolipoproteínas

Las apolipoproteínas son proteínas anfipáticas específicas, que conforman la estructura de las lipoproteínas y que se asocian con procesos bioquímicos del metabolismo de lípidos. Algunas apolipoproteínas tienen la función de ligando para los receptores de diferentes lipoproteínas (apoA-I, apoA-II, apo-B, ApoB-48), otras actúan como inhibidores de las interacciones lipoproteína-receptor (apoA-I, apoB-100 y apoE) o como moduladores de la actividad de las enzimas que participan en el metabolismo (apoC-I y apoC-III). La mayoría de las lipoproteínas son solubles, esta propiedad permite unir fácilmente a las estructuras lipídicas (Breslow, 2000).

3. La Hiperlipidemia Familiar Combinada

3.1 Generalidades

En 1973 tres grupos de investigación describieron de manera independiente una nueva forma de dislipidemia familiar, la hiperlipidemia familiar combinada (HLFC) (Goldstein et al. 1973; Nikkila y Aro 1973; Rose et al. 1973). La HLFC es la forma más común de las dislipidemias de origen genético, con una prevalencia calculada de 1-2% en la población general. El término "*hiperlipidemia familiar combinada*" fue acuñado por primera vez en 1973 por Goldstein y col., este término se utilizó para describir un tipo de dislipidemia familiar con un patrón mixto de anomalías en el perfil de lípidos que se heredaba aparentemente de forma mendeliana (Goldstein et al. 1973).

La HLFC se define como un síndrome ocasionado por un defecto en el metabolismo de las lipoproteínas, que se caracteriza porque los pacientes presentan niveles elevados de colesterol total y/o triacilglicérols en suero, observándose frecuentemente, fluctuaciones en estas concentraciones (Goldstein et al. 1973, Grundy et al. 1987; Castro-Cabezas et al. 1992). En el transcurso del tiempo, se puede observar variabilidad entre la hipercolesterolemia, la hipertrigliceridemia, o una dislipidemia mixta, incluso normalización en la concentración de lípidos en el mismo individuo sin que exista ningún cambio en sus condiciones clínicas. Otra característica de la HLFC es la distribución anormal de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) con un predominio de partículas pequeñas y densas. En diversos estudios (Austin et al. 1990; Griffin et al. 1994) se ha demostrado que el predominio de este tipo de partículas constituye un importante factor de riesgo para la expresión de la enfermedad arterial coronaria en sujetos con o sin algún tipo de dislipidemia. Se observa además concentraciones elevadas de las partículas LDL, IDL y VLDL. La principal proteína estructural de estas partículas es la apolipoproteína B (apoB), una proteína de membrana que se requiere para el empaquetamiento de las lipoproteínas VLDL. Una de las principales características de la HLFC y que la distingue de otras dislipidemias familiares es la concentración elevada de la apolipoproteína B-100 (apoB) (Brunzell et al. 1984; Snideman et al. 1992; Venkatesan et al. 1993; Kane y Havel 2001). La

HLFC, adicionalmente constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de la aterosclerosis. En este sentido, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que un 20% de los casos de enfermedad arterial coronaria se atribuyen a la HLFC. Adicionalmente, esta entidad ha sido asociada con la obesidad y la resistencia a la insulina (Eckel, 2001; Purnell et al. 2001; De Graaf et al. 2002; Vander-Vleuten et al. 2004).

3.2 Bases bioquímicas de la HLFC

En estudios bioquímicos realizados en pacientes con HLFC se ha observado un aumento en la producción hepática de apoB, asociada a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Un posible mecanismo para explicar este fenómeno es un aumento de ácidos grasos libres en plasma, los cuales aumentan la expresión del gen de la apoB y estimulan la secreción de las partículas VLDL (Cortner et al. 1991; Venkatesan et al. 1993). Adicionalmente, la secreción hepática de las partículas VLDL, contribuyen a un aumento en los niveles plasmáticos de triacilglicerol, apoB y colesterol total.

Sin embargo, no en todos los pacientes con HLFC se ha observado un aumento en la producción hepática de apoB. Existen familias en las que se ha observado una disminución en el catabolismo de las partículas VLDL e IDL (Aguilar-Salinas et al. 1997; De Graaf y Stalenhoef et al. 1998). Estos datos sugieren la existencia de defectos adicionales en la composición de las lipoproteínas, que contribuyen en la expresión fenotípica de la enfermedad y proveen evidencia de la heterogeneidad bioquímica de este padecimiento (Brunzell et al. 1983; Bredie et al. 1997; Porkka et al. 1997; Eurlings et al. 2001). Se ha observado también en pacientes con HLFC, una baja actividad de la lipasa lipoproteica, particularmente en pacientes con niveles elevados de triacilglicerol (Babirak et al. 1992).

La elevación en la concentración de las partículas LDL pequeñas y densas, es otra característica de pacientes con HLFC (Austin et al. 1990; Jarvik et al. 1994; Hokanson et al. 1995; Vakkilainen et al. 2002; Ayyobi et al. 2003b). En un estudio realizado por Hokanson y col (1995), se observó que la concentración de las partículas LDL pequeñas y densas persiste a pesar de una disminución en los niveles de triacilglicerol de los pacientes, lo cual sugiere la

posibilidad de que diferentes mecanismos pudieran regular este proceso. Uno de estos mecanismos podría ser la elevación en la actividad de CETP, una proteína que facilita la transferencia de ésteres de colesterol de las partículas HDL a las partículas VLDL, las cuales transportan triacilglicerolos en partículas VLDL y LDL (Tato et al. 1995. Kwiterovich, 2002). Otro posible mecanismo se explica mediante la acción lipolítica de la lipasa hepática (LH) y lipasa lipoproteica (LPL). Las partículas LDL con baja concentración de triacilglicerolos contribuyen a la formación de partículas LDL pequeñas y densas. Un incremento en la actividad de CETP pudiera también explicar los bajos niveles de colesterol-HDL en pacientes con HLFC (Figura1).

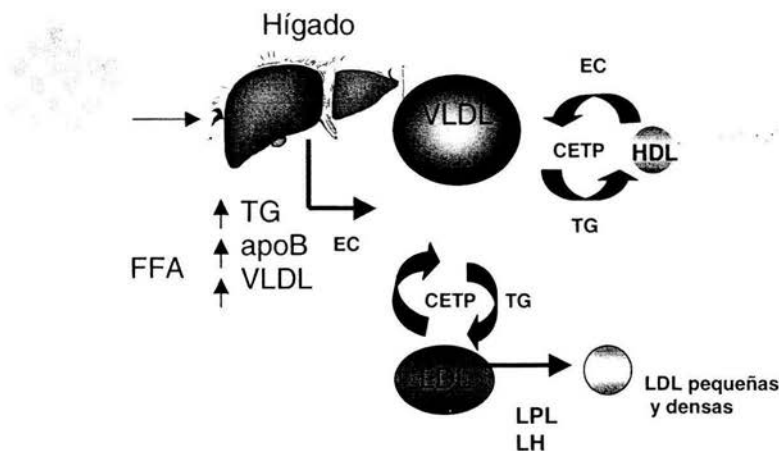


Figura 1. Defectos en el metabolismo de lípidos en la HLFC. FFA, ácidos grasos libres; apoB, apolipoproteína B; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; TG, triacilglicerolos; CT, colesterol total; EC ésteres de colesterol; CETP, proteína transferidora de ésteres de colesterol; LH, lipasa hepática; LPL, lipasa lipoproteica.

3.3 Aspectos genéticos de la HLFC

Las bases moleculares y genéticas que contribuyen a la patogénesis y la expresión de la HLFC no han sido plenamente dilucidadas, aunque existen esfuerzos importantes para identificar los genes que participan en esta entidad. Estos estudios han establecido la participación de diferentes loci en familias y poblaciones de origen étnico distinto.

Recientemente, Pajukanta y col. (2004) reportaron evidencia de asociación para el gen USF1 en familias con HLFC, particularmente para al rasgo de niveles elevados de triacilglicerolos. De forma interesante, este es el primer gen con un efecto mayor asociado a la HLFC desde la descripción de esta entidad por Goldstein y col. (1973).

En los primeros reportes (Goldstein et al. 1973), se describen familias con un patrón de herencia dominante. Sin embargo, estudios posteriores apoyan el concepto de que la HLFC es una enfermedad heterogénea y oligogénica, que se manifiesta a partir de la interacción de un conjunto pequeño de genes con un papel dominante, asociados con genes modificadores o de susceptibilidad, así como factores ambientales que determinan o modulan su expresión (Cullen et al. 1994; Allayee et al. 2002; Pajukanta et al. 2003; Shoulders et al. 2004).

3.3.1 Genes candidatos en la HLFC

El análisis de genes candidatos es una estrategia utilizada para el estudio de genes cuya función bioquímica sugiera alguna relación con el fenotipo de interés o bien, genes ubicados en el mapa físico de regiones previamente ligadas a un fenotipo determinado. Diversos investigadores han estudiado distintos genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, con un papel potencial en la fisiopatología de la HLFC. Los genes candidatos más estudiados son el gen de la lipasa lipoproteica (Gagné et al. 1994; Reymer et al. 1995; Yang et al. 1995), el cluster de genes de las apolipoproteínas A-I/C-III/A-IV (Wojciechowski et al. 1991; Marcil et al. 1996; Dallinga-Thie et al. 1997; Wijsman et al. 1998), el gen de la lipasa hepática (Allayee et

al. 2000), el gen de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y el gen de la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT) (Aouizerat et al. 1999c) (Tabla 1).

Tabla 1. Genes candidatos funcionales que participan en la expresión de la HLFC.

Gen	Locus	Referencias
apoA1-C3-A4	11q13	Wojciechowski et al. 1991; Xu et al. 1994; Dallinga-Thie et al. 1996; Eichenbaum-Voline et al. 2004; Mar et al. 2004.
apoA-II	1q21-q23	Allaye et al. 2003
LPL	8p22	Gagne et al. 1994; Reymer et al. 1995, de Bruin et al. 1996; Hoffer et al. 1998
LH	15q21-q23	Gehrisch et al. 1999; Allayee et al. 2000
CETP	16q21	Allayee et al. 1998
LCAT	16q22.1	Allayee et al. 1998; Aouizerat et al. 1999c.
USF1	1q22-q23	Pajukanta et al. 2004

Gen de las apolipoproteínas A-I/C-III/A-IV

Diversos estudios han demostrado que existe una relación directa entre variaciones en el gen del cluster de las apolipoproteínas apoA-I/C-III/A-IV y anomalías en el metabolismo de lípidos. Se sugiere que los genes del cluster de las apolipoproteínas apoA-I/C-III/A-IV pueden actuar como genes modificadores o de susceptibilidad en el desarrollo de la HLFC. (Wojciechowski et al. 1991; Xu et al. 1994; Dallinga-Thie et al. 1996; Eichenbaum-Voline et al. 2004; Mar et al. 2004). Los polimorfismos mas estudiados en este gen, incluyen sitios 5' del gen de la apoA-I reconocidos por las enzimas de restricción XmnI y MspI y SstI en el exón 4 del gen apoC-III. El alelo menos frecuente en estos polimorfismos se asoció con niveles elevados de colesterol, triacilgliceroles, C-LDL, apoB y apoC-III en plasma. Adicionalmente, otro grupo observó evidencia sugestiva de ligamiento entre el alelo menos frecuente de MspI y los niveles de colesterol LDL en familias holandesas (Dallinga-Thie et al. 1996). Por su parte, en estudios

realizados en familias con HLFC de la población finlandesa (Tahvanainen et al. 1998) y Francesa-Canadiense (Marcil et al. 1996), no se detectó evidencia de asociación entre los polimorfismos SstI y XmnI. Sin embargo, en estudios recientes se demostró evidencia de ligamiento y asociación entre variantes en los genes del cluster de las apolipoproteínas apoA-I/C-III/A-IV en pacientes con HLFC (Eichenbaum-Voline et al. 2004). Adicionalmente, Mar y col (2004) evidenciaron asociación entre los genes del cluster de las apolipoproteínas apoA-I/C-III/A-IV y los niveles elevados de triacilglicérol, así como con el tamaño de partícula en pacientes con HLFC. La evidencia de asociación en este estudio se obtuvo con SNPs en apoA-I (XmnI, MspI) y apoA-5 (S19W). En base a los resultados obtenidos en diferentes poblaciones, se sugiere que los genes del cluster de las apolipoproteínas apoA-I/C-III/A-IV no participan de manera primaria en la expresión de la HLFC, pero que este cluster de genes podría tener un efecto modificador específico en la regulación de los niveles de triacilglicérol y colesterol LDL.

ApoA-II

La apolipoproteína 2 (apoA-II) es la segunda proteína más abundante de las HDL, sin embargo la función biológica específica de esta proteína se desconoce. Polimorfismos en el gen de la apoA-II se han asociado con la composición y los niveles de HDL en humanos (Bu et al. 1994; Brousseau et al. 2002). En el ratón se ha observado que la sobre-expresión de este gen incrementa considerablemente el riesgo de desarrollar aterosclerosis (Warden et al. 1993). Subsecuentes estudios han demostrado que el ratón transgénico para apoA-II, presenta un incremento de 10 veces en los niveles plasmáticos de triacilglicérol, elevación de ácidos grasos libres y resistencia a la insulina comparada con los animales control (Castellani et al. 1997). Por otro lado, en pacientes con HLFC se ha observado un aumento en los niveles de apoA-II, comparado con los niveles de los sujetos no afectados de las mismas familias. En un estudio realizado en familias holandesas, se observó evidencia significativa de ligamiento para apoA-II (LOD score = 3.1) (Allayee et al. 2003). Sin embargo, apoA-II tampoco ha sido considerado como un determinante genético primario en la HLFC.

LPL

La lipasa lipoproteica (LPL) es una enzima que cataliza la hidrólisis de los triacilglicérolos contenidos en las partículas VLDL y los quilomicrones. En 1992, Babirak y col. demostraron que un 36% de sujetos con HLFC presentaban una disminución en la actividad de la LPL, sugiriendo que mutaciones en este gen pueden contribuir al fenotipo lipídico en la HLFC (Maylly et al. 1995; Hoffer et al. 1996; 1998). Sin embargo en diversos estudios se ha demostrado que mutaciones en la secuencia codificadora o en el promotor de la LPL no son causa común de la HLFC (Gagné et al. 1994; Nevin et al. 1994; Yang et al. 1995). En un estudio realizado por Marcil (1996), se reportó asociación negativa para LPL. Por otro lado, diversos estudios sugieren que el gen de la LPL actúa como un gen modificador en la HLFC (Reymer et al. 1995; De Bruin et al. 1996), ya que mutaciones en el gen de la LPL modifican los fenotipos de lípidos en sujetos con HLFC.

LH

La lipasa hepática (LH) es una enzima clave en el metabolismo de las lipoproteínas. La actividad catalítica de la LH favorece el remodelamiento de los remanentes de quilomicrones, IDLs, LDLs, HDLs y participa en el transporte reverso del colesterol. La función principal de la LH es hidrolizar los fosfolípidos y triacilglicérolos presentes en los remanentes de quilomicrones, IDL y HDL (Santamarina-Fogo et al. 2004). Un incremento en la actividad de la LH se ha asociado con partículas LDL pequeñas y densas y con una reducción en los niveles de HDL2 en plasma (Deeb et al. 1996). En pacientes con HLFC, se han reportado mutaciones en el gen de la LH, sin embargo no se observó evidencia de cosegregación entre el perfil lipídico y el genotipo, por lo que se sugiere que estos alelos de susceptibilidad tienen un efecto menor en la expresión de la HLFC (Gehrisch et al. 1999). Asimismo se ha observado un incremento en la actividad de la LH asociado con el tamaño de partícula de las LDL, colesterol HDL y niveles elevados de triacilglicérolos (Ayalte et al. 2000).

CETP y LCAT

El locus 16q22 contiene los genes de la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT) y el gen de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), ambos separados por una distancia aproximada de 21 cM. Este locus ha mostrado tener una participación en la expresión de la HLFC (Allayee et al. 1998; Aouizerat et al. 1999c). En el primer estudio (1998), se reportó evidencia de ligamiento para el locus CETP/LCAT ($P=.03$) asociado con tamaño de partícula LDL (análisis cuantitativo). Por otra parte, en base a la posición de marcadores analizados en esta región, Aouizerat y col. (1999), sugieren que LCAT más que CETP participa como un locus de susceptibilidad en la expresión de la HLFC. Estudios en ratones transgénicos en los que se sobre-expresa el gen de la LCAT han demostrado que los ratones presentan niveles elevados de partículas VLDL e LDL, similar al fenotipo de HLFC en el humano (Brousseau et al. 1996). Por su parte, la expresión del gen de la proteína transferidora de ésteres de colesterol puede influenciar la formación de partículas LDL pequeñas y densas, adicionalmente, un incremento en la actividad de CETP y LCAT puede también explicar los bajos niveles de colesterol-HDL en pacientes con HLFC (Kwiterovich, 2000).

Además de los genes de la proteínas que participan directamente en el metabolismo de las lipoproteínas, se ha sugerido también la participación de otros genes de susceptibilidad como el gen del receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR γ) (Pihlajamaki et al. 2000) y el gen del receptor 1B del factor de necrosis tumoral (TNFRSF1B) en la HLFC (Geurts et al. 2000).

Los genes que regulan la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, pueden modular en parte la expresión y la severidad del fenotipo en la HLFC. Sin embargo, cuando se ha observado ligamiento asociado a un rasgo particular, estos loci parecen contribuir solo como genes modificadores, apoyando el concepto que la HLFC es una entidad genéticamente compleja y heterogénea.

3.3.2 Regiones previamente ligadas a la HLFC

Actualmente, se han realizado tres escrutinios del genoma en familias con HLFC en población finlandesa, holandesa y británica (Pajukanta et al. 1999; Aouizerat et al. 1999b; Naoumova et al. 2003) (Tabla 2).

Tabla 2. Loci identificados en familias con HLFC en diferentes poblaciones.

Población	Loci	Referencias
finlandesa	1q21, 2p, 2q, 9p, 10p, 10q, 16q, 20q y 21q	Pajukanta et al. 1998 y 2003; Soro et al. 2002
holandesa	1p, 1q21, 2p, 9p, 11p, 16q y 19q	Aouizerat et al. 1999; Allayee et al. 2002; Pajukanta et al. 2003
británica	6q, 8p, 11p	Naoumova et al. 2003

En el primer estudio realizado en 35 familias finlandesas con HLFC, se describieron distintos loci de susceptibilidad, incluyendo el locus 10p11.2 asociado a niveles elevados de triacilgliceroles (LOD score =3.20) y el locus 21q21 (LOD score = 2.24) asociado a niveles elevados de apoB. Adicionalmente, se identificaron las regiones 10q11.2 (LOD score = 2.59), ligada a niveles elevados de colesterol y la región 2q31 (LOD score = 2.25), ligada al rasgo de triacilgliceroles elevados (Pajukanta et al. 1999).

En el segundo escrutinio del genoma realizado en 35 familias de la población holandesa, se identificaron cuatro loci de susceptibilidad en los cromosomas 2p, 11p, 16q y 19q asociados con la HLFC. (Aouizerat et al. 1999). El valor máximo de LOD score en múltiples puntos observado en este estudio fue 2.6 para el locus en cromosoma 11. En un estudio posterior realizado en estas familias (Allayee et al. 2002), se redefinieron los criterios diagnósticos, ajustándolos con los criterios definidos en el análisis de las familias finlandesas. Estas modificaciones permitieron observar evidencia de ligamiento a la región 1q21-q23 para el subfenotipo de triacilgliceroles elevados (LOD score 1.8) con el marcador D1S1677. En este mismo reporte se describe un nuevo locus en la región p31 del cromosoma 1, asociada a niveles elevados de apoB.

Recientemente, en el escrutinio del genoma realizado en 158 familias de población británica (Naoumova et al. 2003), se identificaron tres loci de susceptibilidad asociados a la HLFC. De manera interesante en este estudio, se describen dos nuevas regiones cromosómicas, 6q16q1 y 8p23.3, ligadas con niveles elevados de triacilglicerol y de colesterol.

Las diferencias observadas en distintos escrutinios del genoma en diferentes poblaciones, pueden explicarse en parte por la heterogeneidad genética de la HLFC. Sin embargo, los criterios diagnósticos utilizados, el tamaño de la muestra, la estructura de las familias y los diferentes análisis estadísticos empleados pudieran también contribuir a las diferencias observadas en estos estudios.

3.3.3 Región en el cromosoma 1q21-q23 ligada a la HLFC

El locus en la región 1q21-q23, fue el primer locus identificado en familias con HLFC. Pajukanta y col. (1998) reportaron evidencia significativa de ligamiento con dos marcadores polimórficos (D1S104 y D1S1677), ubicados en la región 1q21-q23 en 31 familias finlandesas extensas. El análisis de múltiples puntos resultó en un valor máximo de LOD score de 5.93. Posteriormente, se reportaron réplicas de ligamiento en 24 familias de la población alemana y 12 familias de población china para el marcador D1S194, un marcador ubicado a una distancia de 3 cM con respecto al marcador D1S104, ligado originalmente al fenotipo de la HLFC en familias finlandesas (Pei et al. 2000). En un tercer estudio realizado en 71 familias norteamericanas, se observó evidencia de ligamiento para la región 1q21-q3, con los marcadores D1S104 y D1S1677 (LOD score máximo en múltiples puntos = 2.5), adicionalmente se reportó una posible interacción entre la región en cromosoma 1 y la región en cromosoma 11 con los marcadores D1S104 y D11S4127 respectivamente, obteniendo valores de LOD score (2 locus) de 3.05 (Coon et al. 2000).

Estos datos proveen evidencia de que la región 1q21-q23 es importante en la modulación de la expresión de la HLFC. Sin embargo, esta región no parece participar en todas las poblaciones

estudiadas, tal es el caso de un estudio realizado en 18 familias holandesas donde no se observó evidencia de ligamiento para el locus 1q21-q23 (Aouizerat et al. 1999).

Adicionalmente, los marcadores utilizados para el análisis de esta región, también han sido ligados con la diabetes tipo 2 (Hanson et al. 1998; Elbein et al. 1999; Wiltshire et al. 2001; Hsueh et al. 2003) y el síndrome metabólico. (Langefeld et al. 2004), lo cual sugiere que diferentes variantes alélicas o haplotipos en genes ubicados en la misma región, contribuyan a los resultados de ligamiento para la HLFC, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico, lo que sería posible ya que estos síndromes comparten características metabólicas (Ayyobi et al. 2003). (Figura 2).

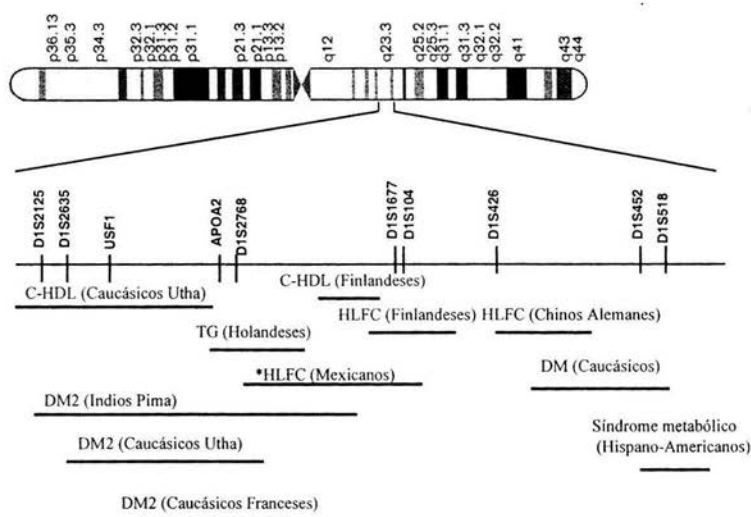


Figura 2. Región 1q21-q23 asociada con la HLFC, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico en diferentes poblaciones.

3.3.4 USF1 implicado en el fenotipo de la HLFC

Recientemente Pajukanta y col (2004), reportaron evidencia de ligamiento y asociación entre alelos específicos del gen USF1 (Upstream stimulatory transcription factor-1) ubicado en la región 1q21-q23 previamente ligada a la HLFC en 60 familias de la población finlandesa (Figura 3). En este estudio se incluyeron 721 genotipos, resultando en valores de p de 0.00002. Cuando se analizaron los genotipos de mujeres afectadas con niveles elevados de triacilglicérol, se observó un incremento en los valores de p (0.0000009). La evidencia de asociación se extendió a una región de 46 Kb.

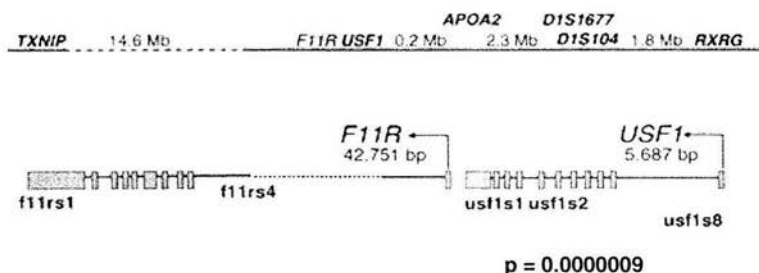


Figura 3. SNPs asociados con al HLFC en familias de la población finlandesa. (Modificado de Pajukanta et al. 2004).

El análisis de secuencia de las 6 Kb que comprenden el gen USF1, no mostró ninguna variante que resultara en un cambio de aminoácido. Estudios de expresión del mensajero de USF1 realizados en biopsias de seis casos índice no mostraron diferencias significativas con respecto a los niveles de expresión en los pacientes control. Adicionalmente, Coon y col. (2005), reportaron recientemente evidencia de asociación para el gen USF1 con niveles levados de triacilglicérol y niveles elevados de colesterol-LDL en familias norteamericanas con HLFC.

El gen USF1 se encuentra localizado en la región 1q21-q23 previamente ligada con la HLF en otras poblaciones. USF1 es un miembro de la familia de factores de transcripción que en el

hígado regula la expresión de la sintasa de ácidos grasos, una enzima clave en la lipogénesis. La expresión de genes para la apoA-II, apoC-III, lipasa hepática y ABCA1 es regulada por USF1. En tejido adiposo USF1 participa en la lipogénesis de novo mediante la expresión de respuesta a la insulina por FAS y acetilCoA carboxilasa. En el páncreas, USF1 influye la expresión de la insulina, el receptor de glucagón y genes relacionados con la subunidad catalítica de la glucosa 6-fosfato (Casado et al. 1999; Vallet et al. 1998; Putt et al. 2004).

Estos datos indican que USF1 juega un papel importante en la regulación del metabolismo de lípidos en respuesta a la señalización de glucosa e insulina. Se sugiere que variaciones que ocurren de manera natural pueden afectar la homeostasis de lípidos por influencia de varios genes. Reportes recientes han demostrado que existe asociación entre polimorfismos en el gen USF1 y el incremento en la lipólisis de adipocitos (Hoffstedt et al. 2005), por lo que el gen USF1 podría ser clave en el estudio y la comprensión de la HLFC.

3.4 Modelos animales para el estudio de la HLFC

Los modelos animales representan una estrategia útil para la comprensión de las bases genéticas y metabólicas de diferentes enfermedades, así como para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas y farmacológicas. Actualmente existen tres modelos animales para el estudio de la HLFC: El modelo de conejo del hospital St. Thomas (La Ville, 1987), el ratón transgénico LDR1/apoC-III/CETP (Masucci-Magoulas, 1997) y el ratón mutante Hyplip 1 (Castellani et al. 1998).

El conejo St. Thomas, presenta una hiperlipidemia mixta, caracterizada por un incremento en los niveles plasmáticos de colesterol total, triacilgliceroles y una sobreproducción hepática de apoB (Arderm et al. 1999), un cuadro similar a la HLFC en humanos.

El ratón transgénico LDR1/apoC-III/CETP, es otro modelo para el estudio del efecto fisiopatológico de la HLFC. El ratón presenta una mutación nula del receptor LDL que tiene un efecto sinérgico y actúa produciendo un aumento en los niveles de colesterol y triacilgliceroles.

Recientemente, Castellani y col. (1998) identificaron un ratón mutante (Hcb19) que presentaba un cuadro de hiperlipidemia combinada, niveles elevados de apoB e incremento en la secreción de las partículas VLDL. Estudios posteriores, demostraron que la hiperlipidemia en este modelo animal era resultado de una mutación en el locus *Hyplip 1*, una región sinténica a la región 1q21-q23 en humano. El ratón Hyplip1 presenta un cuadro clásico de hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, elevación de apoB plasmática y un incremento en la secreción de lipoproteínas ricas en triacilgliceroles (Pajukanta et al. 2001). Posteriormente, se identificó una mutación en la proteína Txnip (thioredoxin interacting protein) ubicada en este locus (Bodnar et al. 2002). Txnip codifica para una proteína citoplasmática que se une e inhibe a la tioredoxina, un regulador importante del potencial óxido-reducción celular (Bodnar et al. 2002). Los posibles defectos homólogos en el locus 1q21q23 asociado al gen Txnip de humano no han sido reportados.

II. Planteamiento del problema

La HLFC es la forma más común de las dislipidemias de origen genético. En México se ha observado una alta prevalencia, desconociéndose aún las causas genéticas que la condicionan. Estudios realizados en diferentes poblaciones, sugieren que existe heterogeneidad genética para este padecimiento, por lo que es probable que en nuestra población algunos loci que condicionan el desarrollo de la HLFC sean distintos a los reportados para otras poblaciones.

En este estudio se incluyeron 24 familias multi-generacionales con diagnóstico de HLFC. Estas familias constituyen un modelo valioso para la identificación a través de ligamiento genético y estudios de asociación de los loci o genes responsables del desarrollo de la HLFC en nuestra población. La eventual identificación de estos loci permitirá evaluar su posible participación en la HLFC y en otros tipos de dislipidemias, asimismo contribuirá al conocimiento de las bases moleculares y bioquímicas de este padecimiento.

III. Hipótesis

Es posible a través del análisis de ligamiento genético y los estudios de asociación, identificar nuevos loci, haplotipos de riesgo y eventualmente genes de susceptibilidad involucrados en el desarrollo de la hiperlipidemia familiar combinada, mediante el análisis de familias multigeneracionales y extensas de la población mexicana.

IV. Objetivos

Objetivo general

Identificar los loci responsables de la hiperlipidemia familiar combinada en familias mexicanas.

Objetivos específicos

- Evaluar la participación del gen de la lipasa hepática, lipasa lipoproteica, el gen de la lecitina colesterol acil transferasa, apoA-II y los genes del cluster de las apolipoproteínas A-I/C-III/A-IV como posibles genes candidatos en la hiperlipidemia familiar combinada, a través de ligamiento genético.
- Evaluar la participación de diferentes regiones cromosómicas previamente ligadas con el fenotipo de la HLFC en otras poblaciones a través de estudios de ligamiento.
- En caso de identificar regiones cromosómicas asociadas a la hiperlipidemia familiar combinada, se utilizará la estrategia de mapeo fino y asociación genética para la eventual identificación de los genes responsables de esta entidad.

V. Métodos

Familias en estudio

1. Características clínicas

Se estudiaron 24 familias de la población mexicana extensas y multigeneracionales diagnosticadas con HLFC. Se analizaron 314 individuos, de los cuales 144 se diagnosticaron como afectados. Las familias fueron captadas a través del Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Las familias incluidas en este estudio, no están relacionadas entre si. La raza de todos los sujetos incluidos en este estudio es mestiza. La estructura de las familias en término de número de generaciones, número de individuos afectados para los diferentes sub-fenotipos de la enfermedad se muestra con detalle en la tabla 3.

Tabla 3. Estructura de las 24 familias con HLFC incluidas en este estudio.

Individuos con ADN disponible (H/M)	314 (147 / 167)
Casos índice (H/M)	24 (12 / 12)
Estructura de las familias	
No. de familias con 2 generaciones*	5
No. de familias con 3 generaciones	13
No. de familias con 4 generaciones	6
No. de familias con menos de 5 afectados	8
No. de familias con 5 afectados	6
No. de familias con mas de 5 afectados†	10
No. de sujetos afectados (H/M)	
TG $\geq$ 90 percentila (H/M)	56 (24 / 32)
CT $\geq$ 90 percentila (H/M)	88 (30 / 58)
Fenotipo 2B combinado (H/M) ‡	34 (10 / 24)
HDL-C $\leq$ 10 percentila (H/M)	20 (12 / 8)
HLFC§	144 (54 / 90)

H/M indica hombre/mujer; TG, triacilglicerolos; CT, colesterol total; HDL-C, HDL colesterol; * Número de generaciones genotipificadas con individuos afectados y no afectados; † El número máximo de individuos afectados fue 14; ‡ fenotipo combinado 2B: CT y TG $\geq$ 90 percentila específica por edad/sexo para población mexicana; §HLFC: TG y/o TC $\geq$ 90 percentila.

1.1 Criterios diagnósticos de inclusión

Los criterios diagnósticos de inclusión para la HLFC, se determinaron por la presencia de hiperlipidemia primaria con expresión fenotípica variable, hipertrigliceridemia, (> 90 percentila) y/o hipercolesterolemia (> 90 percentila), ajustadas por edad y sexo y definidas con base en percentilas para la población mexicana (Aguilar-Salinas et al. 2001; Valles et al. 2002).

Recientemente, Veerkamp y col. (2004) reportaron que un criterio de inclusión importante en el diagnóstico de la HLFC, adicional de los niveles elevados de colesterol y triacilglicérol, son los niveles elevados de apolipoproteína B. En el presente estudio todos los casos índice presentan niveles elevados de apoB (valores > 90 percentila para la población mexicana).

En todas las familias se observó al menos un familiar en primer grado con fenotipo hiperlipidémico distinto al del caso índice y la manifestación de enfermedad arterial coronaria prematura, definida por la presencia de eventos coronarios en el caso índice o en al menos un familiar de primer grado. Como la expresión de la HLFC es dependiente de la edad, todos los individuos menores de 20 años fueron designados con estatus desconocido.

1.2 Criterios diagnósticos de exclusión

Se utilizaron criterios de exclusión para descartar la presencia de otro tipo de dislipidemia primaria o secundaria en los casos índice, como la presencia de diabetes tipo 2, xantomas tendinosos, distiroidismo, enfermedad renal y un IMC>30.

Para todos los sujetos incluidos en el estudio se completó un cuestionario sobre sus antecedentes médicos, hábitos de tabaquismo e ingesta de alcohol. El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del INCMNSZ. Todos los sujetos incluidos en el presente estudio otorgaron consentimiento informado y por escrito (Ver Anexo I.

2. Métodos analíticos de laboratorio

Todas las mediciones de lípidos en plasma se realizaron pre y post tratamiento. Las pruebas de laboratorio y las mediciones de la concentración en suero de colesterol y triacilglicérol se realizaron con métodos comerciales estandarizados (SERA-PAK®). Los niveles de colesterol HDL se determinaron utilizando ácido fosfotúngstico y Mg^{2+} y la concentración de colesterol LDL fue estimada mediante la fórmula de Friedewald. Las mediciones de apoB se realizaron utilizando un ensayo comercial de Beckman (Beckman®). La determinación de glucosa se llevó a cabo por el método enzimático de la glucosa oxidasa. Todas las mediciones se realizaron en el laboratorio del Departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del INCMNSZ mediante procesos estandarizados. Este laboratorio cuenta con la certificación para la estandarización de pruebas de laboratorio del "External Comparative Evaluation of Laboratories Program of the College of American Pathologists".

3. Extracción de ADN

El aislamiento de ADN se realizó por medio de lisis hipotónica de eritrocitos a partir de sangre total o de líneas linfocíticas, a través de la digestión con proteinasa K, seguida por una extracción con fenol/cloroformo. La cuantificación de las muestras de ADN se estimó por medio de electroforesis utilizando estándares comerciales. Los ADNs geonómicos fueron almacenados a 4°C.

4. Genotipificación de marcadores

4.1 Marcadores microsatélites para el estudio de genes candidatos funcionales

La genotipificación de los marcadores se realizó utilizando el protocolo estándar de la PCR. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en un secuenciador automático de ADN (Applied Biosystems 373). Se utilizaron marcadores intragénicos para cada uno de los genes candidatos analizados (lipasa lipoproteica, lipasa hepática, el gen de la lecitina colesterol acil transferasa, apoA-II y el gen del cluster de las apolipoproteínas A-I/C-III/A-IV). Estos

marcadores fueron seleccionados mediante diferentes bases de datos: GDB database (<http://gdb.org>), CEPH Genotype Database (<http://cephb.fr/cephdb/>), y GeneMap'99 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genmap/>).

4.2 Marcadores microsatélites para el análisis de la región 1q21q23

Los marcadores genéticos para el análisis del cromosoma 1, fueron los previamente reportados en otros estudios (Pajukanta et al. 1998; Pei et al. 2000). No obstante, utilizamos datos de marcadores adicionales para el análisis de ligamiento en esta región, los marcadores fueron seleccionados de diferentes bases de datos: GDB database (<http://gdb.org>), CEPH Genotype Database (<http://cephb.fr/cephdb/>), con base en su informatividad y ubicación.

4.3 Marcadores microsatélites para el estudio las regiones cromosómicas 2p, 9p, 10p, 11p, 16q, 19q y 21q

Se analizaron 26 marcadores microsatélites distribuidos en siete regiones cromosómicas previamente ligadas a la HLFC y a los diferentes subfenotipos de la enfermedad reportados para otras poblaciones (2p, 9p, 10p, 11p, 16q, 19q y 21q). Los marcadores se seleccionaron a partir de los resultados obtenidos en estudios previos (Aouizerat et al. 1999, Pajukanta et al. 1999, 2003). Los marcadores microsatélites fueron genotipificados usando un secuenciador automático (ABI Prism 3700 ADN Analyzer). Los datos fueron analizados utilizando el programa Genotyper 3.7 (ABI®).

5. Genotipificación de SNP's

Para el análisis de la región en cromosoma 1, se genotipificaron un total de 13 SNPs para el análisis del gen USF1 y dos genes que lo flanquean (F11R y el gen LOC257106), ocho de los SNPs analizados fueron previamente reportados por Pajukanta y col. (2004). Adicionalmente, se incluyeron cinco SNPs en la región (rs1023115, rs1240334, rs2481084, 2774279 y rs3813610). Los SNPs fueron seleccionados en diferentes bases de datos (The dbSNP database, The Hapmap Project database) La genotipificación se realizó mediante la técnica de pirosecuenciación,

(<http://www.pyrosequencing.com>). Los genotipos se analizaron en una plataforma automatizada PSQHS96A.

6. Análisis de secuencia del gen TXNIP

Se secuenciaron los 8 exones que comprenden el gen TXNIP, incluyendo las uniones exón-intrón y 1 kB de la región promotora, usando oligonucleótidos específicos basados en la secuencia reportada en el Gene Bank (NM_006472.1). El análisis de secuencia se realizó en los casos índice de las familias 1-7 (ver árboles genealógicos en el apéndice I). Las reacciones de secuencia fueron realizadas con Big Dye Terminator Kit v3 usando un secuenciador 3100 (Applied Biosystems).

7. Análisis de secuencia del gen USF1

Se secuenciaron los 11 exones que comprenden el gen USF1, incluyendo las uniones exón-intrón. El análisis de secuencia se realizó en 4 casos índice (Fam. 1,4,5,10 ver árboles genealógicos anexo II), todos los casos índice seleccionados presentaban el haplotipo de riesgo (1-1) y 4 sujetos control (esposos). Las reacciones de secuencia fueron realizadas con Big Dye Terminator Kit v3 usando un secuenciador 3100 (Applied Biosystems). El análisis de secuencia se realizó con el programa sequencher 4.2 (Gene codes corporation®).

8. Análisis estadístico

8.1 Análisis estadístico para el estudio la región 1q21q-23

En la primera etapa del estudio, el análisis de ligamiento genético se realizó utilizando el programa GENEHUNTER-TWO LOCUS (Strauch et al. 2000) para el análisis de dos puntos (un marcador-un fenotipo) y GENEHUNTER-PLUS (Kong y Cox, 1997), para el análisis de múltiples puntos (evalúa la participación de un grupo de marcadores con un fenotipo). Se realizó el análisis de ligamiento paramétrico y no paramétrico. En base a reportes previos y a que no existen estimaciones epidemiológicas de la frecuencia de la HLFC en México, se asumió la frecuencia del gen de 0.006 para el modo de herencia dominante y 0.1095 para el modo de herencia recesivo, previamente reportado en otras poblaciones (Pajukanta et al. 1998, 1999, 2003, 2004). Debido a que se ha observado heterogeneidad genética para este padecimiento y que la población en estudio no es homogénea (población mestiza), se estimó el valor de LOD score de heterogeneidad (HLOD), el cual permite determinar si existe la participación de una región (locus) común en un grupo de familias. Las frecuencias alélicas utilizadas en el análisis, fueron determinadas a partir del estudio de individuos no relacionados de la población mexicana. El análisis de ligamiento con marcadores microsatélites se realizó para el rasgo de HLFC, niveles elevados de triacilglicerolos (TG) y niveles elevados de colesterol (CT).

8.2 Análisis estadístico para el estudio de asociación para USF1

Para evaluar la contribución del gen USF1 en las familias con HLFC de la población mexicana, se utilizaron los mismos programas estadísticos empleados previamente en el estudio de asociación con el gen USF1 reportado en la población finlandesa (Pajukanta et al. 2004). Se utilizaron los programas Haplotype-based haplotype risk (HHRR) (Terwiller y Ott, 1992) Gamete Competition (Sinsheimer et al. 2000) y Family-Based Association Test (FBAT) (Laird et al. 2000). El programa HHRR permite evaluar la distribución entre alelos transmitidos y no transmitidos. El programa Gamete Competition asume la hipótesis nula de no asociación y no ligamiento, con este programa el análisis de ligamiento contribuye al valor de p observado. El

programa FBAT compara la hipótesis nula (no ligamiento) con la hipótesis alterna de ligamiento para un determinado marcador, este programa es útil para determinar asociación o asociación en presencia de ligamiento. El programa FBAT tiene dos opciones, la opción -o (offset) mide no solamente la transmisión preferencial del haplotipo de susceptibilidad de los individuos afectados en una familia, sino que también mide la transmisión preferencial en los sujetos no afectados, siendo esto útil en el análisis de familias extensas. La opción -e (empirical), es una prueba estadística que usa una varianza empírica, esta opción es útil para determinar asociación en una área en la que previamente se detectó ligamiento (la hipótesis nula asume ligamiento pero no asociación). El análisis de haplotipos entre SNPs se realizó utilizando el programa HBAT. Diferentes análisis estadísticos fueron utilizados con la finalidad de corroborar los resultados. Se evaluó el fenotipo de HLFC y el subfenotipo TG.

Para determinar el desequilibrio de ligamiento genético (LD) entre los diferentes SNPs analizados, se utilizó el programa JLIN: JAVA LD PLOTTER (<http://www.genepi.com.au/project/jlin>).

8.3 Análisis estadístico para las regiones 2p, 9p, 10p, 11p, 16q, 19q y 21q

Se realizó el análisis de ligamiento paramétrico y no paramétrico, utilizando los programas MLINK y SIBPAIR respectivamente, implementados en el paquete ANALYZE (Goring y Terwiller, 2000). El análisis de ligamiento no paramétrico se realizó mediante el método de pares de hermanos (ASP, por sus siglas en inglés: analysis sib-pair). El método computa el número de alelos compartidos y no compartidos entre todos los hermanos afectados y un solo caso índice (Holmans, 1998; Freimer y Sabatti, 2004). Se utilizó el programa GENE-HUNTER PLUS para el análisis de ligamiento en múltiples puntos. Las frecuencias alélicas de todos los individuos fueron calculadas utilizando el programa DOWNFREQ (Goring y Terwiller 2000b). Para detectar inconsistencias de segregación dentro de las familias, se utilizó el programa PedCheck (O'connell y Weeks, 1998). Se utilizó el programa SIMWALK para determinar inconsistencias en

los eventos de recombinación dentro de las familias y la opción MISTYPING del programa MENDEL (Lange et al. 2001), para detectar errores de genotipificación.

El análisis de ligamiento con marcadores microsatélites se realizó para el rasgo de HLFC y para los diferentes subfenotipos característicos de este padecimiento: niveles elevados de triacilgliceroles (TG), niveles elevados de colesterol (CT), y bajos niveles de colesterol HDL.

VI. Resultados

1. Resultados clínicos y mediciones de laboratorio

Los resultados clínicos y las mediciones de laboratorio de los sujetos en estudio divididos en diferentes grupos: no afectados, esposos y casos índice se muestran en la tabla 4. El perfil de lípidos concuerda con los criterios de diagnóstico para la HLFC observados en otras poblaciones, el diagnóstico fue confirmado en las 24 familias incluidas en este estudio.

Tabla 4. Características fenotípicas de los miembros de las familias en estudio.

	No afectados H/M	Esposos H/M	Casos índice H/M
<i>n</i>	123 (59/64)	32 (17/15)	24 (12/12)
Edad (años)	39.4±17.2/37.1±17.6	49.5±11.0/47.4±9.5	53.4±12.2/58.7±14.1
IMC (kg/m ²)	23.9±4.6/24.1±3.6	26.0±1.87/26.5±3.4	26.8±3.3/27.1±5.9
CT (mmol/L)	5.4±0.8/5.4±0.9	4.8±1.0/5.1±0.9	6.5±0.6/7.3±1.4
TG (mmol/L)	1.5±0.3/1.7±0.9	2.4±1.0/1.3±0.9	4.1±0.7/4.1±0.6
HDL-C (mmol/L)	1.2±0.5/1.5±0.7	0.9±0.2/1.3±0.6	0.9±0.1/0.9±0.2
apoB (mg/dL)	90.2±30.3/87.7±27.6	99.0±27.3/88.2±24.3	127.6±16.0/135.9±23.5
Glucosa (mmol/L)	4.7±0.9/4.9±0.8	4.7±0.7/4.9±1.2	4.9±1.3/5.0±0.7

Los valores representan el promedio ± DS. H/M indica hombre/mujer; IMC, índice de masa corporal; CT, colesterol total; TG, triacilglicerolos; HDL-C, colesterol-HDL; apoB, apolipoproteína B.

2. Análisis de Ligamiento en Genes Candidatos funcionales

Se analizaron 7 genes involucradas en el metabolismo de lípidos con un papel potencial en la fisiopatología de la HLFC (LH, LPL, apoA-II, apoA-I/C-III/A-IV y LCAT), en 7 familias incluidas en la primera etapa del estudio (árboles genealógicos 1-7).

No se observó evidencia significativa de ligamiento para ninguno de los genes analizados, sin embargo, debido a que valores de -2 son considerados como valores de exclusión de ligamiento, no fue posible descartar la participación de los genes analizados en estas familias (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de HLOD obtenidos en el estudio de 7 genes candidatos funcionales.

Gen	HLFC	TG	TC	*
	HLOD (α)	HLOD (α)	HLOD (α)	
Cluster apoA-I/C-III/A-IV/A-5				
ApoA-I (intragénico)	-0.0004 (.0005)	-0.0003 (.0004)	0.024(.07)	0.38
D11S1989	-0.0001 (0)	0 (0)	0.0001 (.0001)	0.45
Lipasa lipoproteíca				
LPL (intragénico)	0 (0)	0.31 (.28)	0 (0)	0.52
Lipasa hepática				
HL (Intragénico)	0.299 (.16)	-0.0001 (.0001)	0.19 (.19)	0.41
LCAT				
D16S496	-0.0002 (.0001)	0.042 (.10)	0.006 (.07)	0.42
D16S2624	- 0.0001 (.0001)	0.016 (.08)	0 (0)	0.4

* Informatividad de los marcadores. α (proporción de familias ligadas).

3. Análisis de ligamiento en dos puntos para la región 1q21-q23

Debido a la consistencia de las réplicas observadas en otras poblaciones para la región 1q21-q23 ligada a la HLFC, se analizó esta región utilizando 11 marcadores microsatélites ubicados en un intervalo de 22 cM. Se utilizó el programa GENEHUNTER-PLUS para determinar el HLOD (LOD score de heterogeneidad) con el propósito de evaluar la contribución de este locus en las familias. El valor máximo de ligamiento se observó con el marcador D1S2768 para el rasgo de niveles elevados de triacilgliceroles e HLFC, resultando en valores de HLOD de 1.93 ($\alpha = 0.43$) y 1.67 ($\alpha = 0.49$) y valores de NPL de 2.35 y 2.91 respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de HLOD y NPL obtenidos en el análisis de la región 1q21q23.

Marcador	cM	HLFC		TG		TC	
		HLOD (α)	NPL (p)	HLOD (α)	NPL (p)	HLOD (α)	NPL (p)
D1S2635	165.6	1.017 (.41)	0.97 (.16)	0.70 (.24)	0.35 (.355)	-0.001 (0)	0.15 (.41)
apoA-II	170.8	0.27 (.48)	1.09 (.14)	0.198 (.42)	1.07 (.126)	-0.002 (0)	0.26 (.37)
D1S2768	172.9	1.67 (.49)	2.91 (.003)	1.93 (.43)	2.35 (.01)	0.72 (.22)	1.19(.104)
D1S104	175.2	0.43 (.28)	1.66 (.055)	0.70 (.40)	1.60 (.049)	0.58 (.31)	0.93 (.15)
D1S400	175.2	0.11 (.26)	3.06 (.002)	0.02 (.098)	2.58 (.005)	0.21 (.16)	1.54 (.056)

HLOD, LOD score de heterogeneidad; NPL, LOD score no paramétrico; HLFC, fenotipo combinado; TG, rasgo niveles elevados de triacilgliceroles; CT, rasgo niveles elevados de colesterol (α) proporción de familias ligadas; (p) valor de p.

El análisis de múltiples puntos mostró evidencia de ligamiento con el marcador D1S2768 resultando en valores de NPL de 4.0 ($p = 0.0001$), 3.6 ($p = 0.0003$) y 1.38 ($p = 0.07$) para los fenotipos de HLFC, TG y CT respectivamente.

3.1 Análisis de dos puntos para la región 1q21- q23 por familia

Para evaluar la contribución de cada una de las familias en el resultado de ligamiento positivo para este locus, se realizó un análisis de dos puntos en cada familia para los rasgos de HLFC, TG y CT. El valor de LOD score máximo obtenido fue de 2.01 para el marcador D1S2768 en la familia 1 (Ver Árbol genealógico 1) (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del análisis de ligamiento en dos puntos para la región 1q21-q23.

Familia	Marcador	HLFC	TG	CT
1	D1S2768	2.01	1.93	1.70
2	D1S400	0.05	–	–
3	–	–	–	–
4	D1S104	0.50	0.84	0.77
5	D1S2768	0.28	1.19	0.0
	D1S400	0.39	0.58	1.13
6	D1S2768	0.58	–	–
7	apoA-II	0.13	–	–

4. Análisis de la secuencia del gen TXNIP

De manera interesante, el valor de LOD score máximo obtenido en el análisis de múltiples puntos (cercano al marcador D1S2715), se localizaba muy cerca en el mapa físico al gen TXNIP, un candidato interesante por los reportes previos y por su asociación con el fenotipo de HLFC en el ratón (Castellani, et al. 1998) . Se secuenciaron los 8 exones y las uniones exón-intrón del gen y 1Kb del promotor de todos los casos índice de las familias 1-7, sin encontrar cambios en la secuencia del gen asociados al fenotipo.

5. Estudios de asociación para el análisis del gen USF1

Debido a la evidencia de ligamiento observada en nuestras familias en la región 1q21-q23 y a la evidencia de asociación para el gen USF1 reportada recientemente en familias de la población finlandesa (Pajukanta et al. 2004), se analizaron 13 SNPs, ubicados en una región que comprende 88 Kb, se incluyeron 8 SNPs previamente asociados a la HLFC y al rasgo de triacilgliceroles elevados en población finlandesa. Para este análisis se incluyeron 17 familias adicionales, analizando un total de 24 familias de población mexicana multigeneracionales y extensas. Las asociaciones significativas del análisis de asociación, utilizando diferentes programas estadísticos (ver Métodos), se muestra con detalle en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados del análisis de asociación con SNPs para el análisis del gen USF1 para el rasgo de triacilgliceroles e HLFC

Gen	SNP	Distancia entre SNPs (pb)	Triacilgliceroles			HLFC		
			p^*	$p^\dagger$	$p^\ddagger$ -o -e	p^*	$P^\dagger$	$p^\ddagger$ -o -e
IG	rs1023115	3,145						
IG	rs1240334	30,260						
F11R	rs836	21,390						
	(f11rs1)§							
F11R	rs2481084	7,140						
F11R	(f11rs4)§	10,572	0.02	0.002	0.001 0.04		0.01	0.006
F11R	rs4339888	2,197						
	(f11rs5)§							
USF1	rs3737787	1,239		0.005	0.005 0.02	0.05	0.01	0.02 0.05
USF1	rs2073658	593	0.04	0.003	0.001		0.05	
	(usf1s2)§							
USF1	rs2073656	1,235						
USF1	rs2073655	1,780						
USF1	rs2516838	3,186						
	(usf1s8)§							
LOC257106	rs2774279	5,083						
LOC257106	rs3813610							

Todos los resultados representan valores de p ; *valores de p obtenidos con el programa HHRR; † valores de p para ligamiento y asociación obtenidos con el programa gamete competition; ‡

valores de p obtenidos con el programa FBAT usando las opciones -o y -e respectivamente. Todas las celdas en blanco indican valores de $P > 0.05$. E (exón), I (intrón), IG (SNPs intergénicos), ITLN2, gen de la interlectina 2, F11R, gen F11R, gen USF1, LOC257106, proteína hipotética LOC257106. Las distancias entre SNPs, se basan en las distancias reportadas por la UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>). § SNPs asociados previamente en población finlandesa.

Los resultados obtenidos en el análisis de SNPs utilizando diferentes programas estadísticos, mostraron evidencia de ligamiento y asociación con los SNPs hCV1459766, rs3737787 y rs2073658.

5.1 Análisis de haplotipos

Se realizó el análisis de haplotipos con aquellos SNPs en los que se mostró evidencia de asociación hCV1459766, rs3737787 y rs2073658. El valor de p mas significativo se observó con los SNPs hCV1459766-rs3737787, para el rasgo de TG ($P = 0.0009$) (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de haplotipos para los rasgos de HLFC y TG usando el programa HBAT.

	Haplotipo de SNPs hCV1459766-rs3737787		Haplotipo de SNPs rs3737787-rs2073658	
	TG	HLFC	TG	HLFC
HBAT -e				
Haplotipo 11	0.0009	0.02	0.006	0.03
Haplotipo 22	0.001	0.02	0.02	0.06

El haplotipo de susceptibilidad fue 1-1 (1 indica el alelo mas frecuente). El haplotipo 2-2 (2 indica el alelo menos frecuente).

El disequilibrio ligamiento entre los 13 SNPs incluidos en el análisis se muestra con detalle en la Figura 4. Se observó un disequilibrio de ligamiento mayor en los casos índice cuando se

comparó con el grupo de individuos control (esposos), para los SNPs que mostraron evidencia significativa de asociación (hCV1459766, rs3737787 y rs2073658).

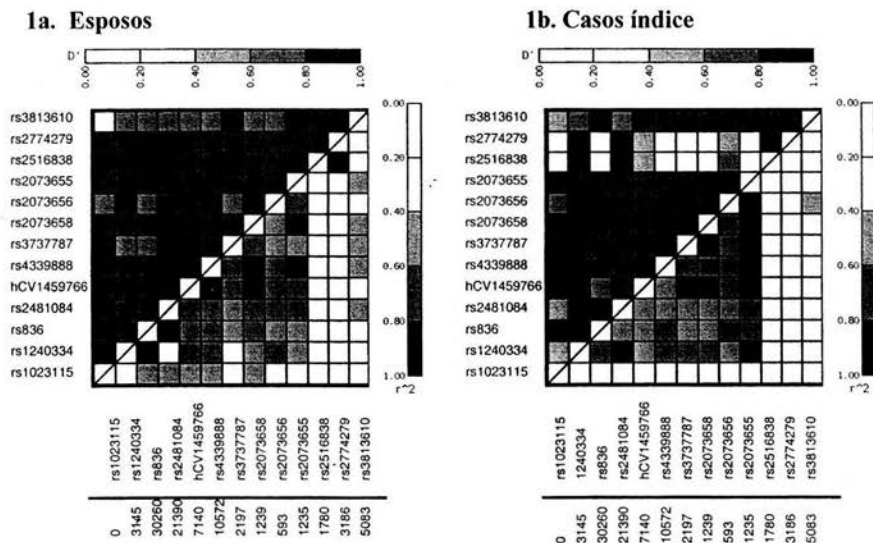


Figura 4. Desequilibrio de ligamiento entre los SNPs incluidos en este estudio. La ubicación de los SNPs esta dada en pares de bases. La escala del valor de D' se muestra en la parte superior de la figura 1a y 1b respectivamente. La escala de r^2 se presenta en la parte izquierda de la figura 1a y 1b.

6. Análisis de secuencia del gen USF1

Debido a la evidencia de asociación entre el fenotipo de HLFC y los niveles elevados de triacilglicerolos, en las familias en estudio se analizó el gen USF1 por secuenciación automática.

Se secuenciaron los 11 exones y las uniones exón-intrón del gen USF1, se identificaron 6 variantes alélicas, sin embargo ninguna de estas variantes codifica para un cambio de aminoácido (Tabla 10).

Tabla 10. Variantes identificadas en la secuencia del gen USF1.

Exón	SNP	cambio	Posición
Promotor	rs1556259	C/T	157827722-157827722
1	rs6686076	A/G	157826385-157826385
2	rs2073653	A/G	157825833-157825833
5	rs2774276	C/G	157824789-157824789
6	rs2516840	T/C	157824390-157824390
7	rs2516841	T/C	157823847-157823847

7. Análisis de ligamiento para las regiones 2p, 9p, 10q, 11q, 16q, 19q y 21q

Debido a que la HLFC es una entidad compleja y heterogénea, se analizaron 7 diferentes regiones cromosómicas (2p25.1, 9p23, 10q11.23, 11q13, 16q24.1, 19q13 y 21q21), previamente ligadas al fenotipo de la HLFC y a los diferentes subfenotipos característicos de esta entidad en población caucásica. Se observó evidencia de ligamiento para el cromosoma 16, asociado al rasgo de colesterol total. (Tabla 11). El valor de LOD score máximo obtenido fue para el marcador D16S505 (ASP= 2.6). Adicionalmente, se realizó el análisis por múltiples puntos para esta región, sin embargo los valores de LOD score no fueron significativos.

Tabla 11. Resultados del análisis de ligamiento paramétrico de dos puntos y no paramétrico en pares de hermanos (ASP) para el análisis del cromosoma 16 asociado al rasgo de CT.

Marcador	Posición * (cM)	LOD score†	ASP
			LOD score
D16S507	105.17	0.1 (0.3)	1.1
D16S505	108.96	0.6 (0.1)	2.6
D16S3091	111.12	0.2 (0.3)	0.0

ASP, prueba de pares de hermanos. *La posición de los marcadores esta basada en Marshfield Center for Medical Genetics Database (<http://www2.marshfieldclinic.org>). † Máximo LOD score observado usando un modo de herencia dominante. La fracción de recombinación esta dada entre paréntesis. No se observó evidencia significativa de ligamiento para las otras regiones cromosómicas analizadas (ver anexo III).

Adicionalmente, valores sugestivos de ligamiento fueron observados en el análisis de la región 10q11-23, resultando en valores máximos de LOD score de 1.8 para el marcador D10S1772, ligado al rasgo de niveles elevados de triacilglicerolos, sin embargo, para el análisis de múltiples puntos no se obtuvieron valores de LOD score significativos. No se observó evidencia de ligamiento para las regiones 2p, 9p, 11p, 19q y 21q (Anexo III).

VII. Discusión

Las enfermedades complejas, como la aterosclerosis, la diabetes, la hipertensión arterial y la hiperlipidemia familiar combinada se definen como aquellas enfermedades comunes causadas por la alteración de múltiples genes de susceptibilidad que a su vez son influenciados por la presencia de factores ambientales. La hiperlipidemia familiar combinada es la más común de las dislipidemias de tipo familiar asociada con la enfermedad arterial coronaria prematura. En el presente estudio se analizó de manera extensa el componente genético de la HLFC en 24 familias multigeneracionales de la población mexicana mediante la utilización de diferentes estrategias metodológicas que han sido exitosamente empleadas para la identificación de los genes asociados con la enfermedad en otras poblaciones.

1. Análisis de genes candidatos funcionales

Aunque la HLFC fue descrita originalmente como un padecimiento monogénico (Goldstein et al. 1973), estudios posteriores demostraron que la HLFC tiene un componente oligogénico (Kwiterovich, 1993; Aouizerat et al. 1999). Diversos estudios en diferentes genes candidatos funcionales han demostrado la participación de múltiples genes en la expresión de la HLFC. Para evaluar la contribución de los genes candidatos más estudiados en otras poblaciones como el gen de la lipasa lipoproteica (Gagné et al. 1994; Reymer et al. 1995; Yang et al. 1995), el gen de la lipasa hepática (Allayee et al. 2000), el gen de la lecitina colesterol acil transferasa (Aouizerat et al. 1999c), el gen de la apoA-II (Allayee et al. 2003) y el gen del cluster de las apolipoproteínas apoA-I/C-III/A-IV/A-5 (Wojciechowski et al. 1991; Marcil et al. 1996; Dallinga-Thie et al. 1997; Wijsman et al. 1998), se analizaron marcadores microsatélites intragénicos o cercanos a cada uno de estos genes en siete familias de la población mexicana con HLFC.

El análisis de ligamiento en dos puntos no mostró evidencia significativa de ligamiento para ninguno de los genes candidatos analizados (Tabla 5). Sin embargo no se pudo descartar la participación de los genes de la LH, LPL y apoA-II como genes de susceptibilidad asociados con la HLFC, ya que valores de -2 son considerados como valores de exclusión. Estos resultados

pueden ser en parte debido al número relativamente pequeño de familias y/o a la heterogeneidad genética de la HLFC. No obstante, en reportes previos en diferentes poblaciones se han reportado valores modestos de ligamiento para los mismos genes candidatos funcionales analizados, concluyendo que ninguno de estos genes participa de manera primaria en la regulación del metabolismo de lípidos, si bien se considera que pueden contribuir como genes modificadores.

2. Evidencia de ligamiento para la región 1q21-q23

Reportes previos en diferentes poblaciones (Pajukanta et al. 1998; Pei et al. 2000; Coon et al. 2000) han demostrado la contribución de la región 1q21-q23 en la expresión de la HLFC. Adicionalmente, esta región ha resultado de interés debido a que ha sido involucrada también con el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2. Esta región comprende diferentes genes que participan en el metabolismo de lípidos, entre los que destacan, apoA-II y USF1.

Para determinar la contribución de la región 1q21-q23 en la expresión de la HLFC en las familias mexicanas con HLFC (árboles genealógicos 1-7-anexo II), se evaluó a través de ligamiento genético la participación de 11 marcadores microsatélites distribuidos en una región de 22 cM. El análisis de ligamiento en dos puntos mostró un valor de LOD score máximo de heterogeneidad para el marcador D1S2768 de 1.93 ($\alpha = 0.43$) para el rasgo de TG. El análisis de múltiples puntos mostró valores de ligamiento de 1.27 ($\alpha = 0.46$) y 1.64 ($\alpha = 0.38$) para el rasgo de HLFC y TG. El marcador D1S2768 se encuentra localizado a una distancia aprox. de 2 cM respecto al marcador D1S104 que fue originalmente ligado con la HLFC en familias de la población finlandesa (Pajukanta et al. 1998) y posteriormente en familias de la población norteamericana (Coon et al. 2000). Asimismo, Pei y col. (2000) observaron valores de HLOD de dos puntos de 1.52 y 1.40 en el análisis de la población china y alemana con el marcador D1S194 ubicado a una distancia de aproximada de 3 cM del marcador D1S2768.

Los resultados de ligamiento en las familias mexicanas se pudieron confirmar con el análisis de múltiples puntos no paramétrico (NPL) para el fenotipo de la HLFC y TG, resultando en valores de LOD score de 4.00 ($p = 0.0001$) y 3.68 ($p = 0.0003$), respectivamente para el marcador

DIS2768. De manera interesante los resultados obtenidos en este estudio muestran valores máximos de LOD score para los fenotipos de HLFC y triacilgliceroles elevados, al igual que lo observado en los reportes previos (Pajukanta et al. 1998; Pei et al. 2000; Coon et al. 2000). Los resultados de ligamiento observados en las diferentes poblaciones analizadas, extienden la evidencia de ligamiento a un intervalo de 6 cM.

Debido a que la HLFC es una entidad genéticamente heterogénea, se realizó un análisis de dos puntos en cada una de las familias para evaluar la contribución de cada una de ellas. El valor de LOD score máximo observado fue de 2.01 para el marcador DIS2768 en la familia 1 (Ver Árbol genealógico 1-Anexo II) (Tabla 7). Estos datos sugieren la participación de otros loci en la expresión de la HLFC en la mayoría de nuestras familias y por lo tanto heterogeneidad genética para este padecimiento en la población mexicana.

Estos datos proporcionan la primera evidencia de ligamiento a la región 1q21-q23 en familias con HLFC en la población mexicana. Este hallazgo es consistente con los resultados observados en las poblaciones finlandesa, china, alemana y norteamericana, lo cual sugiere un locus común para HLFC y específicamente, para el rasgo de triacilgliceroles elevados, aún a pesar de la heterogeneidad del padecimiento y la diversidad étnica de las poblaciones estudiadas.

3. Análisis de secuencia del gen TXNIP

Desde la identificación de una mutación en la proteína Txnip (thioredoxin interacting protein) en el ratón mutante Hcb19, que resultaba en una dislipidemia mixta similar a lo observado en pacientes con HLFC (Bodnar et al. 2002), y a la sintenia de esta región con la región 1q21-q23, previamente ligada a la HLFC en humanos (Pajukanta et al. 1998; Coon et al. 2000; Pei et al. 2000), el gen TXNIP resultó un gen candidato posicional interesante para el estudio de la HLFC.

Estudiamos por secuencia directa los 8 exones que constituyen el gen, las uniones exón-intrón y 1 Kb de la región promotora del gen humano TXNIP, en 7 casos índice de las familias en estudio, y no se identificaron cambios en la secuencia en ninguno de los individuos, por lo que se descartó este gen como responsable de la HLFC en las familias analizadas. Pajukanta y col (2004) y Vander y col. (2004b) estudiaron la participación del gen TXNIP en familias de la

población finlandesa y norteamericana respectivamente y en ningún caso se identificaron variantes alélicas que resultaran en cambio de aminoácido. Por lo tanto se sugiere que el gen TXNIP, no participa en la expresión de la HLFC en el humano.

4. USF1 asociado con el fenotipo de HLFC

Recientemente, USF1 fue reportado como el primer gen mayor asociado con la HLFC en familias de población finlandesa. USF1 es un gen que se encuentra localizado en la región 1q23 y que juega un papel importante en la regulación del metabolismo de lípidos en respuesta a señalización de glucosa e insulina.

En el presente estudio se evaluó la contribución de USF1 en las familias de la población mexicana a través de asociación genética, utilizando 13 SNPs distribuidos en una región de 88 Kb. Los estudios de asociación, han sido exitosamente utilizados para la identificación de variantes genéticas que contribuyen a la susceptibilidad en la expresión de las enfermedades complejas.

Para el análisis de asociación genética se incluyeron 17 familias adicionales de la población mexicana, diagnosticadas con HLFC (ver anexo II. árboles genealógicos 8-24). Un total de 24 familias y 314 genotipos fueron analizados.

El análisis de asociación para el gen USF1 en estas familias mostró evidencia de asociación entre variantes en este gen y el fenotipo de la HLFC y particularmente asociado con niveles elevados de TG. Los SNPs que mostraron evidencia significativa de asociación para ambos rasgos (HLFC y TG) fueron los SNPs hCV1459766, rs3737787 y rs2073658. De manera interesante, el análisis de haplotipos para hCV1459766-rs3737787 mostró evidencia de asociación significativa para ambos rasgos TG ($p = 0.0009$) y HLFC ($p = 0.02$).

El alelo asociado con la HLFC y los niveles elevados de triacilgliceroles fue el alelo más frecuente (alelo 1-1). La transmisión del haplotipo poco frecuente (alelo 2-2) en los individuos afectados fue baja, similar a lo reportado en la población finlandesa (Pajukanta et al. 2004).

La evidencia de asociación mas significativa se observó con los haplotipos de los SNPs hCV1459766-rs3737787 (versus los SNPs rs3737787-rs2073658 en Finlandeses), esto pudiera explicarse por posibles diferencias en el desequilibrio de ligamiento entre ambas poblaciones.

evidencia significativa de asociación (hCV1459766, rs3737787 y rs2073658), se observó un desequilibrio de ligamiento mayor en los casos índice cuando se comparó con el grupo de individuos control (esposos) (Figura 4).

Estos datos indican la participación del gen USF1 en la expresión de la HLFC y en la regulación de los triacilglicérols en las familias con HLFC de la población mexicana.

5. Análisis de secuencia del gen USF1

Para la posible identificación de variantes alélicas en el gen USF1, asociadas con el fenotipo, se realizó el análisis de secuencia en cuatro casos índice (que presentaban el haplotipo de riesgo 1-1), y cuatro controles (esposos) de las familias con HLFC. Se identificaron seis variantes alélicas (intrónicas) (Tabla 10), sin embargo ninguna de ellas codifica para un cambio de aminoácido. Estos datos coinciden con lo reportado por Pajukanta y col (2004), donde se secuenciaron 60 casos índice con HLFC y no se identificaron variantes que codificara para un cambio de aminoácido.

En este sentido, diversos estudios sugieren que más que la asociación con variantes específicas en el gen USF1 los valores de asociación son el resultado del desequilibrio de ligamiento observado en la región. Asimismo y debido a que valores de asociación significativos fueron observados para el SNP hCV1459766 localizado en el gen F11R, no se puede descartar la posibilidad de que variantes alélicas en este gen, o bien una interacción entre dos o más genes contribuyan al fenotipo de la HLFC.

Para dilucidar la contribución biológica de USF1 y F11R en la expresión de la HLFC, se requieren de estudios funcionales para determinar el posible efecto de las variantes alélicas asociadas sobre la regulación de USF1 en cis o la identificación de diferentes isoformas del gen USF1 que participen en la regulación de genes importantes en el metabolismo de lípidos.

Análisis de ligamiento para las regiones 2p, 9p, 10p, 11p, 16q, 19q y 21q

Debido a que la HLFC es una entidad compleja y heterogénea y a la posibilidad de identificar regiones cromosómicas adicionales que contribuyan a la manifestación de la HLFC en las familias mexicanas, se analizaron siete regiones previamente ligadas a la HLFC en diferentes poblaciones: 2p, 9p, 10p, 11p, 16q, 19q y 21q (Pajukanta et al. 1998, 2003; Allayee et al. 2002; Aouizerat et al. 2002; Soro et al. 2002; Naoumova et al. 2003).

En el presente estudio el análisis de ligamiento en dos puntos mostró evidencia sugestiva de ligamiento para el cromosoma 16q24.1, particularmente para el rasgo de niveles elevados de colesterol total, con valores de LOD score de 2.6 para el marcador D16S505. Adicionalmente, se obtuvieron valores de LOD score de 2.2 en el análisis de múltiples puntos. Reportes previos han demostrado evidencia de ligamiento a la región 16q en familias de la población finlandesa y holandesa asociada con bajos niveles de HDL-C (Pajukanta et al. 2003; Soro et al. 2003). De manera interesante, en este estudio también se reportaron valores sugestivos de ligamiento (LOD score = 1.6) para niveles elevados de colesterol total con el marcador D16S3091, localizado a 2.1 cM del marcador D16S504 (el cual mostró evidencia de ligamiento en las familias de la población mexicana). Asimismo, esta región también ha sido asociada con niveles elevados de colesterol HDL en México-Americanos (Mahaney et al. 2003). Aunque el valor máximo de LOD score se observó para un rasgo diferente a lo reportado en las familias holandesas y finlandesas, la heterogeneidad genética de la HLFC y el proceso ambiental que regula la expresión de los fenotipos complejos en cada población pueden contribuir a la diferencia observada.

Adicionalmente observamos evidencia sugestiva de ligamiento para la región 10p, resultando en valores máximos de LOD score de 1.8 para el marcador D10S1772, asociado al rasgo de niveles elevados de triacilglicérols. En estudios previos, la región 10p ha sido ligada con los fenotipos de TG y colesterol HDL en familias finlandesas con HLFC (Pajukanta et al. 1999; Lilja et al. 2004). Sin embargo, en el análisis de múltiples puntos no se obtuvieron valores de LOD score

significativos. No se observó evidencia de ligamiento para las regiones 2p, 9p, 11p, 19q y 21q (Anexo III).

Diversos estudios epidemiológicos (Stern et al. 1991; Aguilar-Salinas et al. 2001; 2003), han demostrado que en México existe una alta predisposición genética para padecer diferentes enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2, el síndrome metabólico y distintas dislipidemias primarias. En la población mexicana, se ha estimado que aproximadamente un 20% de la población padece algún tipo de dislipidemia mixta (Aguilar-Salinas et al. 2001), por lo que la necesidad de identificar loci, variantes genéticas o genes que confieren susceptibilidad para desarrollar este tipo de enfermedades es de gran importancia. Finalmente, el escrutinio completo del genoma en las familias con HLFC de la población mexicana proveerá información adicional para la identificación de nuevos loci involucrados en la expresión genética de la HLFC, así como posible papel en otro tipo de dislipidemias comunes.

VIII. CONCLUSIONES

Se descartó la participación de 7 genes candidatos funcionales en la expresión de la HLFC en las familias estudiadas.

- Se observó evidencia de ligamiento para la región 1q21-q23 asociada con la HLFC y el rasgo de niveles elevados de triacilglicerolos.
- El 59% de las familias analizadas mostraron evidencia de ligamiento para la región 1q21-q23. Sin embargo, debido a que un alto porcentaje de las familias en estudio (41%) no mostraron evidencia de ligamiento a ninguno de los genes candidatos ni a la región en cromosoma 1, se sugiere la participación de otros loci, y por lo tanto heterogeneidad genética para la HLFC en las familias de la población mexicana analizadas.
- Se descartó la participación del gen TXNIP como probable responsable del fenotipo de la HLFC en las familias en estudio.
- Se observó evidencia de asociación para el gen USF1 ubicado en la región 1q21-q23, en la expresión de la HLFC y el rasgo de niveles elevados de triacilglicerolos en las familias mexicanas analizadas.
- La réplica de asociación observada para el gen USF1 y los niveles elevados de triacilglicerolos en la población mexicana, permitió restringir la región a 14 Kb en contraste con las 46 Kb, reportadas originalmente en la población finlandesa.
- No se identificaron variantes de secuencia en la región codificadora del gen USF1.
- Se detectó evidencia sugestiva de ligamiento para las regiones 16q24 y 10p, ligada con niveles elevados de colesterol y triacilglicerolos respectivamente.

- Se descartó la contribución de las regiones 2p, 9p, 11p, 19q y 21q en la expresión de la HLFC en las familias en estudio.
- Estos datos demuestran que existe heterogeneidad genética en la HLFC en las familias de la población mexicana, y la importancia de identificar nuevos loci que participen en la expresión de la enfermedad a través de un escrutinio completo del genoma.

IX. PERSPECTIVAS

1. Existe evidencia de la participación de múltiples genes en la expresión de la HLFC, por lo que el escrutinio completo del genoma en las familias de la población mexicana permitirá eventualmente, identificar nuevos loci, genes o variantes genéticas de susceptibilidad involucradas en la expresión de la HLFC.
2. Evaluar la contribución de los genes o haplotipos de riesgo identificados en el gen USF1 en otro tipo de dislipidemias primarias, como la hipertrigliceridemia, que es la dislipidemia mas frecuente en México.
3. Realizar estudios funcionales para determinar la posible función biológica de los haplotipos de riesgo identificados en el gen USF1, lo que permitirá eventualmente la comprensión de los mecanismos de regulación genética y su impacto en diferentes vías metabólicas.
4. Debido a que la evidencia de asociación en el presente estudio se extendió al gen adyacente F11R, será necesario analizar la secuencia del gen con el propósito de identificar posibles variantes genéticas.
5. Realizar un mapeo fino para las regiones 16q y 10p, con la finalidad de identificar el o los genes responsables de la HLFC o bien variantes alélicas de susceptibilidad.
6. El desarrollo de modelos animales (knock-out o transgénicos) para los genes previamente asociados con la HLFC, serán de gran utilidad para entender los mecanismos moleculares de estos genes en la expresión de la HLFC.

Referencias

Abecasis GR, Ghosh D, Nichols TE. Linkage disequilibrium: ancient history drives the new genetics. *Hum Hered.* 2005;59:118-124.

Aguilar-Salinas, C. A., Hugh, P., Barret, R., Pulsi, J., Zhu, X. L., Schonfeld, G. A familial combined hyperlipidemic kindred with with impaired apolipoprotein B catabolism: kinetics of apolipoprotein B during placebo and pravastatin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17: 72-82.

Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Gomez Perez FJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepulveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res.* 2001;42:1298-1307.

Aguilar-Salinas CA, Velazquez Monroy O, Gomez-Perez FJ, Gonzalez Chavez A, Esqueda AL, Molina Cuevas V, Rull-Rodrigo JA, Tapia Conyer R. Encuesta Nacional de Salud 2000 Group Characteristics of patients with type 2 diabetes in Mexico: Results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes Care.* 2003;26:2021-2026.

Allayee H, Aouizerat BE, Cantor RM, Dallinga-Thie GM, Krauss RM, Lanning CD, Rotter JI, Lusis AJ, de Bruin TW. Families with familial combined hyperlipidemia and families enriched for coronary artery disease share genetic determinants for the atherogenic lipoprotein phenotype. *Am J Hum Genet.* 1998;63:577-585.

Allayee H, Dominguez KM, Aouizerat BE, Krauss RM, Rotter JI, Lu J, Cantor RM, de Bruin TW, Lusis AJ. Contribution of the hepatic lipase gene to the atherogenic lipoprotein phenotype in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2000;41:245-252.

Allayee H, Krass KL, Pajukanta P, Cantor RM, van der Kallen CJ, Mar R, Rotter JI, de Bruin TW, Peltonen L, Lusis AJ. Locus for elevated apolipoprotein B levels on chromosome 1p31 in families with familial combined hyperlipidemia. *Circ Res.* 2002;90:926-931.

Allayee H, Castellani LW, Cantor RM, de Bruin TW, Lusis AJ. Biochemical and genetic association of plasma apolipoprotein A-II levels with familial combined hyperlipidemia. *Circ Res.* 2003;92:1262-1267.

Aouizerat BE, Allayee H, Bodnar J, Krass KL, Peltonen L, de Bruin TW, Rotter JI, Lusis AJ. Novel genes for familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10:113-122.

Aouizerat BE, Allayee H, Cantor RM, Davis RC, Lanning CD, Wen PZ, Dallinga-Thie GM, de Bruin TWA, Rotter JI, Lusis AJ. A genome scan for familial combined hyperlipidemia reveals evidence of linkage with a locus on chromosome 11. *Am J Hum Genet.* 1999;65:397-412b.

Aouizerat, B. E., Allayee, H., Cantor, R. M., Dallinga-Thie, G. M., Lanning, C. D., de Bruin, T. W., Lusis, A. J., Rotter, J. I. Linkage of a candidate gene locus to familial combined hyperlipidemia: lecithin:cholesterol acyltransferase on 16q. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2730-2736c.

Ardern HA, Benson GM, Suckling KE, Caslake MJ, Shepherd J, Packard CJ. Apolipoprotein B overproduction by the perfused liver of the St. Thomas' mixed hyperlipidemic (SMHL) rabbit. *J Lipid Res.* 1999;40:2234-2243.

Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2002;3:299-309.

Austin MA, Brunzell JD, Fitch WL, Krauss RM. Inheritance of low density lipoprotein subclass patterns in familial combined hyperlipidemia. *Arteriosclerosis.* 1990;10:520-530.

Austin MA. Genetic epidemiology of dyslipidaemia and atherosclerosis. *Ann Med.* 1996;28(5):459-463.

Ayyobi AF, Brunzell JD. Lipoprotein distribution in the metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and familial combined hyperlipidemia. *Am J Cardiol.* 2003;92:27J-33J.

Ayyobi, A. F., McGladdery, S. H., McNeely, M. J., Austin, M. A., Motulsky, A. G., Brunzell, J. D. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1289-1294b.

Babirak SP, Brown BG, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:1176-1183.

Baron M. The search for complex disease genes: fault by linkage or fault by association? *Mol Psychiatry.* 2001;6:143-149.

Belmont JW, Leal SM. Complex phenotypes and complex genetics: an introduction to genetic studies of complex traits. *Curr Atheroscler Rep.* 2005;7:180-187.

Bodnar, J. S., Chatterjee, A., Castellani, L. W., Ross, D. A., Ohmen, J., Cavalcoli, J., Wu, C., Dains, K. M., Catanese, J., Chu, M., Sheth, S. S., Charugundla, K., Demant, P., West, D. B., de Jong, P., Lusis, A. J. Positional cloning of the the combined hyperlipidemia gene Hyplip1. *Nature Genet.* 2002;30:110-116.

Boomsma D, Busjahn A, Peltonen L. Classical twin studies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2002;3:872-882.

Borecki IB, Suarez BK. Linkage and association: basic concepts. *Adv Genet.* 2001;42:45-66.

Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:228-237.

Bredie, S. J., Demacker, P. N., Stalenhoef, A. F. Metabolic and genetic aspects of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on low-density lipoprotein heterogeneity. *Eur J Clin Invest.* 1997;27:802-811.

Breslow JL. Genetics of lipoprotein abnormalities associated with coronary artery disease susceptibility. *Annu Rev Genet.* 2000;34:233-254.

Brousseau ME, Santamarina-Fojo S, Zech LA, Berard AM, Vaisman BL, Meyn SM, Powell D, Brewer HB Jr, Hoeg JM. Hyperalphalipoproteinemia in human lecithin cholesterol acyltransferase transgenic rabbits. In vivo apolipoprotein A-I catabolism is delayed in a gene dose-dependent manner. *J Clin Invest.* 1996;97:1844-1851.

Brousseau ME, O'Connor JJ Jr, Ordovas JM, Collins D, Otvos JD, Massov T, McNamara JR, Rubins HB, Robins SJ, Schaefer EJ. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency: Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1148-1154.

Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:223-261.

Brunzell JD, Albers JJ, Chait A, Grundy SM, Groszek E, McDonald GB. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res.* 1983;24:147-155.

Brunzell JD, Sniderman AD, Albers JJ, Kwiterovich PO Jr. Apoproteins B and A-I and coronary artery disease in humans. *Arteriosclerosis.* 1984;4:79-83.

Bu X, Warden CH, Xia YR, De Meester C, Puppione DL, Teruya S, Lokensgard B, Daneshmand S, Brown J, Gray RJ, et al. Linkage analysis of the genetic determinants of high density lipoprotein concentrations and composition: evidence for involvement of the apolipoprotein A-II and cholesteryl ester transfer protein loci. *Hum Genet.* 1994;93:639-648.

Campbell H, Rudan I. Interpretation of genetic association studies in complex disease. *Pharmacogenomics J.* 2002;2:349-360.

Cardon LR, Abecasis GR. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. *Trends Genet.* 2003;19:135-140.

Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2001;2:91-99.

Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature.* 2004;429:446-452.

Casado M, Vallet VS, Kahn A, Vaulont S. Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *J Biol Chem.* 1999;274:2009-2013.

Castellani LW, Navab M, Van Lenten BJ, Hedrick CC, Hama SY, Goto AM, Fogelman AM, Lusis AJ. Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *J Clin Invest.* 1997;100:464-474.

Castellani, L. W., Weinreb, A., Bodnar, J., Goto, A. M., Doolittle, M., Demant, P., Lusis, A. J. Mapping a gene for combined hyperlipidaemia in a mutant mouse strain. *Nature Genet.* 1998;18:374-377.

Castro-Cabezas, M., de Bruin, T. W. A., Erkelens, D. W. Familial combined hyperlipidemia: 1973–1991. *Neth J Med.* 1992;40:83-95.

Cavalli-Sforza LL. The Human Genome Diversity Project: past, present and future. *Nat Rev Genet.* 2005;6:333-340.

Coon H, Myers RH, Borecki IB, Arnett DK, Hunt SC, Province MA, Djousse L, Leppert MF. Replication of linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q with additional heterogeneous effect of apolipoprotein A-I/C-III/A-IV locus: the NHLBI Family Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2275-2280.

Coon H, Xin Y, Hopkins PN, Cawthon RM, Hasstedt SJ, Hunt SC. Upstream stimulatory factor 1 associated with familial combined hyperlipidemia, LDL cholesterol, and triglycerides. *Hum Genet.* 2005; 117:444-451.

Cortner JA, Coates PM, Bennett MJ, Cryer DR, Le NA. Familial combined hyperlipidaemia: use of stable isotopes to demonstrate overproduction of very low-density lipoprotein apolipoprotein B by the liver. *J Inherit Metab Dis.* 1991;14:915-922.

Cullen, P., Farren, B., Scott, J., Farrall, M. Complex segregation analysis provides evidence for a major gene acting on serum triglyceride levels in 55 British families with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1687-1694.

Cullis CA. The use of DNA polymorphisms in genetic mapping. *Genet Eng (N Y).* 2002;24:179-189.

Dallinga-Thie GM, Bu XD, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JJ, Lusis AJ, de Bruin TW. Apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in familial combined hyperlipidemia: effects on LDL-cholesterol and apolipoproteins B and C-III. *J Lipid Res.* 1996;37:136-147.

Dallinga-Thie, G. M., van Linde-Sibenius, T. M., Rotter, J. I., Cantor, R. M., Bu, X. D., Lusis, A. J., de Bruin, T. W. A. Complex genetic contribution of the apoA1-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. *J Clin Invest.* 1997;99:953-961.

Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1994;94:437-444.

De Bruin TW, Mailly F, van Barlingen HH, Fisher R, Castro Cabezas M, Talmud P, Dallinga-Thie GM, Humphries SE. Lipoprotein lipase gene mutations D9N and N291S in four pedigrees with familial combined hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest.* 1996;26:631-9.

Deeb, S. S., Nevin, D. N., Iwasaki, L., Brunzell, J. D. Two novel apolipoprotein A-IV variants in individuals with familial combined hyperlipidemia and diminished levels of lipoprotein lipase activity. *Hum Mutat.* 1996;8:319-325.

De Graaf J, Stalenhoef AF. Defects of lipoprotein metabolism in familial combined hyperlipidaemia. *Curr Opin Lipidol.* 1998;9:189-196.

De Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AF. Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. *J R Soc Med.* 2002;95 Suppl 42:46-53.

Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, Defesche JC, Kastelein JJ. Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol.* 2001;80:161-172.

Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997;39(4):287-324.

Eckel, R. H. Familial combined hyperlipidemia and insulin resistance: distant relatives linked by intra-abdominal fat? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:469-470.

Eichenbaum-Voline S, Olivier M, Jones EL, Naoumova RP, Jones B, Gau B, Patel HN, Seed M, Betteridge DJ, Galton DJ, Rubin EM, Scott J, Shoulders CC, Pennacchio LA. Linkage and association between distinct variants of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:167-174.

Elbein SC, Hoffman MD, Teng K, Leppert MF, Hasstedt SJ. A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes*. 1999;48:1175-1182.

Eurlings PM, van der Kallen CJ, Geurts JM, van Greevenbroek MM, de Bruin TW. Genetic dissection of familial combined hyperlipidemia. *Mol Genet Metab*. 2001;74:98-104.

Freimer N, Sabatti C. The use of pedigree, sib-pair and association studies of common diseases for genetic mapping and epidemiology. *Nat Genet*. 2004; 36:1045-1051.

Friedewald WT, Levy IR, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without the use of the ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:449-502.

Gagne E, Genest J Jr, Zhang H, Clarke LA, Hayden MR. Analysis of DNA changes in the LPL gene in patients with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1250-1257.

Gehrisch S, Kostka H, Tiebel M, Patzak A, Paetzold A, Julius U, Schroeder HE, Hanefeld M, Jaross W. Mutations of the human hepatic lipase gene in patients with combined hypertriglyceridemia/hyperalphalipoproteinemia and in patients with familial combined hyperlipidemia. *J Mol Med*. 1999;77:728-734.

Genest J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J Inherit Metab Dis*. 2003;26:267-287.

Geurts JM, Janssen RG, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Cantor RM, Bu X, Aouizerat BE, Allayee H, Rotter JI, de Bruin TW. Identification of TNFRSF1B as a novel modifier gene in familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet*. 2000;9:2067-2074.

Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. 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*. 1973;52:1544-1568.

Gordon D, Finch SJ. Factors affecting statistical power in the detection of genetic association. *J Clin Invest*. 2005;115:1408-1418.

Göring HH, Terwilliger JD. Gene mapping in the 20th and 21st centuries: statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum Biol*. 2000;72:63-132.

Göring HH, Terwilliger JD. Linkage analysis in the presence of errors III: marker loci and their map as nuisance parameters. *Am J Hum Genet*. 2000;66:1298-1309b.

Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis*. 1994;106:241-253.

Grundy, S. M., Chait, J., Brunzell, J. D. Familial combined hyperlipidemia workshop. *Arteriosclerosis*. 1987;7:203-207.

Hanson RL, Ehm MG, Pettitt DJ, Prochazka M, Thompson DB, Timberlake D, Foroud T, Kobes S, Baier L, Burns DK, Almasy L, Blangero J, Garvey WT, Bennett PH, Knowler WC. An autosomal genomic scan for loci linked to type II diabetes mellitus and body-mass index in Pima Indians. *Am J Hum Genet*. 1998;63:1130-1138.

Hegele RA. Monogenic dyslipidemias: window on determinants of plasma lipoprotein metabolism. *Am J Hum Genet*. 2001;69:1161-1177.

Hoffer, M. J., Bredie, S. J., Boomsma, D. I., Reymers, P. W., Kastgelein, J. J., de Knijff, P., Demacker, P. N., Stalenhoef, A. F., Havekes, L. M., Frants, R. R. The lipoprotein lipase (Asn291Ser) mutation is associated with elevated lipid levels in families with familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 1996;119:159-167.

Hoffer MJ, Bredie SJ, Snieder H, Reymers PW, Demacker PN, Havekes LM, Boomsma DI, Stalenhoef AF, Frants RR, Kastelein JJ. Gender-related association between the -93T-->G/D9N haplotype of the lipoprotein lipase gene and elevated lipid levels in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 1998;138:91-99.

Hoffstedt J, Ryden M, Wahrenberg H, van Harmelen V, Arner P. Upstream Transcription Factor-1 gene polymorphisms is associated with increased Adipocyte lipolysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:5356-5360.

Hokanson JE, Krauss RM, Albers JJ, Austin MA, Brunzell JD. LDL Physical and Chemical Properties in Familial Combined Hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:452-459.

Holmans P. Affected sib-pair methods for detecting linkage to dichotomous traits: review of the methodology. *Hum Biol*. 1998;70:1025-1040.

Hsueh WC, St Jean PL, Mitchell BD, Pollin TI, Knowler WC, Ehm MG, Bell CJ, Sakul H, Wagner MJ, Burns DK, Shuldiner AR. Genome-wide and fine-mapping linkage studies of type 2 diabetes and glucose traits in the Old Order Amish: evidence for a new diabetes locus on chromosome 14q11 and confirmation of a locus on chromosome 1q21-q24. *Diabetes*. 2003;52:550-557.

Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases *Nat Rev Genet*. 2005;6:287-298.

Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:1591-1601.

Jarvik GP, Brunzell JD, Austin MA, Krauss RM, Motulsky AG, Wijsman E. Genetic predictors of FCHL in four large pedigrees. Influence of ApoB level major locus predicted genotype and LDL subclass phenotype. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1687-1894.

Kane, JP., Havel, R. J. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. 2001. In: R. SC, Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D (eds. *The Metabolism and molecular Bases of Inherited Disease*, New York, NY: McGraw Hill), p.p. 2717–2752.

Klatt P, Esterbauer H. Oxidative hypothesis of atherogenesis. *J Cardiovasc Risk*. 1996;3:346-351.

Kong, A., Cox, N. J. Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet*. 1997;61:1179-1188.

Koskenvuo M, Kaprio J, Romanov K. Twin studies in metabolic diseases. *Ann Med*. 1992;24:379-381.

Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Related Articles, Links Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet*. 1996;58:1347-1363.

Kwiterovich P Jr. The genetics of coronary artery disease. *J Insur Med*. 1993;Suppl B:210-215.

Kwiterovich PO Jr. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol*. 2000;86:5L-10L.

Kwiterovich PO Jr. Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity *Am J Cardiol*. 2002;90:30i-47i.

Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol*. 2000;19:S36-S42.

Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*. 1994;265:2037-2048.

Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*. 1995;11:241-247.

Langefeld CD, Wagenknecht LE, Rotter JI, Williams AH, Hokanson JE, Saad MF, Bowden DW, Haffner S, Norris JM, Rich SS, Mitchell BD; Insulin Resistance Atherosclerosis Study Family Study. Linkage of the metabolic syndrome to 1q23-q31 in Hispanic families: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study Family Study. *Diabetes*. 2004;53:1170-1174.

Lange K, Cantor R, Horvath S, Perola M, Sabatti C, Sinsheimer J, Sobel E. Mendel version 4.0: A complete package for the exact genetic analysis of discrete traits in pedigree and population data sets. *Amer J Hum Genetics*. 2001;69(supplement):A1886.

La Ville A, Turner PR, Pittilo RM, Martini S, Marenah CB, Rowles PM, Morris G, Thomson GA, Woolf N, Lewis B. Hereditary hyperlipidemia in the rabbit due to overproduction of lipoproteins. I. Biochemical studies. *Arteriosclerosis*. 1987;7:105-112.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420-26:868-874.

Lilja HE, Suviolahti E, Soro-Paavonen A, Hiekkalinna T, Day A, Lange K, Sobel E, Taskinen MR, Peltonen L, Perola M, Pajukanta P. Locus for quantitative HDL-cholesterol on chromosome 10q in Finnish families with dyslipidemia. *J Lipid Res*. 2004;45:1876-1884.

Lin JH, Zhu Y, Liao HL, Kobari Y, Groszek L, Stemerman MB. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 by low-density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 1996;127:185-194.

Liu T, Johnson JA, Casella G, Wu R. Sequencing complex diseases With HapMap. *Genetics*. 2004;168:503-311.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.

Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:189-218.

Mahaney MC, Almasy L, Rainwater DL, VandeBerg JL, Cole SA, Hixson JE, Blangero J, MacCluer JW. A quantitative trait locus on chromosome 16q influences variation in plasma HDL-C levels in Mexican Americans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:339-345.

Mailly, F., Tugrul, Y., Reyme, P. W., Bruin, T., Seed, M., Groenemeyer, B. F., Asplund-Carlson, A., Vallance, D., Winder, A. F., Miller, G. J. A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9Asn): functional implications and prevalence in normal and hyperlipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:468-478.

Mar R, Pajukanta P, Allayee H, Groenendijk M, Dallinga-Thie G, Krauss RM, Sinsheimer JS, Cantor RM, de Bruin TW, Lusis AJ. Association of the Apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hyperlipidemia. *Circ Res*. 2004;94:993-999.

Marcil M, Boucher B, Gagne E, Davignon J, Hayden M, Genest J Jr. Lack of association of the apolipoprotein A-I-C-III-A-IV gene XmnI and SstI polymorphisms and of the lipoprotein lipase gene mutations in familial combined hyperlipoproteinemia in French Canadian subjects. *J Lipid Res*. 1996;37:309-319.

Masucci-Magoulas L, Goldberg IJ, Bisgaier CL, Serajuddin H, Francone OL, Breslow JL, Tall AR. A mouse model with features of familial combined hyperlipidemia. *Science*. 1997;275:391-394.

Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest.* 2005;115:1404-1407.

Morton NE. Linkage disequilibrium maps and association mapping. *J Clin Invest.* 2005;115:1425-1430.

Mosteller M. A genetic analysis of cardiovascular disease risk factor clustering in adult female twins. *Genet Epidemiol.* 1993;10:569-574.

Naoumova RP, Bonney SA, Eichenbaum-Voline S, Patel HN, Jones B, Jones EL, Amey J, Colilla S, Neuwirth CK, Allotey R, Seed M, Betteridge DJ, Galton DJ, Cox NJ, Bell GI, Scott J, Shoulders CC. Confirmed locus on chromosome 11p and candidate loci on 6q and 8p for the triglyceride and cholesterol traits of combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2070-2077.

Nevin DN, Brunzell JD, Deeb SS. The LPL gene in individuals with familial combined hyperlipidemia and decreased LPL activity. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:869-873.

Neale BM, Sham PC. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet.* 2004;75:353-362.

Newton-Cheh C, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res.* 2005 ;573:54-69.

Nikkila, E. A., Aro, A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet.* 1973;1:9544-9549.

O'Connell JR, Weeks DE. PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet.* 1998;63:259-266.

Ordovas JM, Shen AH. Genetics, the environment, and lipid abnormalities. *Curr Cardiol Rep.* 2002;4:508-513.

Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schroder A, Weber C. JAM-1 is a ligand of the α 2 integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol.* 2002;3:151-158.

Ott J. Analysis of human genetics linkage. Rev ed. Baltimore, Md/London, UK: The Johns Hopkins University Press; 1991.

Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, Porkka KV, Ylitalo K, Pihlajamäki J, Suomalainen AJ, Savolainen AC, Lehtimäki T, Viikari JS, Laakso M, Taskiran MR, Fehrmann C, Peltonen L. Linkage

of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet.* 1998;18:369-373.

Pajukanta P, Terwilliger JD, Perola M, Hiekkalinna T, Nuotio I, Ellonen P, Parkkonen M, Hartiala J, Ylitalo K, Pihlajamäki J, Porkka K, Laakso M, Viikari J, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L. Genomewide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet.* 1999;64:1453-1463.

Pajukanta P, Bodnar JS, Sallinen R, Chu M, Airaksinen T, Xiao Q, Castellani LW, Sheth SS, Wessman M, Palotie A, Sinsheimer JS, Demant P, Lusis AJ, Peltonen L. Fine mapping of Hyplip1 and the human homolog, a potential locus for FCHL. *Mamm Genome.* 2001;12:238-245.

Pajukanta P, Allayee H, Krass KL, Kuraishy A, Soro A, Lilja HE, Mar R, Taskinen MR, Nuotio I, Laakso M, Rotter JI, de Bruin TW, Cantor RM, Lusis AJ, Peltonen L. Combined analysis of genome scans of dutch and finnish families reveals a susceptibility locus for highdensity lipoprotein cholesterol on chromosome 16q. *Am J Hum Genet.* 2003;72:903-917.

Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusis AJ, Gentile M, Duan XJ, Soro-Paavonen A, Naukkarinen J, Saarela J, Laakso M, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet.* 2004;36:371-376.

Pei W, Baron H, Muller-Myhsok B, Knoblauch H, Al-Yahyaee SA, Hui R, Wu X, Liu L, Busjahn A, Luft FC, Schuster H. Support for linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families. *Clin Genet.* 2000;57:29-34.

Peltonen L, McKusick VA. Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science.* 2001;291:1224-1229.

Pihlajamäki J, Miettinen R, Valve R, Karjalainen L, Mykkanen L, Kuusisto J, Deeb S, Auwerx J, Laakso M. The Pro12A1a substitution in the peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 is associated with an insulin-sensitive phenotype in families with familial combined hyperlipidemia and in nondiabetic elderly subjects with dyslipidemia. *Atherosclerosis.* 2000;151:567-574.

Porkka KV, Nuotio I, Pajukanta P, Ehnholm C, Suurinkeroinen L, Syvanne M, Lehtimäki T, Lahdenkari AT, Lahdenpera S, Ylitalo K, Antikainen M, Perola M, Raitakari OT, Kovanen P, Viikari JS, Peltonen L, Taskinen MR. Phenotype expression in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 1997;133:245-253.

Purnell, J. Q., Kahn, S. E., Schwartz, R. S., Brunzell, J. D. Relationship of insulin sensitivity and ApoB levels to intra-abdominal fat in subjects with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:567-572.

Putt W, Palmen J, Nicaud V, Tregouet DA, Tahri-Daizadeh N, Flavell DM, Humphries SE, Talmud PJ. FARSII group. Variation in USF1 shows haplotype effects. *gene: gene and gene:*

environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II. *Hum Mol Genet.* 2004;13:1587-1597.

Reymer, P. W., Groenemeyer, B. E., Gagne, E., Miao, L., Appelman, E. E., Seidel, J. C., Kromhout, D., Bijvoet, S. M., van de Oever, K., de Bruin, T. W. A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291Ser) contributes to the expression of familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet.* 1995;4:1543-1549.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-809.

Rose HG, Kranz P, Weinstock M, Juliano J, Haft JI. Inheritance of combined hyperlipoproteinemia: evidence for a new lipoprotein phenotype. *Am J Med.* 1973;54(2):148-160.

Santamarina-Fojo S, Gonzalez-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1750-1754.

Scheuner MT. Genetic predisposition to coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol.* 2001;16:251-260.

Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:308-311.

Shoulders CC, Jones EL, Naoumova RP. Genetics of familial combined hyperlipidemia and risk of coronary heart disease. *Hum Mol Genet.* 2004;13: Spec No 1:R149-60.

Sinsheimer JS, Blangero J, Lange K. Gamete competition models. *Am J Hum Genet.* 2000;66:1168-1172.

Sniderman A, Brown G, Stewart F and Cianflone K. From familial combined hyperlipidemia to hyperapoB: unravelling of overproduction of hepatic apolipoprotein B. *Curr Opin Lipidol* 1992;3:137-142.

Soro A, Jauhiainen M, Ehnholm C, Taskinen. Determinants of low HDL levels in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2003;44:1536-1544.

Soro A, Pajukanta P, Lilja HE, Ylitalo K, Hiekkalinna T, Perola M, Cantor RM, Viikari JS, Taskinen MR, Peltonen L. Genome scans provide evidence for low-HDL-C loci on chromosomes 8q23, 16q24.1-24.2, and 20q13.11 in Finnish families. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1333-1340.

Stern MP, Knapp JA, Hazuda HP, Haffner SM, Patterson JK, Mitchell BD. Genetic and environmental determinants of type II diabetes in Mexican Americans. Is there a "descending limb" to the modernization/diabetes relationship? *Diabetes Care.* 1991;14:649-654.

Strachan T, Read A. Human Molecular Genetics 3. Mapping and identifying genes conferring susceptibility to complex diseases, ed 3. Garland Science. 2004, pp 436-447.

Strauch, K., Fimmers, R., Kurz, T., Deichmann, K. A., Wienker, TF., Baur, M. P. Parametric and Nonparametric Multipoint Linkage Analysis with Imprinting and Two-Locus-Trait Models: Application to Mite Sensitization. *Am J Hum Genet.* 2000;66:1945-1957.

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2000;101:948-954.

Tahvanainen E, Pajukanta P, Porkka K, Nieminen S, Ikavalko L, Nuotio I, Taskinen MR, Peltonen L, Ehnholm C. Haplotypes of the ApoA-I/C-III/A-IV gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1810-1817.

Tato F, Vega GL, Tall AR, Grundy SM. Relation between cholesterol ester transfer protein activities and lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:112-120.

Terwilliger JD, Ott J. A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. *Hum Hered.* 1992;42:337-346.

The Internacional HapMap Consortium. The Internacional HapMap Project. *Nature.* 2003;426:789-796.

Valles V, Aguilar-Salinas CA, Gomez-Perez FJ, Rojas R, Franco A, Olaiz G, Rull JA, Sepulveda J. Apolipoprotein B and A-I distribution in Mexican urban adults: results of a nationwide survey. *Metabolism.* 2002;51:560-568.

Vallet VS, Casado M, Henrion AA, Bucchini D, Raymondjean M, Kahn A, Vaulont S. Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J Biol Chem.* 1998;273:20175-20179.

Vakkilainen J, Pajukanta P, Cantor RM, Nuotio IO, Lahdenpera S, Ylitalo K, Pihlajamaki J, Kovanen PT, Laakso M, Viikari JS, Peltonen L, Taskinen MR. Genetic influences contributing to LDL particle size in familial combined hyperlipidaemia. *Eur J Hum Genet.* 2002;10:547-552.

Van der Kallen CJ, Voors-Pette C, de Bruin TW. Abdominal obesity and expression of familial combined hyperlipidemia. *Obes Res.* 2004;12:2054-2061.

Vander-Vleuten GM, Hijmans A, Kluijtmans LA, Blom HJ, Stalenhoef AF, de Graaf J. Thioredoxin interacting protein in Dutch families with familial combined hyperlipidemia. *Am J Med Genet A.* 2004;130:73-75b.

Veerkamp MJ, de Graaf J, Hendriks JC, Demacker PN, Stalenhoef AF. Nomogram to diagnose familial combined hyperlipidemia on the basis of results of a 5-year follow-up study. *Circulation*. 2004;109:2980-2985.

Venkatesan S, Cullen P, Pacy P, Halliday D, Scott J. Stable isotopes show a direct relation between VLDL apoB overproduction and serum triglyceride levels and indicate a metabolically and biochemically coherent basis for familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1110-1118.

Vink JM, Boomsma DI. Gene finding strategies. *Biol Psychol*. 2002;61(1-2):53-71.

Warden CH, Daluiski A, Bu X, Purcell-Huynh DA, De Meester C, Shieh BH, Puppione DL, Gray RM, Reaven GM, Chen YD. Evidence for linkage of the apolipoprotein A-II locus to plasma apolipoprotein A-II and free fatty acid levels in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10886-10890.

Wijsman, E. M., Brunzell, J. D., Jarvik, G. P., Austin, M. A., Motulsky, A. G., Deeb, S. S. Evidence against linkage of familial combined hyperlipidemia to the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:215-226.

Wiltshire S, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Levy JC, Sampson M, O'Rahilly S, Frayling TM, Bell JI, Lathrop GM, Bennett A, Dhillon R, Fletcher C, Groves CJ, Jones E, Prestwich P, Simecek N, Rao PV, Wishart M, Bottazzo GF, Foxon R, Howell S, Smedley D, Cardon LR, Menzel S, McCarthy MI. A genomewide scan for loci predisposing to type 2 diabetes in a U.K. population (the Diabetes UK Warren 2 Repository): analysis of 573 pedigrees provides independent replication of a susceptibility locus on chromosome 1q. *Am J Hum Genet*. 2001;69:553-569.

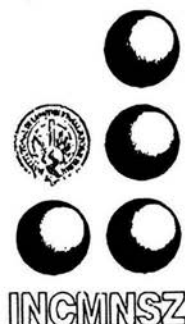
Wojciechowski AP, Farrall M, Cullen P, Wilson TM, Bayliss JD, Farren B, Griffin BA, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Familial combined hyperlipidaemia linked to the apolipoprotein AI-CII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature*. 1991;349:161-164.

Xu CF, Talmud P, Schuster H, Houlston R, Miller G, Humphries S. Association between genetic variation at the APO AI-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidaemia. *Clin Genet*. 1994;46:385-397.

Yang, W. S., Nevin, D. N., Peng, R., Brunzell, J. D., Deeb, S. S. A mutation in the promoter of the lipoprotein lipase (LPL) gene in a patient with familial combined hyperlipidemia and low LPL activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92: 4462-4466.

ANEXO I

Carta de consentimiento informado



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D. F. a 10 de septiembre del 2003

Dr. Carlos Aguilar Salinas
Depto. de Endocrinología y Metabolismo
Presente

Estimado Dr. Aguilar:

Le informo que con relación al protocolo titulado "*Caracterización clínica, bioquímica y genética de la hiperlipidemia familiar combinada*" REF. 771

El Comité autoriza la extensión a la aprobación del protocolo de referencia, se nos informó sobre la publicación en extenso y varios resúmenes en congresos que se han hecho, sobre este estudio. Y se han incluido 100 personas con esta forma de hiperlipidemia primaria. En la actualidad se trata de identificar una región en cromosoma 1 asociada a la enfermedad.

Además quedamos enterados de que se obtuvo apoyo de la Universidad de California para continuar con los estudios genéticos. Le menciono también que recibimos el artículo publicado.

Sin otro particular de momento le envió un cordial saludo.

Atentamente,


Dr. Antonio R. Cabral Castañeda
Coordinador

Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos



Investigación

c.c.p. Dr. Rubén Lisker Y. Dirección de Investigación
C.P. Martha Arredondo Urzúa. Jefe del Depto. C.F.E.I.

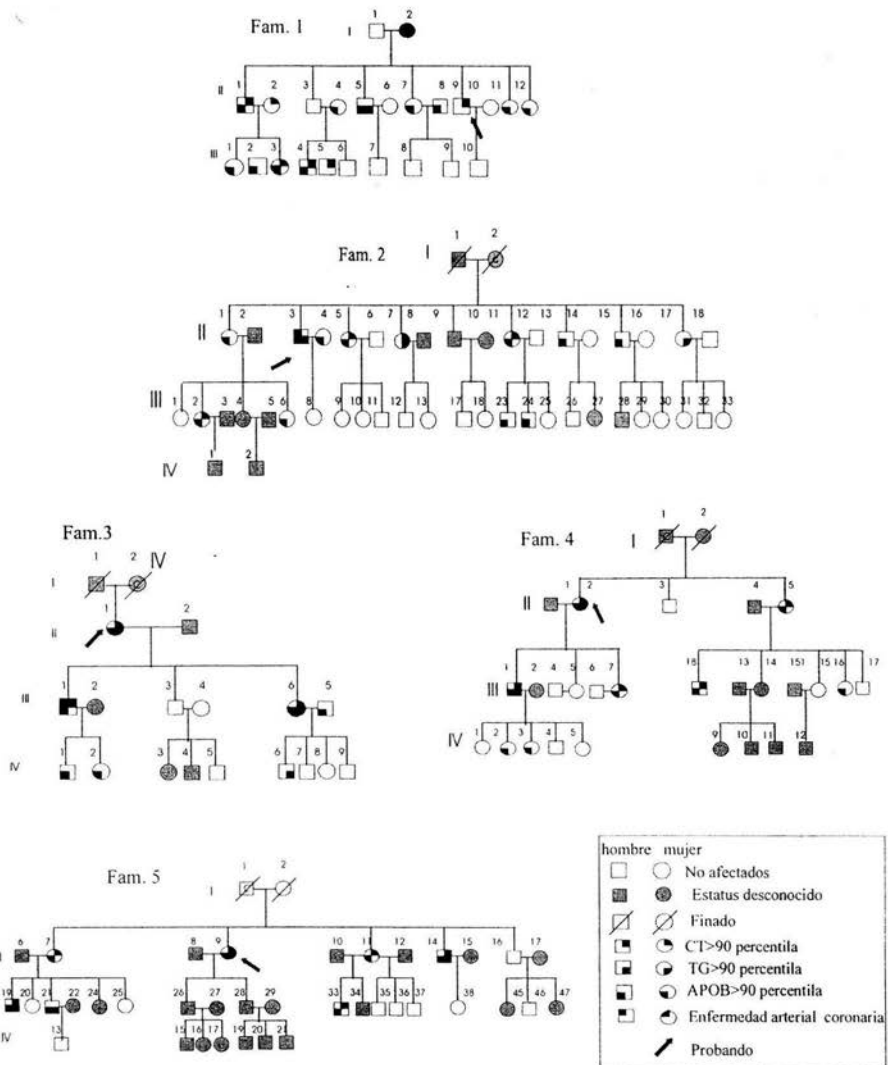
Tradición ACC/mrg
Servicio

Asistencia Dorencia

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C.P. 14000 México, D.F.
- Tels. 55-73-12-00

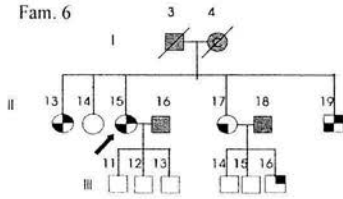
ANEXO II

Árboles genealógicos de las 24 familias incluidas en este estudio

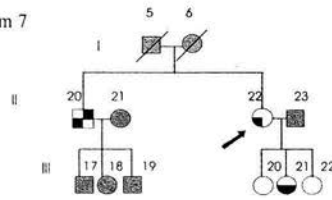


Anexo II. Árboles genealógicos de las 24 familias incluidas en este estudio.

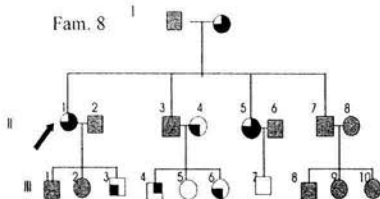
Fam. 6



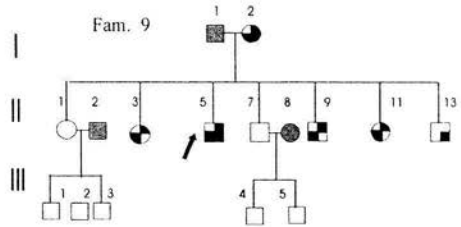
Fam. 7



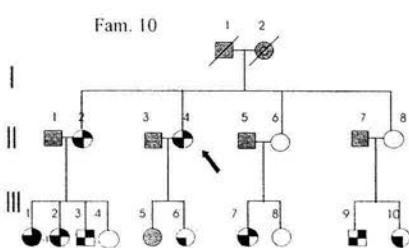
Fam. 8



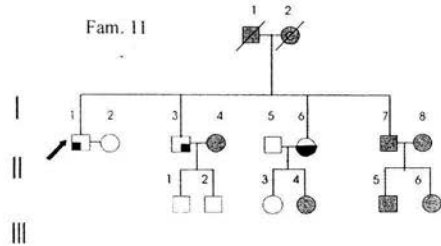
Fam. 9



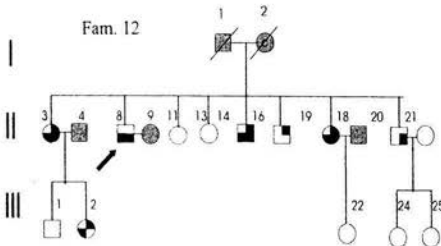
Fam. 10



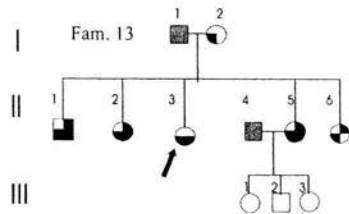
Fam. 11



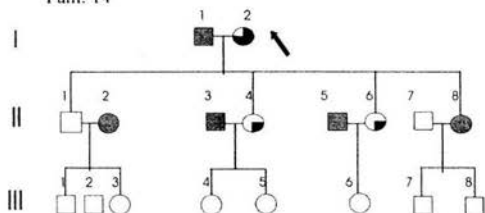
Fam. 12



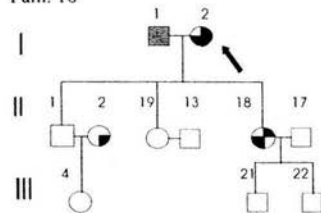
Fam. 13



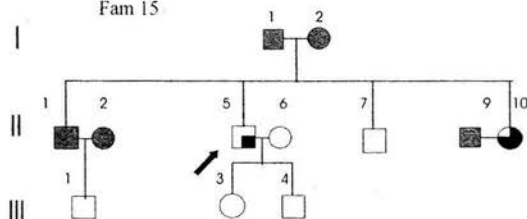
Fam. 14



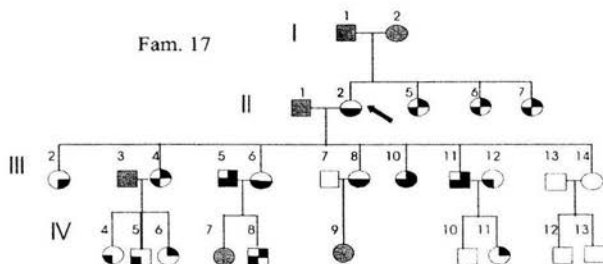
Fam. 16



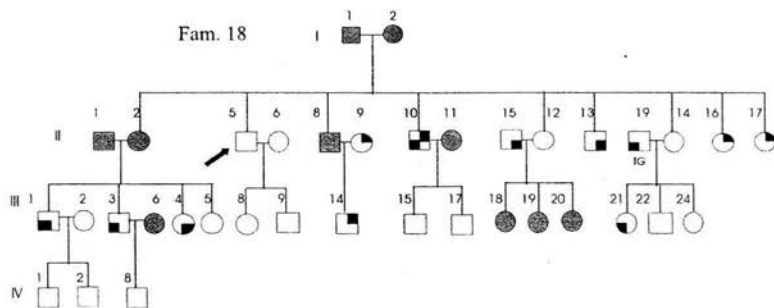
Fam 15



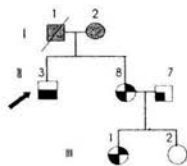
Fam. 17



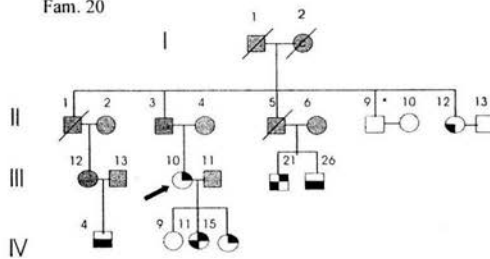
Fam. 18



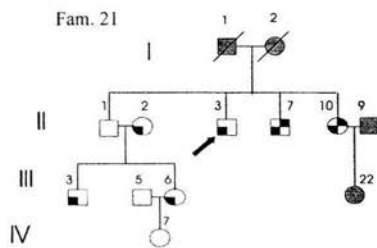
Fam. 19



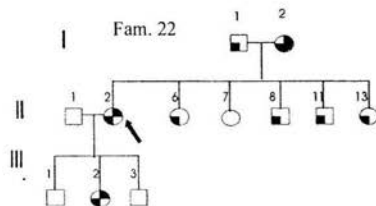
Fam. 20



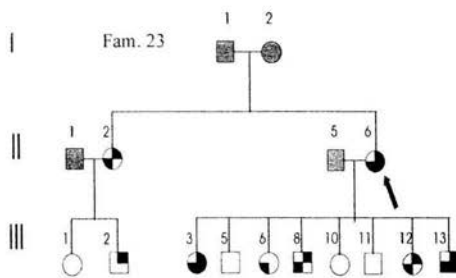
Fam. 21



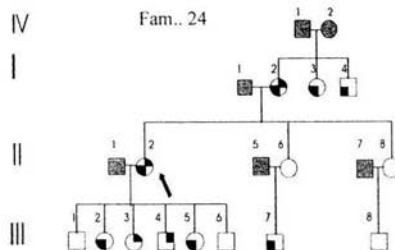
Fam. 22



Fam. 23



Fam. 24



ANEXO III

Resultados de ligamiento para las diferentes regiones cromosómicas analizadas

ANEXO III. Resultados de ligamiento paramétrico de dos puntos y no paramétrico en pares de hermanos (ASP por sus siglas en inglés analysis sib-pair) para el estudio de las diferentes regiones cromosómicas analizadas.

Marcadores	Posicion (cM)	HLFC LOD	ASP	TG LOD	ASP	CT LOD	ASP	C-HDL LOD	ASP
Chr 2									
D2S2952	17.88	0.02(0.2)	0.32	0.20(0.2)	0.03	0.03(0.2)	0.33	0.39(0.1)	0.08
D2S423	22.10	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.85	0.50(0.0)	0.02
D2S1400	27.60	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.90(0.0)	0.37
Chr 9									
D9S2169	14.23	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.40(0.2)	0.10	0.0(0.5)	0.29
D9S2156	18.06	0.65(0.0)	0.03	0.20(0.2)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0
D9S921	21.88	0.27(0.1)	0.29	0.0(0.5)	0.0	0.50(0.2)	0.53	0.0(0.5)	0.0
Chr 10									
D10S586	48.33	0.01(0.3)	0.27	0.0(0.5)	0.35	0.23(0.3)	0.78	0.84(0.0)	0.0
D10S1233	66.50	0.0(0.5)	0.24	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.02	0.0(0.5)	0.0
D10S604	66.50	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.47(0.0)	0.04
D10S1772	68.63	0.38(0.0)	1.56	0.87(0.0)	1.84	0.0(0.5)	0.02	0.0(0.5)	0.02
D10S1220	70.23	0.54(0.0)	0.15	0.50(0.1)	0.30	1.34(0.0)	0.83	0.0(0.5)	0.0
D10S1724	70.23	0.06(0.0)	0.02	0.0(0.5)	0.0	0.09(0.2)	0.57	0.0(0.5)	0.0
D10S546	75.57	0.48(0.0)	0.09	0.36(0.0)	1.36	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0
D10S1790	75.57	0.06(0.2)	0.01	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0
Chr 11									
D11S1324	35.21	0.0(0.5)	0.0	0.10(0.2)	0.0	0.10(0.3)	0.0	0.10(0.1)	0.90
D11S1392	43.16	0.0(0.5)	0.0	0.10(0.3)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0
D11S1985	58.40	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.20(0.3)	0.0
Chr 16									
D16S507	105.17	0.34(0.1)	0.42	0.5(0.1)	0.19	0.10(0.3)	1.11	1.0(0.0)	0.79
D16S505	108.96	0.23(0.1)	0.31	0.53(0.2)	0.06	0.64(0.1)	2.67	0.18(0.2)	0.0
D16S3091	111.12	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.11	0.24(0.3)	0.01	0.0(0.3)	0.0

Chr 19									
D19S589	87.66	0.20(0.2)	0.0	0.10(0.2)	0.41	0.89(0.1)	0.69	0.0(0.5)	0.0
D19S927	89.73	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.44	0.0(0.5)	0.40	0.10(0.2)	0.0
Chr 21									
D21S1905	11.30	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.27(0.1)	0.0
D21S1437	13.05	0.0(0.5)	0.0	0.0(0.5)	0.0	0.23	0.0	0.0(0.5)	0.0

La posición de los marcadores se determinó en base a Marshfield Center for Medical Genetics Database; ASP, indica pares de afectados, El valor de LOD score máx. se determinó utilizando un modo de herencia dominante. La fracción de recombinación esta dada entre paréntesis

ANEXO IV. Artículos publicados



Artículo original

Hiperlipidemia familiar combinada: caracterización en población mexicana

Carlos A. Aguilar Salinas,* Adriana Huertas,* Ma. Teresa Tusié,* Francisco J. Gómez Pérez,* Juan A. Rull*

* Departamento de Endocrinología y Metabolismo, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. "Salvador Zubirán"

Correspondencia:

Carlos Alberto Aguilar Salinas
Vasco de Quiroga 15, México D.F. 14000, México.
Tel: 55133891 FAX: 5-5130002
E-mail: caguilaralinas@yahoo.com

Fecha de recepción: 01-Junio-2002
Fecha de aceptación: 27-Junio-2002

Resumen

La hiperlipidemia familiar combinada (HLFC) es una de las dislipidemias primarias más frecuente en México. Se manifiesta por hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o la combinación de estos defectos. Pese a su frecuencia, pocas veces es diagnosticada con certidumbre. Se requiere del estudio de al menos tres familiares directos para corroborar el diagnóstico. Su identificación permite la búsqueda intencionada de otros miembros en la familia y la categorización adecuada del riesgo cardiovascular de los casos afectados. En esta revisión se describen los avances ocurridos en los últimos años sobre la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de la hiperlipidemia familiar combinada. Estudios prospectivos recientes han confirmado la aterogenicidad de la enfermedad. A pesar de dos escrutinios completos del genoma no ha sido posible identificar los genes involucrados en la enfermedad. Problemas en el diagnóstico y la heterogeneidad de la enfermedad son algunas de las explicaciones de estos resultados. Pese a lo anterior la hiperlipidemia familiar combinada es un modelo de dislipidemia en el que la investigación clínica y bioquímica puede dar mayores beneficios. La hiperlipidemia familiar combinada debe ser considerada como uno de los problemas principales para el médico que trata pacientes dislipidémicos.

Palabras clave: Hiperlipidemia familiar combinada, apolipoproteína B, colesterol, triglicéridos, colesterol HDL.

Revista de Endocrinología y Nutrición 2002;10(2)Abril-Junio:58-62.

Abstract

Familial combined hyperlipidemia is among the most frequent causes of primary dyslipidemia in Mexico. Its manifestations include hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia or the combination of both abnormalities. In spite of its high frequency, the proper diagnosis is rarely done. For this purpose, the measurement of a lipid profile is required in at least three first-degree relatives. The presence of familial combined hyperlipidemia in a family leads to the identification of other abnormal cases among them and the categorization as a high risk case for cardiovascular disease for the affected members. A critical review of the current literature in this field is presented in this paper. Prospective studies have confirmed the atherogenicity of the disease. Although two screenings of the whole genome has been completed, the responsible genes for this disorder have not been identified. Limitations for the characterization of the subjects as affected and the heterogeneity of the disease are among the possible explanations for these results. However, due to its high frequency, familial combined hyperlipidemia is a model of dyslipidemia that must be considered as a priority. It represents one of the greatest problems for the physicians involved in the treatment of dyslipidemic patients.

Key words: Familial combined hyperlipidemia, apolipoprotein B, cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol.

Revista de Endocrinología y Nutrición 2002;10(2)Abril-Junio:58-62.

INTRODUCCIÓN

La hiperlipidemia familiar combinada (HLFC) es la forma más común de las dislipidemias de origen genético.¹⁻³ Del 30 al 50% de los casos familiares y el 20% de todos los

casos de cardiopatía isquémica prematura se atribuyen a la HLFC. Debido a los criterios diagnósticos vigentes (descritos en los párrafos siguientes), no se conoce con certeza su prevalencia en población mexicana. Sin embargo, sus manifestaciones más frecuentes (hiperli-

pidemia mixta e hipertrigliceridemia) se presentan en un alto porcentaje de los adultos que viven en zonas urbanas (12.6% y 24.3% respectivamente).⁴ Es la hiperlipidemia más frecuente en la Clínica de Dislipidemias del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. Su aterogenicidad ha sido demostrada por dos estudios prospectivos recientes.^{5,6}

Su descripción fue realizada a principios de los 80 por Goldstein y Brown después de revisar más de 50 familias con historia de cardiopatía isquémica prematura. Observaron que múltiples miembros de las familias tenían elevaciones moderadas de colesterol y/o triglicéridos y que el patrón de herencia era similar a autosómico dominante.⁷ En 1987 se definieron los criterios para su diagnóstico, sin embargo, éstos son aún motivo de controversia.⁸ Se requiere la presencia de al menos un familiar con concentraciones altas de colesterol, otro con niveles anormales de triglicéridos y otro con ambos defectos. Por ello, para establecer el diagnóstico con certidumbre se requiere el estudio de cuantos miembros de la familia sean posibles. Otras características de la enfermedad son: concentraciones altas de la apoproteína B, la elevación de colesterol-LDL y/o triglicéridos es moderada (pocas veces arriba de 300 mg/dL), el predominio de las subclases pequeñas y densas entre las lipoproteínas de baja densidad (LDL), la ausencia de xantomas, y la historia familiar de cardiopatía isquémica. Frecuentemente se observan fluctuaciones espontáneas en las concentraciones de colesterol y triglicéridos. Por ello, se puede encontrar alternancia entre hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, una dislipidemia mixta o incluso normalización de la concentración de los lípidos séricos en el mismo individuo sin que exista ningún cambio en sus condiciones clínicas. En más de la mitad de los casos es posible demostrar la existencia de resistencia a la insulina y su frecuencia es mayor en pacientes diabéticos. Finalmente, su tratamiento generalmente requiere del empleo de uno o más fármacos hipolipemiantes. La respuesta observada frecuentemente es menor a la descrita en otras formas de dislipidemia.

La etiología de la enfermedad se desconoce. En la mayoría de los casos se ha demostrado un aumento de producción hepática de la apoproteína B (y en consecuencia de las lipoproteínas de muy baja densidad conocidos también como VLDL's).⁹ Un posible mecanismo para explicar este fenómeno es un aumento de la concentración de ácidos grasos libres en plasma, los cuales aumentan la expresión del gen de la apoproteína B y estimulan la secreción de las VLDL.¹⁰ El aumento de la secreción de lipoproteínas incrementa el número de lipoproteínas circulantes, alteración que se agrava por la coexistencia de defectos en el catabolismo de las lipoproteínas. En la mayoría de los casos, la actividad de la enzima que degrada las lipoproteínas ricas en

triglicéridos (llamada lipasa lipoproteica) se encuentra disminuida. Su menor actividad puede ser debida al aumento de la concentración de ácidos grasos libres o de la apoproteína CIII. Como resultado de la menor actividad de la lipasa lipoproteica, la eliminación de las VLDL's disminuye permitiendo que un mayor número de partículas se conviertan en LDL's. El enriquecimiento en triglicéridos de las partículas resultantes favorece la aparición de las LDL's pequeñas y densas. Estas alteraciones explican el aumento de la concentración de las partículas ricas en triglicéridos y de las LDL's pequeñas y densas.

No todos los pacientes con HLFC tienen aumento en la tasa de secreción hepática de lipoproteínas. Aguilar y cols¹¹ describieron una familia que llenaba los criterios clínicos de la hiperlipidemia familiar combinada en que en ninguno de sus miembros se demostró sobreproducción hepática de lipoproteínas. En estos casos, la hiperlipidemia se explicó por disminución en el catabolismo de las VLDL's y de las LDL's. El mismo defecto metabólico se observó en todos los individuos sin importar el patrón de lípidos existentes. Este dato sugiere que defectos adicionales en la composición de las lipoproteínas deben contribuir en la expresión fenotípica de la enfermedad. Estos hallazgos son una prueba de la heterogeneidad de la enfermedad.

Diversos grupos han buscado los genes causantes de la enfermedad sin éxito.¹²⁻¹⁸ Existe evidencia de la participación de varios loci entre distintas familias y entre distintas poblaciones. Los genes candidato más estudiados son la lipasa lipoproteica y el complejo de apoproteínas AI/CIII/AIV. Pajukanta y colaboradores¹⁹ buscaron ligamiento al azar en 31 familias finlandesas encontrando asociación con varios loci (10q11.2-10qter, 2q31 y 21q21).

Justificación: A pesar de su importancia para la salud pública, aún se conoce poco de la etiopatogenia, fisiopatología y tratamiento de la hiperlipidemia familiar combinada. Se requiere información adicional sobre la eficacia de los criterios diagnósticos de la HLFC para detectar sujetos en riesgo de sufrir eventos cardiovasculares. Además, los genes involucrados en este padecimiento aún se desconocen. El resultado de la interacción de la HLFC con otras causas de dislipidemia no ha sido descrito. Finalmente, el efecto de diversas alternativas terapéuticas en pacientes con este padecimiento ha sido parcialmente estudiado. Dado el número y la estructura de las familias mexicanas afectadas con las que contamos, su patrón de herencia autosómico dominante, así como las características de sus miembros afectados, es posible caracterizar estas familias para establecer a través de ligamiento genético las regiones cromosómicas de los genes responsables de este fenotipo en población mexicana, y potencialmente, identificar genes involucrados en la etiopatología de esta enfermedad.

Objetivos: Realizar la caracterización clínica y genética de familias mexicanas con hiperlipidemia familiar combinada (HLFC). La caracterización incluye la identificación de la, o las regiones cromosómicas responsables de este padecimiento, la descripción de la interacción de la HLFC con otras causas de hiperlipidemia, el análisis de la concordancia de diversos elementos de los criterios diagnósticos y la medición de la eficacia terapéutica de diversos fármacos. Cada uno de estos elementos se ha convertido en proyectos de investigación individual. De esta línea de investigación, han resultado cuatro publicaciones en revistas internacionales y varias presentaciones en congresos. A continuación se describen los resultados obtenidos en cada uno de estos proyectos y su status actual.

1. *Análisis de la concordancia de los diversos elementos de los criterios diagnósticos de la HLFC:* En el estudio de la HLFC, los resultados contradictorios han sido una constante. Una posible explicación para ello es la definición empleada para clasificar a un sujeto como afectado. La ausencia de un marcador genético ha sido sustituida por múltiples variantes de los criterios diagnósticos originales. Algunos autores han basado el diagnóstico en las concentraciones de colesterol, triglicéridos y de colesterol HDL; otros han incluido los niveles de la apolipoproteína B debido a la importancia de esta proteína en la patogénesis de la HLFC. Aún más, diferentes puntos de corte han sido empleados para considerar como anormales las concentraciones de los lípidos séricos. Por lo tanto, es un punto crítico definir los puntos de corte adecuados para la categorización de los casos. El objetivo del estudio fue analizar la concordancia de diversas concentraciones de colesterol y triglicéridos con niveles anormales de la apoB en familias con HLFC. Para ello, 22 familias ($n = 217$) fueron incluidas. La concordancia, medida como coeficientes kappa, entre 14 combinaciones de concentraciones de colesterol y de triglicéridos y 8 puntos de corte de la apoB fue analizada. Se observó una falta de concordancia en la identificación de un sujeto como anormal, cuando se aplicaron los diversos criterios diagnósticos basados en los lípidos séricos o varios puntos de corte de la apoB. La concordancia de los criterios más frecuentemente empleados para la concentración de colesterol y triglicéridos ($\geq$ percentil 90) y todas las concentraciones de apoB incluidas en el análisis fue baja (kappa 0.42-0.49). Una concentración de triglicéridos ≥ 150 mg/dL y de colesterol ≥ 200 mg/dL, fue el único criterio que tuvo una kappa moderadamente aceptable (> 0.6); la concordancia se encontró con una apoB ≥ 120 mg/dL (kappa = 0.604). Proponemos que esta combinación, incluyendo la concentración de la apoB debe ser empleada para la iden-

tificación de los casos. Su empleo debe ser validado en estudios prospectivos. Estos datos demuestran que las conclusiones derivadas de estudios genéticos pueden ser totalmente distintas debido a los criterios diagnósticos seleccionados. Estos datos fueron publicados recientemente en la revista *Metabolism*.²⁰ Nuestras observaciones son coherentes con lo descrito recientemente por otros grupos quienes apoyan el uso de la apoB como parte integral de los criterios diagnósticos de la HLFC.²¹ Los datos están siendo aplicados en las otras líneas de investigación que conforman este proyecto.

2. *Estudio del efecto de diversos medicamentos en el tratamiento de la HLFC:* Dos grupos de medicamentos han sido evaluados. El empleo de una estatina (pravastatina) fue analizado en pacientes con HLFC; los efectos sobre la tasa de producción y eliminación de la apoB fueron evaluados por medio del marcaje endógeno de la proteína empleando la infusión por 8 horas de ¹⁵C leucina. Los resultados demostraron que el mecanismo principal de acción de las estatinas es aumentar la tasa de eliminación de la apoB. Los resultados fueron publicados en *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*.¹¹ Estos datos fueron incorporados en una revisión publicada por nuestro grupo en *Arteriosclerosis*.²² La segunda clase de fármacos estudiados son los fibratos. Para ello, participamos en un estudio multicéntrico en que se analizó el efecto del ciprofibrato y del gemfibrozil en pacientes con hiperlipidemias mixtas. Nuestro centro aportó 35 casos, todos ellos con HLFC. Los resultados demostraron que ambos fármacos son iguales en eficacia y seguridad. La concentración de la apoB disminuyó 18.6% durante el tratamiento con ciprofibrato y 14.4% con el empleo del gemfibrozil. Estos datos fueron publicados recientemente en la revista *Metabolism*.²³

3. *Análisis de la interacción de la HLFC con otras causas de hiperlipidemia:* Se escogió como modelo la hiperlipidemia post-trasplante renal. Se estudiaron 83 casos con trasplante renal exitoso realizado entre 1985 y 1999. La evaluación incluyó el estudio de al menos 3 familiares de primer grado y la medición de la composición corporal y de su dieta. Se midió un perfil de lípidos en todos los participantes. La hiperlipidemia familiar combinada fue diagnosticada en 14 familias y su presencia fue identificada como el marcador más fuerte para tener hipercolesterolemia post-trasplante (razón de momios 7.04, 95% IC 1.2-59.7). Los casos en que coexistió la hiperlipidemia familiar combinada tenían los niveles más altos de lípidos séricos del estudio. Los casos con HLFC tratados con ciclosporina A tenían niveles de lípidos significativamente más altos que los casos que recibían este

fármaco que no tenían HLFC. Estos datos sugieren que la evaluación del perfil de lípidos en los familiares y la identificación de los casos con HLFC son útiles para la predicción de los casos que desarrollarán hiperlipidemia post-trasplante renal. Esta práctica se ha incorporado a la rutina del estudio pre-trasplante en este Instituto y su utilidad será evaluada con un estudio prospectivo. Los datos han sido aceptados para publicación en *American Journal of Kidney Diseases*.²⁴

4. *Estudios de ligamiento genético en familias mexicanas:* En el Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán", hemos captado en los últimos 5 años, 55 familias mexicanas con HLFC. La mayoría de estas familias muestran un patrón sugestivo de herencia autosómica dominante y en 12 de ellas, se tienen individuos disponibles para estudio en al menos tres generaciones. Estas familias comprenden aproximadamente 150 individuos de quienes contamos con muestras de DNA. Asimismo, se cuenta con una caracterización clínica y bioquímica de los integrantes de estas familias. El valorar por medio de estudios de ligamiento la asociación del padecimiento con ciertas regiones cromosómicas, en familias mexicanas, constituirá la base para la búsqueda de genes candidato. Lo anterior representaría un avance considerable en el estudio de esta entidad. Existe una ventaja importante al realizar estos estudios en familias mexicanas, ya que a diferencia de lo que sucede en la mayor parte de los países desarrollados, el tamaño de algunas familias en el país facilita los estudios de ligamiento genético. Se han caracterizado 12 familias para las cuales se están llevando a cabo estudios de simulación preliminares (programa MSIM) para establecer su potencial informativo para estudios de ligamiento genético. El programa MSIM asigna de manera aleatoria alelos a cada individuo de la familia considerando las frecuencias alélicas de un marcador dado en la población sana. Este proceso nos permite seleccionar las familias que, por su estructura y el número, y distribución de individuos afectados y sanos, son útiles para el análisis de ligamiento genético. Con el objeto de asegurar la disponibilidad permanente de muestras de individuos clave proponemos el establecimiento de líneas linfocíticas inmortalizadas (además de la muestra de sangre total) de aquellos miembros que resulten difíciles de contactar, que vivan en otras ciudades o cuyas edades sean avanzadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Criterios de inclusión: Voluntarios con edad > 6 años con los siguientes criterios: miembros de familias con HLFC: para considerar un caso afectado deberá tener triglicéridos > 150 mg/dL, colesterol $\geq$ 200 mg/dL y apoB

$\geq$ 120 mg/dL. Para clasificar una familia como afectada deberá existir al menos un caso con triglicéridos > 150 mg/dL, otro con colesterol > 200 mg/dL y otro con ambas alteraciones.

Criterios de exclusión: Causas conocidas de dislipidemia secundaria.

Caracterización clínica de las familias: La caracterización clínica consiste en una evaluación clínica completa y la medición de la concentración en suero de colesterol, triglicéridos, colesterol HDL y apoB. El colesterol y los triglicéridos se están midiendo con pruebas colorimétricas comerciales (Beckman Instruments, Fullerton, CA) y las concentraciones de apoB en suero mediante nefelometría (Array Protein System, Beckman Instruments, Fullerton, CA).

Procesamiento de muestras biológicas para análisis molecular: El aislamiento de DNA se realiza por medio de lisis hipotónica de eritrocitos a partir de sangre total o de líneas linfocíticas, a través de la digestión con proteinasa K, según el método descrito en Speiser et al. (1992). Los DNAs genómicos son almacenados a 4°C.

Análisis de segregación de marcadores: Se utilizan marcadores microsatélites cercanos a cada uno de los potenciales genes candidato a estudiar, o bien los marcadores descritos como ligados a HLFC en otras poblaciones. El análisis de segregación de marcadores involucra la amplificación de la región a estudiar por medio de reacción de polimerasa en cadena (PCR). Los ensayos se efectúan con oligonucleótidos específicos marcados radiactivamente. Los productos de las reacciones de PCR se separan por electroforesis en geles desnaturizantes (urea 8 M) de poliacrilamida al 6% y se utiliza la secuencia del fago M13 como marcador del tamaño de los fragmentos amplificados. Los geles son expuestos en cassettes de autoradiografía utilizando película X-Omat (Kodak).

Análisis de ligamiento genético: El paquete de programas LINKAGE (Terwilliger et al., 1994) ha sido implementado en una estación de trabajo Sun Ultra 170 y contamos con acceso vía Telnet. Se asume una penetrancia del 90%. Para cada uno de los marcadores microsatélites se determinaron frecuencias alélicas en una muestra de individuos sanos no relacionados.

Tamaño de la muestra: Se ha completado la evaluación de 4 familias. En dos de ellas su informatividad (medida por LOD score) fue satisfactoria (LOD score 2.9 y 7.8). Se calcula que al menos 10 familias más tendrán 20 individuos o más disponibles para el análisis.

METAS PROPUESTAS

A corto plazo (6 meses): Completar la recolección de muestras de sangre de al menos 10 familias aptas para estudios de ligamiento genético (con Lod Score $\geq$ 3) y realizar la extracción de DNAs genómicos. Generar líneas

de linfocitos inmortalizados en cultivo provenientes de familias mexicanas afectadas con HFLC.

A mediano plazo (1.5 años): Completar el análisis de la participación de 20 genes candidatos y de la posible segregación con los marcadores microsatélites disponibles en al menos 10 familias consideradas como informativas. Realización de los manuscritos resultantes y envío a publicación.

A largo plazo (3 años): Conclusión de la genotipificación de cuantas familias sea posible. Seguimiento a largo plazo de los casos y de los controles para evaluar su riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares.

BIBLIOGRAFÍA

- Davignon J, Genest J. Genetics of lipoprotein disorders. *Endoc Metab Clin North Am* 1998; 27: 521-534.
- Arner P. Is familial combined hyperlipidaemia a genetic disorder of adipose tissue? *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 89-94.
- Bredie SJ, Demacker PN, Stalenhoef AF. 1997. Metabolic and genetic aspects of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on low-density lipoprotein heterogeneity. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 802-11.
- Aguilar-Salinas CA, Oloiz G, Valles V, Ríos JM, Gómez PFJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepúlveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nation wide survey. *J Lipid Research* 2001; 42: 1298-307.
- Austin M, McKnight B, Edward K et al. Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: A 20-year prospective study. *Circulation* 2000; 101: 2777-82.
- Keulen E, Kruishoop M, Schaper N et al. Increased intima mediathickness in familial combined hyperlipidemia associated with apoB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 283-289.
- Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WT, Bierman EL, Motulsky AG. 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* 1973; 52: 1544-68.
- Grundt SM, Chait A, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia workshop. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 203-207.
- Erkelens DW. Metabolic basis for hypertriglyceridemia in familial combined hyperlipidaemia. *Eur Heart J* 1998; 19(Suppl H): H23-6.
- Ascaso JF, Sales J, Merchante R, Real J, Lorente R, Martínez-Valls J, Carmena R. Influence of obesity on plasma lipoproteins, glycaemia and insulinaemia in patients with familial combined hyperlipidaemia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997; 21: 360-6.
- Aguilar-Salinas CA, Barrett HP, Pulai J, Zhu X, Schonfeld G. A familial combined hyperlipidemic kindred with impaired apolipoprotein B catabolism. Kinetics of apolipoprotein B during placebo and pravastatin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 72-82.
- Castellani LW, Weinreb A, Bodnar J, Gotto AM, Doolittle M, Mehrabian M, Demant P, Lusis AJ. Mapping a gene for combined hyperlipidemia in a mutant mouse strain. *Nat Genet* 1998; 18: 374-377.
- De Graaf J, Stalenhoef AF. Defects of lipoprotein metabolism in familial combined hyperlipidaemia. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 189-96.
- Bredie SJ, van Drongelen J, Kiemeny LA, Demacker PN, Beatty TH, Stalenhoef AF. Segregation analysis of plasma apolipoprotein B levels in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 834-40.
- Wijlsman EM, Brunzell JD, Jarvik GP, Austin MA, Motulsky AG, Deeb SS. Evidence against linkage of familial combined hyperlipidemia to the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 215-26.
- Ribalta J, La Ville AE, Vallve JC, Humphries S, Turner PR, Masana L. A variation in the apolipoprotein C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 1997; 38: 1061-9.
- Pihlajamäki J, Rissanen J, Heikkinen S, Korjalainen L, Laakso M. Codon 54 polymorphism of the human intestinal fatty acid binding protein 2 gene is associated with dyslipidemias but not with insulin resistance in patients with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1039-44.
- Tahvanainen E, Pajukanta P, Porkka K, Nieminen S, Ikaavalo L, Nuotio I, Taskinen MR, Peltonen L, Ehnholm C. 1998. Haplotypes of the ApoA-I/C-III/A-IV gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1810-7.
- Pajukanta P, Terwilliger JD, Perola M, Hiekkalinna T, Nuotio I, Elonen P, Parkkinen M, Hartiainen J, Vitolalo K, Pihlajamäki J, Porkka K, Laakso M, Viikari J, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L. Genome-wide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol, and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1453-63.
- Del Rincón-Jarero JP, Aguilar-Salinas CA, Guillén-Pineda LE, Gómez PFJ, Rull JA. Lack of agreement between the plasma lipid based criteria and the apoprotein B for the diagnosis of familial combined hyperlipidemia (FCHL) in members of FCHL kindreds. *Metabolism* 2002; 51: 218-24.
- Veerkamp M, de Graaf J, Bredie J et al. Diagnosis of familial combined hyperlipidemia based on lipid phenotype expression in 32 families: results of a 5 year follow up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 274-282.
- Aguilar-Salinas CA, Barrett H, Schonfeld G. Metabolic modes of action of statins in the hyperlipoproteinemias. *Atherosclerosis* 1998; 141: 203-207.
- Aguilar-Salinas CA, Fanghanel-Salmón G, Meza E, Montes J, Gullas-Herrero R, Sánchez L, Monterrubio-Flores E, González-Valdez H, Gómez PFJ. Ciprofibrate vs gemfibrozil in the treatment of mixed hyperlipidemias: an open label, multicenter study. *Metabolism* 2001; 50: 729-33.
- Aguilar-Salinas CA, Díaz-Polanco R, Quintana E, Macías M, Arellano A, Ramírez E, Ordóñez ML, Velásquez-Alva C, Gómez PFJ, Alberú J, Correa-Rotter R. Genetic factors play an important role in the pathogenesis of hyperlipidemia post-transplantation. *Am J Kidney Diseases* 2002; 40: 169-77.

Contribution of Chromosome 1q21-q23 to Familial Combined Hyperlipidemia in Mexican Families

A. Huertas-Vázquez¹, J. P. del Rincón², S. Canizales-Quinteros¹, L. Riba¹, G. Vega-Hernández¹, S. Ramírez-Jiménez¹, M. Aurón-Gómez², F. J. Gómez-Pérez², C. A. Aguilar-Salinas² and M. T. Tusié-Luna^{1,*}

¹Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City

²Departamento de Endocrinología y Metabolismo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City

³Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City

Summary

Familial combined hyperlipidemia (FCHL) is the most common familial dyslipidemia, with a prevalence of 1–2% in the general population. A major locus for FCHL has been mapped to chromosome 1q21–q23 in Finnish, Chinese, German and US families. We studied seven extended Mexican families with 153 members, including 64 affected subjects. A total of 11 markers were genotyped, including D1S104 which has been linked to FCHL in other studies. Two point linkage analysis for the FCHL phenotype, and for the elevated triglyceride (TG) trait, allowing for heterogeneity, gave a maximum HLOD of 1.67 ($\alpha = 0.49$) and 1.93 ($\alpha = 0.43$) at D1S2768 (2.69 cM proximal to D1S104) respectively. Heterogeneity and non-parametric (NPL) multipoint analyses for the FCHL phenotype and the TG trait showed maximum HLODs of 1.27 ($\alpha = 0.46$) and 1.64 ($\alpha = 0.38$), and NPLs of 4.00 ($P = 0.0001$) and 3.68 ($P = 0.0003$) near D1S2768, respectively. In addition, analysis of four candidate genes putatively involved in the expression of FCHL showed no evidence of linkage for the *LCAT* gene or the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster. However, we cannot exclude the participation of these genes, or the *LIPC* and *LPL* genes, as minor susceptibility loci in the expression of FCHL, or the TG or elevated total cholesterol (TC) traits in our families. In conclusion, our data confirm the involvement of a major susceptibility locus on chromosome 1q21–q23 in FCHL Mexican families, consistent with findings in other populations.

Keywords: Genetic linkage, candidate genes, dyslipidemia, lipid metabolism

Introduction

Familial combined hyperlipidemia (FCHL) (MIM-144250) is a common and heterogeneous disorder, characterized by the presence of multiple lipoprotein phenotypes and a high risk for coronary artery disease (CAD) (Goldstein *et al.* 1973), accounting for 10–20%

of the CAD patients under 60 years of age. FCHL is characterized by the variable expression of both hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia. One of the characteristic features of FCHL is its variability in lipid and lipoprotein pattern among family members (Bredie *et al.* 1997). FCHL profiles are often associated with elevated APOB levels, an unfavourable decrease in HDL cholesterol (HDL-C), and a preponderance of atherogenic small-dense LDL particles (Nikkila *et al.* 1973; Brunzell *et al.* 1983; Grundy *et al.* 1987; Soro *et al.* 2003; Ayyobi *et al.* 2003). In addition, FCHL is associated with hyperinsulinemia, impaired glucose tolerance, obesity and insulin resistance (Eckel *et al.* 2001; Purnell *et al.* 2001).

*Corresponding author: Ma. Teresa Tusié-Luna, M.D. Ph.D. Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga # 15, Colonia Sección 16. Tlalpan, 14000 México D.F., México. Phone (52)(55) 56-55 00-11 or (52)55 73 12 00 Exts. 2251, 2252. FAX (00)(52)(55) 56-55-00-11. E-mail: tusie@servidor.unam.mx

Although familial segregation in FCHL was initially described as consistent with autosomal dominant transmission (Goldstein *et al.* 1973), subsequent studies uncovered a more complex and heterogeneous mode of inheritance (Castro-Cabezas *et al.* 1992; Cullen *et al.* 1994; Aouizerat *et al.* 1999a), indicating that FCHL is an oligogenic disorder where environmental factors can also play a role in modulating its phenotype. Several genetic surveys have been conducted in various ethnic groups to identify susceptibility loci for FCHL, as well as for its various subphenotypes (Wojciechowski *et al.* 1991; Dallinga-Thie *et al.* 1997; Pajukanta *et al.* 1998; Wijsman *et al.* 1998; Pajukanta *et al.* 1999; Aourizerat *et al.* 1999a; Aourizerat *et al.* 1999b; Pei *et al.* 2000; Coon *et al.* 2000; Naoumova *et al.* 2003; Eichenbaum-Voline *et al.* 2003). However, its primary etiology remains largely unknown.

Evidence for a major FCHL locus was first found at chromosome 1q21-q23 in a survey of the Finnish population (Pajukanta *et al.* 1998), and replication for this locus was subsequently observed in Chinese, German and US kindreds (Pei *et al.* 2000; Coon *et al.* 2000). Linkage and/or association to the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster (Wojciechowski *et al.* 1991; Dallinga-Thie *et al.* 1997; Wijsman *et al.* 1998; Aourizerat *et al.* 1999a; Naoumova *et al.* 2003; Eichenbaum-Voline *et al.* 2003), and the lecithin cholesterol acyltransferase (*LCAT*) gene (Aourizerat *et al.* 1999b), have also been shown. Additionally, mutations in the *LPL* gene have been associated with the phenotype (Reymer *et al.* 1995; Yang *et al.* 1995; Mailly *et al.* 1995; Deeb *et al.* 1996; Hoffer *et al.* 1996). These reports suggest that these loci may contribute to the expression of FCHL as modifier or susceptibility genes. Additional evidence has shown that at least one of these loci (the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster) has an additional heterogeneous effect in a population in which linkage was found for the 1q21-q23 locus (Coon *et al.* 2000).

Castellani *et al.* (1998) identified a mouse mutant strain, *hCb-19*, that shares features with familial combined hyperlipidemia. In this animal model the hyperlipidemia results from a mutation in the thioredoxin-interacting protein (*Txnip*) gene at the *Hyplip1* locus on mouse chromosome 3, in a region syntenic to the 1q21-q23 FCHL locus in humans (Bodnar *et al.* 2002). In this study, we evaluate the role of the chromosome

1q21-q23 locus, as well as different candidate genes, in the FCHL phenotype in Mexican families. We report evidence of linkage to the 1q21-q23 locus in our families, confirming its contribution as a major locus in the expression of FCHL. Additionally, we analyze human *TXNIP*, the ortholog of *Txnip* in the murine model, as a potential positional candidate.

Subjects and Methods

Subjects

Seven extended Mexican FCHL families with a history of premature coronary heart disease (CAD), and the presence of abnormal lipid profiles in several members in consecutive generations, were included in this study. These families were recruited from the Lipid Clinic of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMSZ) in Mexico City, and comprise a total of 153 members including 64 affected individuals (Figure 1). Affected status for the FCHL phenotype was assigned to individuals with elevated levels of triglycerides (>90th percentile) (TG trait), and/or elevated levels of total cholesterol (>90th percentile) (TC trait), and elevated APO B levels (>90th percentile), adjusted for age and sex, defined according to a survey of the Mexican population (Aguilar-Salinas *et al.* 2001; Valles *et al.* 2002). The clinical characteristics of the subjects are shown in Table 1. Additionally, at least one first-degree relative should have an altered hyperlipidemic phenotype. Positive family history for premature CAD was defined as a myocardial infarction (MI) or cardiovascular disease before age 60. All lipid levels considered for affected individuals were prior to treatment. All subjects completed a questionnaire about their previous medical history, with emphasis on their cardiovascular status, medication, and smoking and drinking habits. BMI was determined for all subjects. Exclusion criteria for affected status included the presence of tendon xanthomas, renal disease, thyroid disorders, or a BMI > 30. Diabetic subjects were assigned an unknown status. To circumvent problems of incomplete penetrance, and because the FCHL phenotype is age dependent, normolipemic individuals below age 20 were also classified as unknown.

Informed written consent was obtained through the attending physicians. The protocol for this study was

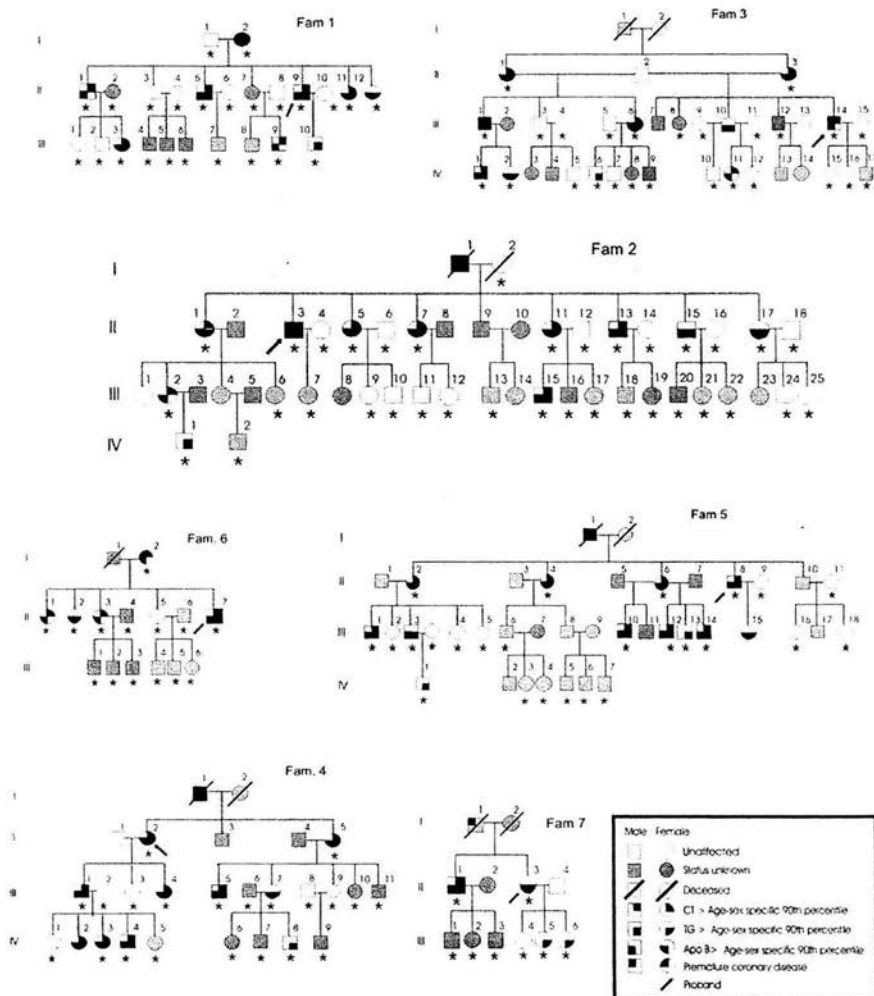


Figure 1 Pedigrees of the seven families included in the study. Keys to the symbols are provided. Asterisks denote individuals for whom DNA samples were available.

approved by the Institutional Committee of Biomedical Research in Humans of the INCMNSZ.

Laboratory Analytical Methods

The Endocrinology and Lipid Metabolism Department of the INCMNSZ performed all lipid and clinical lab-

oratory measurements using standardized procedures. This laboratory is certified for standardization of tests by the External Comparative Evaluation of Laboratories Program of the College of American Pathologists. Blood samples were taken after an overnight fast (9–12 hours), following careful instructions to the patients about the relevance of the required fasting.

All analyses were performed with commercially available standardized methods. Glucose was measured using the glucose oxidase method, and HbA_{1c} using latex immunoagglutination inhibition (Bayer laboratories). Total serum cholesterol and triglycerides were measured using an enzymatic method (SERA-PAK®) (CV 3.3%). HDL-C levels were assessed using phosphotungstic acid and Mg²⁺ (CV 2.5%). LDL-C concentrations were estimated by the Friedewald formula (Friedewald et al. 1972). Apolipoprotein B concentration was measured by an immunonephelometric method (CV 2.5%).

Genotyping

DNA was extracted from whole blood using a phenol-free extraction protocol, adapted from Buffone & Darlington (1985). Genotyping of microsatellite markers was performed by PCR (polymerase chain reaction) amplification, incorporating labelled α -³²P(dCTP) in the amplification reaction. The 1q21-q23 locus was analyzed using the markers reported by Pajukanta et al. (1998), and additional markers in the region (D1S534, D1S2715, D1S1653, D1S2635, D1S400) were selected from various databases (The Genome Database: <http://gdb.org>; Center for Medical Genetics: <http://research.marshfieldclinic.org>). The roles of four different candidate genes encoding enzymes putatively involved in the expression of FCHL [hepatic lipase (*LIPC*), lipoprotein lipase (*LPL*), the *APOA1/C3/A4/A5* cluster and lecithin cholesterol acyltransferase (*LCAT*)] were evaluated using intragenic

or physically linked markers selected from the above databases.

Linkage Analysis

Linkage analyses were performed with GENEHUNTER-PLUS (Kong & Cox, 1997) and GENEHUNTER-TWOLOCUS (Strauch et al. 2000). A model assuming a dominant pattern of inheritance was used, with a gene frequency of 0.001 and 90% penetrance. Allele frequencies for all markers were calculated from the non-related members of the studied families.

Sequencing Analysis of the TXNIP Gene

The eight exons of the *TXNIP* gene, including exon-intron junctions and a 1Kb proximal promoter region, were amplified by PCR from all seven probands using specific primers based on GenBank entry NM_006472.1. Sequencing reactions were performed with Big Dye Terminator Kit v3 using a 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Results

The clinical characteristics of the studied subjects are listed in Table 1. Linkage analyses were performed for the FCHL phenotype (as defined in the Subjects section), and for the TG and TC traits, respectively. Assuming heterogeneity, maximum two point HLODs of 1.67 ($\alpha = 0.49$), 1.93 ($\alpha = 0.43$) and 0.72

Variable	Affected (mean $\pm$ SD)	Unaffected (mean $\pm$ SD)	P
N (M/F)	64 (30/34) *	52 (18/34)	–
Age (years)	34.16 $\pm$ 16.68	33.02 $\pm$ 16.17	6.9 $\times 10^{-1}$
Body mass index	24.69 $\pm$ 4.17	23.09 $\pm$ 5.99	9.3 $\times 10^{-2}$
TC (mg/dl)	245.82 $\pm$ 26.24	170.37 $\pm$ 31.47	7.3 $\times 10^{-22}$
TG (mg/dl)	242.02 $\pm$ 89.44	110.08 $\pm$ 67.38	4.7 $\times 10^{-12}$
HDL-C (mg/dl)	40.17 $\pm$ 11.04	44.12 $\pm$ 10.49	3.8 $\times 10^{-2}$
LDL-C (mg/dl)	140.28 $\pm$ 41.49	106 $\pm$ 30.74	1.7 $\times 10^{-7}$
Apo B (mg/dl)	119.19 $\pm$ 25.61	79.63 $\pm$ 19.83	3.6 $\times 10^{-18}$

*Lipid profile data were available for 153 individuals. There were 64 affected individuals for the FCHL phenotype, and 52 unaffected individuals. Forty individuals were assigned unknown status (See Subjects and Methods). For elevated TC, n = 46; for elevated TG, n = 54. For elevated ApoB, n = 57.

Table 1 Clinical characteristics of the subjects

Table 2 HLOD and NPL values obtained for 5 markers spanning a 9.6 cM region at chromosome 1q21-q23*.

Marker	cM	FCHL		TG		TC	
		HLOD (α)	NPL (p)	HLOD (α)	NPL (p)	HLOD (α)	NPL (p)
D1S2635	165.6	1.017 (.41)	0.97 (.16)	0.70 (.24)	0.35 (.355)	-0.001 (0)	0.15 (.41)
APOA2	170.8	0.27 (.48)	1.09 (.14)	0.198 (.42)	1.07 (.126)	-0.002 (0)	0.26 (.37)
D1S2768	172.9	1.67 (.49)	2.91 (.003)	1.93 (.43)	2.35 (.01)	0.72 (.22)	1.19 (.104)
D1S104	175.2	0.43 (.28)	1.66 (.055)	0.70 (.40)	1.60 (.049)	0.58 (.31)	0.93 (.15)
D1S400	175.2	0.11 (.26)	3.06 (.002)	0.02 (.098)	2.58 (.005)	0.21 (.16)	1.54 (.056)

*HLOD, Heterogeneity LOD score; NPL, Non-parametric LOD score; FCHL, combined phenotype; TG, elevated triglycerides trait; TC, elevated total cholesterol trait. (α) proportion of linked families; (p) p value

($\alpha = 0.22$) were obtained at D1S2768 for the FCHL, TG and TC traits, respectively (Table 2). This marker is 2.6 cM centromeric to the D1S104 marker reported by Pajukanta *et al.* (1998). Multipoint analyses yielded a maximum HLOD of 1.27 ($\alpha = 0.46$) and 1.64 ($\alpha = 0.38$) for FCHL and TG, respectively, close to marker D1S2768.

The contribution of individual families to the maximum two-point heterogeneity score is shown in Table 3. For the FCHL phenotype, only one family exceeded a LOD score of 2.0, while of the remaining six families, five showed small positive LOD scores. For the TG and TC traits, two families had LOD scores above 1.

Non-parametric multipoint analyses yielded maximum NPL scores of 4.0 ($P = 0.0001$), 3.6 ($P = 0.0003$) and 1.38 ($P = 0.07$) for the FCHL, TG and TC traits, respectively, at marker D1S2768.

We also analyzed the human *TXNIP* gene. *TXNIP* is 16.5 Mb proximal to D1S2768, the marker with the highest lod score. However, it lies within a 24 cM region with positive LOD score values, between D1S534 and D1S104 (119 to 160.8 Mb in the physical map). *TXNIP* was considered a potential positional candidate since it is the ortholog gene of *Txnip* at the *Hyplip1* locus (syntenic to human chromosome 1q21-q23) of the hyperlipidemic murine model. We performed sequence analysis of the eight exons that constitute the gene, the exon-intron junctions, and a 1 Kb proximal promoter region, in all seven probands without identifying any sequence changes.

Candidate genes encoding proteins involved in lipid metabolism, *LPL*, *LIPC*, the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster, and *LCAT*, were additionally examined through

Table 3 Contributions of individual families (maximum parametric two-point LOD score) for the FCHL, TG and TC traits.

Family	Marker	LOD score		
		FCHL	TG	TC
1	D1S2768	2.01	1.93	1.70
2	D1S400	0.05	-	-
3	-	-	-	-
4	D1S104	0.50	0.84	0.77
5	D1S2768	0.28	1.19	0.0
	D1S400	0.39	0.58	1.13
6	D1S2768	0.58	-	-
7	APOA2	0.13	-	-

linkage analysis to evaluate their possible contributions to the FCHL phenotype, or TG and TC traits. Maximum HLODs of 0.29 ($\alpha = 0.16$) and 0.19 ($\alpha = 0.19$) were obtained for the *LIPC* gene (for FCHL and TC), and 0.31 ($\alpha = 0.28$) for the *LPL* gene (TG trait). No evidence of linkage was found for the *LCAT* gene or the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster (Table 4). A possible interaction between any of these candidate genes with the 1q21-q23 locus was also evaluated (using GENEHUNTER-TWOLOCUS); no evidence of interaction was found (data not shown).

Discussion

The present study in Mexican families substantiates the previously reported involvement of the chromosome 1q21-q23 region as a major susceptibility locus for FCHL (Pajukanta *et al.* 1998). Two-point linkage analysis allowing for heterogeneity gave a maximum HLOD of 1.67 ($\alpha = 0.49$), 1.93 ($\alpha = 0.43$) and 0.72 ($\alpha =$

Table 4 HLOD and α (proportion of linked families) values obtained for 4 candidate gene loci: APOA1/C3/A4/A5 cluster, lipoprotein lipase, hepatic lipase and LCAT.

Gene	FCHL HLOD (α)	TG HLOD (α)	TC HLOD (α)	Marker informativity
APOA1/C3/A4/A5 cluster				
ApoA1 (intragenic)	-0.0004 (.0005)	-0.0003 (.0004)	0.024 (.07)	0.38
D11S1989	-0.0001 (0)	0 (0)	-0.0001 (.0001)	0.45
Lipoprotein lipase				
LPL (intragenic)	0 (0)	0.31 (.28)	0 (0)	0.52
Hepatic Lipase				
HL (intragenic)	0.299 (.16)	-0.0001 (.0001)	0.19 (.19)	0.41
LCAT				
D16S496	-0.0002 (.0001)	0.042 (.10)	0.006 (.07)	0.42
D16S2624	-0.0001 (.0001)	0.016 (.08)	0 (0)	0.4

0.22) for FCHL, TG and TC, respectively, for marker D1S2768 (2.69 cM centromeric to D1S104) (Table 2), while multipoint analysis yielded a maximum HLOD of 1.27 ($\alpha = 0.46$) and 1.64 ($\alpha = 0.38$) for FCHL and TG, respectively, close to marker D1S2768. It is interesting to note that, as previously observed by Pajukanta *et al.* (1998), our data also show higher scores predominantly for the FCHL phenotype and the TG trait. Our results are consistent with those originally reported for the Finnish population and then replicated in German, Chinese and US populations (Pei *et al.* 2000; Coon *et al.* 2000). Sequencing analysis of human *TXNIP*, the ortholog murine *Txnip* and a strong positional candidate, yielded no sequence changes in the eight exons that constitute the gene, the exon-intron junctions, and a 1 Kb proximal promoter region. This result suggests that the gene responsible for FCHL in humans lies elsewhere within this genomic region.

Although FCHL was initially thought of as an inherited disorder with one major genetic locus, subsequent studies have uncovered the complexity of the underlying genetic causes of this common disease. Kinetic studies suggest that the most common finding in patients with FCHL is an increased secretion of VLDL triglycerides, and associated APOB, raising the possibility that the primary defects involve triglyceride metabolism with secondary effects in cholesterol metabolism (Kane & Havel, 2001). However, there is also evidence that the FCHL phenotype results in part from defects in lipoprotein catabolism, with at least one clearly documented FCHL kindred demonstrating impaired removal of both VLDL and LDL (Aguilar *et al.* 1997). This metabolic heterogeneity supports the genetic evidence portraying this

condition as a highly complex and heterogeneous entity.

Numerous genetic association and linkage studies have been performed in a variety of populations and, with the exception of the chromosome 1q21-q23 and the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster, these surveys have come up with widely different results (Wojciechowski *et al.* 1991; Dallinga-Thie *et al.* 1997; Pajukanta *et al.* 1998; Wijsman *et al.* 1998; Pajukanta *et al.* 1999; Aouizerat *et al.* 1999a,b; Pei *et al.* 2000; Coon *et al.* 2000; Naoumova *et al.* 2003; Eichenbaum-Voline *et al.* 2003). Whereas the 1q21-q23 locus seems to have a predominant role in FCHL in the studies with Finnish kindreds, it would seem that it plays a lesser role in other ethnic groups as reported for Chinese, German and US families (Pei *et al.* 2000; Coon *et al.* 2000), and in the present study with Mexican kindreds. However, the heterogeneity of the cohorts used in these studies with respect to composition (larger, more extended, families vs. primarily sib pairs), and population-specific informativeness of the markers used, could in part explain the varying magnitude of the results. Aouizerat *et al.* (1999a) did not find linkage to the chromosome 1q21-q23 locus in a Dutch population, but showed evidence of linkage to the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster (Aouizerat *et al.* 1999a) and the *LCAT* gene (Aouizerat *et al.* 1999b). Coon *et al.* (2000) replicated linkage to the 1q21-q23 locus in a US population. These authors also found a modest NPL value of 1.11, $p = 0.13$, for the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster. However, using TWO-LOCUS analysis with markers in the 1q21-q23 and the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster they found an additional heterogeneous effect for

this locus (Coon *et al.* 2000). Recently, Naoumova *et al.* (2003) and Eichenbaum-Voline *et al.* (2003) replicated linkage for the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster in a Northern European population. These studies indicate that these loci may act as either major loci, or susceptibility or modifier genes, in the expression of the FCHL phenotype in different ethnic groups.

In the present study, we also analyzed different candidate genes encoding proteins essential for lipid metabolism (*LPL*, *LIPC*, *LCAT* and the *APOA1/C3/A4/A5* cluster) that have previously shown linkage or association to FCHL. No evidence of linkage was found for the *APOA1/C3/A4/A5* cluster or *LCAT*, whereas nominal HLOD values were obtained for the *LIPC* and *LPL* genes (for the FCHL phenotype and the TC trait, and for the TG trait, respectively) (Table 4). However, the size of the sample studied does not allow us to exclude their participation in the expression of FCHL in our families, especially if their involvement is as minor susceptibility loci. The sample size may also explain the lack of evidence when testing for possible heterogeneity or interaction between these four candidate loci and the 1q21-q23 region.

During the reviewing of this manuscript, a study was published in the April issue of *Nature Genetics* by Pajukanta *et al.* (2004). In this paper the authors also rule out *TXNIP* as a candidate gene, and report association of upstream transcription factor (*USF1*), in this same region, to the FCHL phenotype and the TG trait predominantly, as is the case for this study. This supports our results, as our maximum LOD score results for this region are for marker D1S2768, which lies nearer to *USF1* than the D1S104 marker previously associated with FCHL.

In conclusion, the fact that linkage of region 1q21-q23 to FCHL has been found in populations of widely different ethnicity provides strong evidence that this region harbours a major FCHL susceptibility gene. Our results are the first report for a Latin American population, and add our cohort to those in which FCHL is linked to chromosome 1q21-q23. The overall results obtained in our study suggest genetic heterogeneity of this disorder in the Mexican population. This observation is consistent, and seems to mirror the wide variation observed in the literature, and suggests the involvement of other as yet unidentified loci in the FCHL pheno-

type. An analysis to evaluate the participation of *USF1* in a larger cohort of Mexican FCHL kindreds may prove helpful in understanding its contribution to the expression of this complex disease in our population.

Acknowledgements

We thank N. J. Cox and G. I. Bell for the critical reading of this manuscript. This work was supported by grant IN217501 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, and grant 30774 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México City. A.H.V., J. P. del R. and S.C.Q. received support through CONACYT fellowships.

References

- Aguilar-Salinas, C. A., Hugh, P., Barret, R., Pulsi, J., Zhu, X. L. & Schonfeld, G. (1997) A familial combined hyperlipidemic kindred with impaired apolipoprotein B catabolism: kinetics of apolipoprotein B during placebo and pravastatin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 72–82.
- Aguilar-Salinas, C. A., Olaiz, G., Valles, V., Torres, J. M., Gomez Perez, E. J., Rull, J. R., Rojas, R., Franco, A. & Sepulveda, J. (2001) High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* **42**, 1298–307.
- Aouizerat, B. E., Allayee, H., Cantor, R. M., Davis, R. C., Lanning, C. D., Wen, P. Z., Dallinga-Thie, G. M., Bruin, T. W., Rotter, J. I. & Lusis, A. J. (1999a) A genome scan for familial combined hyperlipidemia reveals evidence of linkage with a locus on chromosome 11. *Am J Hum Genet* **65**, 397–412.
- Aouizerat, B. E., Allayee, H., Cantor, R. M., Dallinga-Thie, G. M., Lanning, C. D., de Bruin, T. W., Lusis, A. J., & Rotter, J. I. (1999b) Linkage of a candidate gene locus to familial combined hyperlipidemia: lecithin:cholesterol acyltransferase on 16q. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 2730–2736.
- Ayyobi, A. F., McGladdery, S. H., McNeely, M. J., Austin, M. A., Motulsky, A. G. & Brunzell, J. D. (2003) Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1289–1294.
- Bodnar, J. S., Chatterjee, A., Castellani, L. W., Ross, D. A., Ohmen, J., Cavalcoli, J., Wu, C., Dains, K. M., Catanesi, J., Chu, M., Sheth, S. S., Charugundla, K., Demant, P., West, D. B., de Jong, P. & Lusis, A. J. (2002) Positional cloning

- of the the combined hyperlipidemia gene Hyplip1. *Nature Genet* **30**, 110–116.
- Bredie, S. J., Demacker, P. N. & Stalenhoef, A. F. (1997) Metabolic and genetic aspects of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on low-density lipoprotein heterogeneity. *Eur J Clin Invest* **27**, 802–811.
- Brunzell, J. D., Albers, J. J., Chait, A., Grundy, S. M., Groszek, E. & McDonald, G. B. (1983) Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* **24**, 147–155.
- Buffone, G. J. & Darlington, G. J. (1985) Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol. *Clin Chem* **31**, 164–165.
- Castellani, L. W., Weinreb, A., Bodnar, J., Goto, A. M., Doolittle, M., Demant, P. & Lusis, A. J. (1998) Mapping a gene for combined hyperlipidaemia in a mutant mouse strain. *Nature Genet* **18**, 374–377.
- Castro-Cabezas, M., de Bruin, T. W. A. & Erkelens, D. W. (1992) Familial combined hyperlipidemia: 1973–1991. *Neth J Med* **40**, 83–95.
- Coon, H., Myers, R. H., Borecki, I. B., Arnett, D. K., Hunt, S. C., Province, M. A., Djousse, L. & Leppert, M. F. (2000) Replication of linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q with additional heterogeneous effect of apolipoprotein AII/CI/III/AIV locus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2275–2280.
- Cullen, P., Farren, B., Scott, J. & Farrall, M. (1994) Complex segregation analysis provides evidence for a major gene acting on serum triglyceride levels in 55 British families with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* **14**, 1687–1694.
- Dallinga-Thie, G. M., van Linde-Sibenius, T. M., Rotter, J. L., Cantor, R. M., Bu, X. D., Lusis, A. J. & de Bruin, T. W. A. (1997) Complex genetic contribution of the apoAII-CIII-AIV gene cluster to familial combined hyperlipidemia. Identification of different susceptibility haplotypes. *J Clin Invest* **99**, 953–961.
- Deeb, S. S., Nevin, D. N., Iwasaki, L. & Brunzell, J. D. (1996) Two novel apolipoprotein A-IV variants in individuals with familial combined hyperlipidemia and diminished levels of lipoprotein lipase activity. *Hum Mutat* **8**, 319–325.
- Eckel, R. H. (2001) Familial combined hyperlipidemia and insulin resistance: distant relatives linked by intra-abdominal fat? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 469–470.
- Eichenbaum-Voline, S., Olivier, M., Jones, E. L., Naoumova, R. P., Jones, B., Gau, B., Patel, H. N., Seed, M., Betteridge, J. B., Galton, D. J., Rubin, E. M., Scott, J., Shoulders, C. C. & Pennacchio, L. A. (2003) Linkage and Association Between Distinct Variants of the APOA1/C3/A4/A5 Gene Cluster and Familial Combined Hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 167–174.
- Friedewald, W. T., Levy, I. R. & Fredrickson, D. S. (1972) Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without the use of the ultracentrifuge. *Clin Chem* **18**, 449–502.
- Goldstein, J. L., Schrott, H. G. & Hazzard, W. R., Bierman, E. L., Motulsky, A. G. (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.
- Grundy, S. M., Chait, J. & Brunzell, J. D. (1987) Familial combined hyperlipidemia workshop. *Arteriosclerosis* **7**, 203–207.
- Hoffer, M. J., Bredie, S. J., Boomsma, D. I., Reymers, P. W., Kastgelein, J. J., de Knijff, P., Demacker, P. N., Stalenhoef, A. F., Havekes, L. M. & Frants, R. R. (1996) The lipoprotein lipase (Asn291Ser) mutation is associated with elevated lipid levels in families with familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* **119**, 159–167.
- Kane, J. P. & Havel, R. J. (2001) Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In: R. SC, Beaudet, A. L., Sly, W. S. & Valle, D. (eds). *The Metabolism and Molecular Bases of Inherited Disease*, New York, NY: McGraw Hill, p.p. 2717–2752.
- Kong, A. & Cox, N. J. (1997) Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet* **61**, 1179–1188.
- Mailly, F. & Tugrul, Y., Reyme, P. W., Bruin, T., Seed, M., Groenemeyer, B. F., Asplund-Carlson, A., Vallance, D., Winder, A. F., Miller, G. J. (1995) A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9Asn): functional implications and prevalence in normal and hyperlipidemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 468–478.
- Naoumova, R. P., Bonney, S. A., Eichenbaum-Voline, S., Patel, H. N., Jones, B., Jones, E. L., Amey, J., Colilla, S., Neuwirth, C. K., Y. Allotey, R., Seed, M., Betteridge, J. B., Galton, D. J., Cox, N. J., Bell, G. I., Scott, J. & Shoulders, C. C. (2003) Confirmed Locus on Chromosome 11p and Candidate Loci on 6q and 8p for the Triglyceride and Cholesterol Traits of Combined Hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 2070–2076.
- Nikkila, E. A. & Aro, A. (1973) Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet* **1**, 954–9549.
- Pajukanta, P., Nuotio, I., Terwiller, J. D., Porkka, K. V. K., Ylitalo, K., Pihlajamäki, J., Suomalainen, A. J., Syvanen, A. C., Lehtimäki, T., Viikari, J. S. A., Laakso, M., Taskinen, M. R., Ehnholm & Peltonen, L. (1998) Linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21–q23. *Nature Genet* **18**, 369–373.
- Pajukanta, P., Terwiller, J. D., Perola, M., Hiekkalinna, T., Nuotio, I., Ellonen, P., Parkkonen, M., Harttala, J., Ylitalo, K., Pihlajamäki, J., Porkka, K., Laakso, M., Viikari, J., Ehnholm, C., Taskinen, M. E. & Peltonen, L. (1999) Genome-wide scan for familial combined hyperlipidemia

- genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet.* **64**, 1453–1463.
- Pajukanta, P., Lilja, H. E., Sinheimer, J. S., Cantor, R. M., Lusa, A. J., Gentile, M., Duan, X. J., Soro-Paavonen, A., Naukkarinen, J., Saarela, J., Laakso, M., Ehnholm, C., Taskinen, M. R. & Peltonen, L. (2004) Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet* **36**(4): 371–376.
- Pei, W., Baron, H., Muller-Myhsok, B., Knoblauch, H., Al-Yahyaee, S. A., Hui, R., Wu, X., Liu, L., Busjahn, A., Luft, F. C. & Schuster, H. (2000) Support for linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families. *Clin Genet* **57**, 29–34.
- Purnell, J. Q., Kahn, S. E., Schwartz, R. S. & Brunzell, J. D. (2001) Relationship of insulin sensitivity and ApoB levels to intra-abdominal fat in subjects with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 567–572.
- Reymer, P. W., Groenemeyer, B. E., Gagne, E., Miao, L., Appelman, E. E., Seidel, J. C., Kromhout, D., Bijvoet, S. M., van de Oever, K. & de Bruin, T. W. A. (1995) A frequently occurring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn291Ser) contributes to the expression of familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet* **4**, 1543–1549.
- Soro, A., Jauhiainen, M., Ehnholm, C. & Taskinen, M. R. (2003) Determinants of low HDL levels in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* **44**, 1536–1544.
- Strauch, K., Fimmers, R., Kurz, T., Deichmann, K. A., Wienker, T. F. & Baur, M. P. (2000) Parametric and Non-parametric Multipoint Linkage Analysis with Imprinting and Two-Locus-Trait Models: Application to Mite Sensitization. *Am J Hum Genet* **66**, 1945–1957.
- Valles, V., Aguilar-Salinas, C. A., Gómez Pérez, F. J. & Rojas, R. (2002) Apolipoprotein B and A-I Distribution in Mexican Urban Adults: Results of a Nationwide Survey. *Metabolism* **51**, 560–568.
- Wijsman, E. M., Brunzell, J. D., Jarvik, G. P., Austin, M. A., Motulsky, A. G. & Deeb, S. S. (1998) Evidence against linkage of familial combined hyperlipidemia to the apolipoprotein A1-CIII-AIV gene complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 215–226.
- Wojciechowski, A. P., Farrall, M., Cullen, P., Wilson, T. M., Bayliss, J. D., Farren, B., Griffin, B. A., Caslake, M. J., Packard, C. J. & Shepard, J. (1991) Familial combined hyperlipidemia linked to the apolipoprotein A1-CIII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature* **349**, 161–164.
- Yang, W. S., Nevin, D. N., Peng, R., Brunzell, J. D. & Deeb, S. S. (1995) A mutation in the promoter of the lipoprotein lipase (LPL) gene in a patient with familial combined hyperlipidemia and low LPL activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4462–4466.

Received: 18 March 2004

Accepted: 22 April 2004

Familial Combined Hyperlipidemia in Mexicans

Association With Upstream Transcription Factor 1 and Linkage on Chromosome 16q24.1

Adriana Huertas-Vazquez, Carlos Aguilar-Salinas, Aldons J. Lusis, Rita M. Cantor, Samuel Canizales-Quinteros, Jenny C. Lee, Lizzette Mariana-Nuñez, Roopa-Metha, Laura Riba-Ramirez, Anne Jokiaho, Teresa Tusie-Luna, and Päivi Pajukanta

Objective—To investigate the largely unknown genetic component of the common lipid disorder, familial combined hyperlipidemia (FCHL) in Mexicans, we analyzed the upstream transcription factor 1 (*USF1*) gene that was recently associated with FCHL and high triglycerides (TG) in Finns. We also analyzed the Mexican FCHL families for 26 microsatellite markers residing in the seven chromosomal regions on 2p25.1, 9p23, 10q11.23, 11q13, 16q24.1, 19q13, and 21q21, previously linked to FCHL in Whites.

Methods and Results—We genotyped 314 individuals in 24 Mexican families for 13 SNPs spanning an 88-kb region, including *USF1*. The FCHL and TG traits showed significant evidence for association with 3 SNPs, hCV1459766, rs3737787, and rs2073658, and haplotype analyses further supported these findings (probability values of 0.05 to 0.0009 for SNPs and their haplotypes). Of these SNPs, hCV1459766 is located in the F11 receptor (*F11R*) gene, located next to *USF1*, making it difficult to exclude. Importantly, the association was restricted to a considerably smaller region than in the Finns (14 kb versus 46 kb), possibly because of a different underlying linkage disequilibrium structure. In addition, 1 of the 7 regions, 16q24.1, showed suggestive evidence for linkage (a lod score of 2.6) for total cholesterol in Mexicans.

Conclusions—This study, the first to extensively investigate the genetic component of the common FCHL disorder in Mexicans, provides independent evidence for the role of *USF1* in FCHL in an outbred population and links the 16q24.1 region to an FCHL-component trait in Mexicans. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:0-0.)

Key Words: familial combined hyperlipidemia ■ *USF1* gene ■ complex traits ■ Mexican population ■ coronary heart disease

Familial combined hyperlipidemia (FCHL) is a common heterogeneous disorder, characterized by the presence of multiple lipoprotein phenotypes that increase the risk of premature coronary heart disease (CHD).¹ Families with this condition typically exhibit a mixed pattern of lipid abnormalities, with one or more family members affected by high levels of serum total cholesterol (TC) and/or triglycerides (TG). FCHL profiles are often associated with elevated apolipoprotein B (apoB) levels and with an unfavorable decrease in serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels.²⁻⁴ Although it has been evident for 30 years that FCHL has a strong genetic component,¹ DNA sequence variants contributing to FCHL and its component traits are largely unknown, especially regarding the prevalence of variants with major effects.

Several genetic studies have been conducted in various ethnic groups to identify susceptibility genes for FCHL and its component traits.⁴⁻¹¹ Evidence for a major FCHL locus was first found on chromosome 1q21-q23 in Finns,⁵ and subsequent replications were observed in US, German, Chinese, and Dutch populations.⁹⁻¹¹ Linkage to the 1q21-23 region has also been replicated in 7 extended Mexican families.¹² These 7 families comprise a portion of the samples investigated in this present study. Recently, Pajukanta et al (2004)¹³ reported that FCHL is linked and associated with the gene encoding the upstream transcription factor 1 (*USF1*) on chromosome 1q21. *USF1* is the first major gene implicated in FCHL.

The ubiquitously expressed *USF* proteins are members of the basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLH-zip)

Original received February 25, 2005; final version accepted June 6, 2005.

From the Unidad de Biología (A.H.-V., S.C.-Q., L.R.-R., T.T.-L.), Molecular y Medicina Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico; the Department of Human Genetics (A.H.-V., A.J.L., R.M.C., J.C.L., A.J., P.P.), David Geffen School of Medicine at UCLA, University of California, Los Angeles; and the Department of Endocrinology and Metabolism (C.A.-S., L.M.-N., R.M.), Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico.

Correspondence to Päivi Pajukanta, MD, PhD, Department of Human Genetics, David Geffen School of Medicine at UCLA, Gonda Center, Room 5309A, 695 Charles E. Young Drive South, Los Angeles, California 90095-7088. E-mail ppajukanta@mednet.ucla.edu

© 2005 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://www.atvbaha.org>

DOI: 10.1161/01.ATV.0000175297.37214.a0

TABLE 1A. Phenotypic Characteristics of Family Members Included in the Study

	FCHL Affected M/F*	Unaffected Family Members M/F	Spouses M/F	FCHL Probands M/F
No.	144 (54/90)	123 (59/64)	32 (17/15)	24 (12/12)
Age, years	42.0±12.7/51.2±15.4	39.4±17.2/37.1±17.6	49.5±11.0/47.4±9.5	53.4±12.2/58.7±14.1
BMI, kg/m ²	26.6±3.8/27.4±3.2	23.9±4.6/24.1±3.6	26.0±1.8/26.5±3.4	26.8±3.3/27.1±5.9
TC, mmol/L	6.7±0.6/7.0±0.8	5.4±0.8/5.4±0.9	4.8±1.0/5.1±0.9	6.5±0.6/7.3±1.4
TG, mmol/L	4.4±1.0/4.1±1.0	1.5±0.3/1.7±0.9	2.4±1.0/1.3±0.9	4.1±0.7/4.1±0.6
HDL-C, mmol/L	0.9±0.2/1.0±0.2	1.2±0.5/1.5±0.7	0.9±0.2/1.3±0.6	0.9±0.1/0.9±0.2
apoB, mg/dL	122.8±27.5/129.5±26.0	90.2±30.3/87.7±27.6	99.0±27.3/88.2±24.3	127.6±16.0/135.9±23.5
Glucose, mmol/L	4.8±1.4/4.9±1.3	4.7±0.9/4.9±0.8	4.7±0.7/4.9±1.2	4.9±1.3/5.0±0.7

Values are mean±SD. Lipid measurements were available for 314 individuals. M/F indicates male/female; BMI, body mass index; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL-C, HDL-cholesterol; apoB, apolipoprotein B.

*FCHL status: TG and/or TC≥90th age/sex-specific Mexican population percentile.

family of transcription factors, and *USF1* is known to control expression of several genes involved in glucose and lipid metabolism.^{14,15} Variation in *USF1* has been shown to influence features of glucose and lipid homeostasis in the EARS II offspring study.¹⁶ Recently *USF1* was also shown to stimulate apolipoprotein A-V (*APOA5*) promoter activity in an insulin-dependent manner, demonstrated by the reduced binding of *USF1* to the *APOA5* promoter in the presence of insulin.¹⁷ This connection between *APOA5* and *USF1* is especially noteworthy because variants of *APOA5* have been linked to high TGs in both the general population¹⁸ and in FCHL.^{19–21} However, additional studies are warranted to replicate the role of *USF1* in FCHL families originating from other populations

than the genetically homogeneous Finns to confirm that *USF1* alleles truly have relevance for FCHL. In the present study, we investigated the *USF1* gene on 1q21 in the more outbred population of Mexico. Previous studies have clearly demonstrated that the Mexican population has an increased predisposition to mixed dyslipidemias, including FCHL.^{22–24} However, this population has been under-investigated for the genetic factors conferring this susceptibility.

It is likely that alleles of multiple genes contribute to the complex FCHL phenotype. In fact, genome-wide scans have identified several chromosomal loci for FCHL and its component traits in Caucasian families with FCHL.^{6–8,25,26} Loci on chromosomes 1q21, 2q31, 10p11, 10q11, 16q, and 21q21 were identified in the Finnish FCHL families;^{5–6,26} loci on chromosomes 2p, 11p, 16q, and 19q in the Dutch FCHL families;^{7,8} and loci on 6q, 8p, and 11p in the British FCHL families,²⁵ respectively. Therefore, we also analyzed the Mexican FCHL families for peak markers of 7 regions identified in the previous genome scans of Caucasian FCHL families.

Methods

Subjects and Clinical Features

A total of 24 extended Mexican FCHL families with a history of premature CHD were included in this study, comprising 314 family members (Table 1a and 1b). These families were recruited in the Lipid Clinic of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) in Mexico City. The ethnicity and race of these subjects reflect the general population of Mexico. Thus, the race of all of these subjects is Mestizos who are a mixture of American Indian and white. Inclusion criteria for the probands were as follows: Elevated levels of serum TGs (≥the 90th age/sex-specific Mexican population percentile) and/or elevated levels of serum TC (≥the 90th percentile) and elevated levels of serum apoB (≥the 90th percentile). The positive family history of premature CHD before the age of 60 years was defined as the manifestation of myocardial infarction either in the proband or a first-degree relative of the proband. The age/sex-specific population percentiles for lipids were based on a previous survey of the Mexican population.²³ In addition, at least 1 first-degree relative had a phenotype of high TC (≥the 90th percentile) or high TGs (≥the 90th percentile) different from that of the proband. Exclusion criteria for the probands were tendon xanthomas, renal disease, and thyroid disorders. All subjects completed a questionnaire about their medical history, medica-

TABLE 1B. Structure of the 24 Mexican Families With FCHL

Individuals With DNA available (M/F)	314 (147/167)
Probands (M/F)	24 (12/12)
Family structure	
No. of families with 2 generations*	5
No. of families with 3 generations	13
No. of families with 4 generations	6
No. of families with less than 5 affecteds	8
No. of families with 5 affecteds	6
No. of families with more than 5 affecteds†	10
No. of affected subjects (M/F)	
No. of independent affected sib-pairs	
TG≥90th percentile (M/F)	56 (24/32)/39
TC≥90th percentile (M/F)	88 (30/58)/65
Combined 2B phenotype (M/F) ‡	34 (10/24)/18
HDL-C≤10 th percentile (M/F)	20 (1/8)/4
FCHL§	144 (54/90)/96

M/F indicates male/female; TG, triglycerides; TC, total cholesterol; HDL-C, HDL cholesterol.

*The No. of genotyped generations with affected and unaffected individuals; †The maximum No. of affected subjects was 14; ‡Combined 2B phenotype: TC and TG≥90th age/sex-specific Mexican population percentile; §FCHL: TG and/or TC≥90th age/sex-specific Mexican population percentile. In addition, there are 198 nonindependent avuncular affected pairs and 127 nonindependent cousin affected pairs for FCHL in these families.

tion, as well as smoking and drinking habits. Body mass index (BMI) was determined for all subjects. Each subject provided a written informed consent. The protocol for this study was approved by the Institutional Committee of Biomedical Research in Humans of the INCMNSZ.

Laboratory Analytical Methods

All lipid levels for affected individuals were measured before treatment. The measurements were performed with commercially available standardized methods. Glucose was measured using the glucose oxidase method; serum TC and TGs were measured using an enzymatic method (SERA-PAK®); HDL-C levels were assessed using phosphotungstic acid and Mg²⁺; LDL-C concentrations were estimated by the Friedewald formula,²⁷ and plasma apoB measurements were obtained using a commercially available assay (Beckman).

Genotyping

We genotyped 314 individuals from the 24 families for 13 SNPs, spanning *USF1* and the 2 genes flanking *USF1*, *F11 receptor* (*F11R*), and a hypothetical gene LOC257106. Eight of these SNPs were reported previously.¹³ Five additional SNPs (rs1023115, rs1240334, rs2481084, rs2774279, and rs3813610) were selected from the dbSNP database. The SNPs were genotyped using the pyrosequencing technique on the automated PSQ HS96A platform. We genotyped 26 peak microsatellite markers for the previously linked regions on 2p25.1, 9p23, 10q11.23, 11q13, 16q24.1, 19q13, and 21q21.^{6-8,26} using the ABI Prism 3700 DNA Analyzer and the Genotyping 3.7 software.

Statistical Analysis

Because of the acknowledged difficulties to replicate results obtained in genetic analyses of complex traits, we used the same diagnostic criteria, the same methods, and the same markers as described previously with the *USF1* gene and Dutch and Finnish genome scans.^{5-7,13,26} Accordingly,¹³ we tested the SNPs for association using the haplotype-based haplotype risk (HHR),²⁸ family-based association (FBAT),²⁹ and gamete competition³⁰ tests. The HHR tests the homogeneity of marker allele distributions between transmitted and nontransmitted alleles, extracting information also from homozygous parents. The FBAT option -o assesses not only preferential transmission of susceptibility haplotypes to affecteds but also less preferential transmissions to unaffecteds, capturing additional information in these extended Mexican families. The FBAT (and HBAT for haplotypes) option -e leads to a test of association given linkage and thus allows for the association analysis of multiple affected individuals in the presence of linkage. The HBAT option -e was used for the

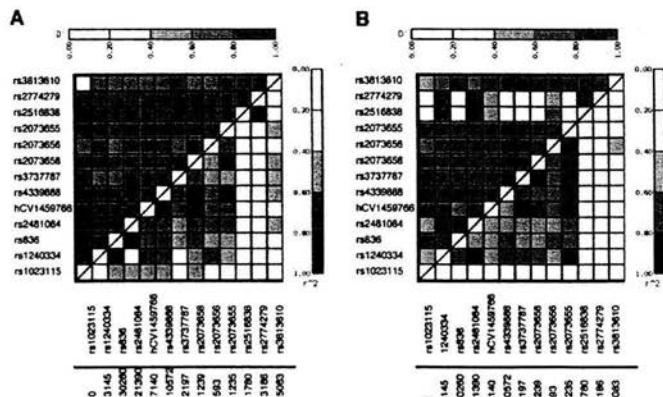
haplotype analysis of the SNPs. Although the FBAT -e (and HBAT -e) allows assessment of association given linkage, the pedigrees are trimmed to nuclear families and only a subset of the data are used, reducing power. Therefore, the gamete competition test that makes effective use of full pedigree data was applied. It is, however, not a test of pure association because it has the null hypothesis of no association and no linkage, and thus, linkage to the tested locus contributes to the observed probability value.

Two traits, high TG and FCHL, associated in the previous study¹³ were tested. The affection status for these traits was defined using the 90th Mexican age/sex-specific population percentiles of TC and TGs (the FCHL trait) and the 90th age/sex-specific percentiles of TGs (the high TG trait). The extent of pairwise linkage disequilibrium (LD) between the marker genotypes was tested using the JLIN: JAVA LD PLOTTER program available online (<http://www.genepi.com.au/project/jlin>).

For linkage analysis of microsatellite markers, we carried out the same parametric and nonparametric 2-point analyses as were used previously^{5-7,13,26} with the MLINK program of the LINKAGE package and the SIBPAIR program, as implemented in the ANALYZE package.³¹ We assumed a disease allele frequency of 0.006 under the dominant mode of inheritance and 0.1095 under the recessive mode of inheritance.^{5-7,13,26} Linkage analyses of the microsatellite markers were performed for the dichotomized FCHL, TG, TC, and low HDL-C traits, as described previously.^{5-7,26} Allele frequencies were estimated from all individuals using the DOWNFREQ program.³² The PedCheck program was used to assess the genotype data for pedigree inconsistencies.³³ The multipoint analyses for 16q24.1 and 10q11.23 were performed using the GENEHUNTER program.³⁴

Statistical Significance

We performed 2 classes of analyses. In the study of *USF1*, two traits were tested for association with 13 SNPs. The Bonferroni correction for the probability values obtained in these analyses can be considered overly conservative, because we investigate highly correlated SNPs and traits. We are conducting the same analyses seen in Pajukanta et al¹³ and are examining the results in aggregate to see if a similar pattern of linkage and association is observed in the Mexican FCHL families. Thus, we are expecting significant evidence of linkage and association with additional evidence of just association for the 6 previously associated SNPs. An additional 7 SNPs were genotyped to help restrict the associated region. Thus, in these analyses, we are reporting a probability value of 0.05 or less. In the linkage study, 7 previously identified chromosomal regions were tested for linkage with 4 correlated traits. When evaluating these linkage results, we used the previous guidelines for suggestive and significant evidence of linkage.³⁵



Localization (in bp) of the SNPs and the pairwise LD between SNPs. a, LD between markers tested in probands. b, LD between markers tested in spouses. D' is shown in the top left-hand triangle of the display. The scale for D' is presented at the top. r2 is shown in the bottom right-hand triangle. The scale for r2 is presented on the right-hand side.

TABLE 2A. Association Analyses of Individual SNPs in the *F11R-USF1* Region for the TG and FCHL Traits

Gene	rs Number for the SNP	SNP Type	Distance Between SNPs (bp)	Het/Freq	Triglycerides			FCHL		
					HHRR	Gamete	FBAT	HHRR	Gamete	FBAT
					<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
							-o -e			-o -e
IG	rs1023115	IG	3,145	0.50/0.48						
IG	rs1240334	IG	30,260	0.40/0.28						
F11R	rs836 (f11rs1)§	3'UTR	21,390	0.37/0.25						
F11R	rs2481084	I	7,140	0.41/0.28						
F11R	hCV1459766 (f11rs4)§	I	10,572	0.34/0.21	0.02	0.002	0.001 0.04		0.01	0.006
F11R	rs4339888 (f11rs5)§	3'UTR	2,197	0.35/0.22						
USF1	rs3737787 (usf1s1)§	E	1,239	0.35/0.22		0.005	0.005 0.02	0.05	0.01	0.02 0.05
USF1	rs2073658 (usf1s2)§	I	593	0.35/0.22	0.04	0.003	0.001		0.05	
USF1	rs2073656	I	1,235	0.38/0.26						
USF1	rs2073655	I	1,780	0.34/0.22						
USF1	rs2516838 (usf1s8)§	5'UTR	3,186	0.22/0.12						
LOC257106	rs2774279	C-S	5,083	0.21/0.12						
LOC257106	rs3813610	I		0.46/0.36						

All results represent *P* values; **P* values for association with the HHRR test; †*P* values for linkage and association with the gamete competition test; and ‡*P* values with the FBAT test using the options -o and -e, respectively (for differences in these test statistics, see methods). Analyses for cells left blank resulted in *P* values >0.05. Het/Freq indicates heterogeneity/allele frequency; E, exonic; C-S, coding-synonymous; I, intronic; IG, intergenic; ITLN2, Intelectin 2 gene; F11R, F11R receptor gene; USF1, upstream transcription factor 1 gene; LOC257106, hypothetical protein LOC257106.

§The SNPs associated in Finns and the symbol used for these SNPs previously.¹³ ||SNP identified by sequencing previously.¹³ The distances between the SNPs are from the UCSC Genome Browser.

Results

To investigate the underlying genetic component for FCHL within the *USF1* region in the Mexican population, we genotyped a total of 13 SNPs spanning an 88-kb region, including three genes, *USF1*, *F11 receptor (F11R)*, and hypothetical gene LOC257106 (Table 2a). The *F11R* and hypothetical gene LOC257106 were investigated besides *USF1* in Mexicans, because in Finns the associated region extended to an ≈46-kb region that also covered the *F11R* gene, specifically in TG-affected Finnish males.¹³

One *F11R* SNP, hCV1459766, and 2 *USF1* SNPs, rs3737787 and rs2073658, within a 14-kb region, showed evidence for association with the FCHL and TG traits (Table 2a and 2b). Specifically, the TG trait produced the most significant signal for association, resulting in probability values of 0.001, 0.005, and 0.001 for SNPs hCV1459766, rs3737787, and rs2073658, re-

spectively, when testing for linkage and association in nuclear families using the FBAT option -o (Table 2a). When testing for association and accounting for linkage using the FBAT option -e, the SNPs hCV1459766 and rs3737787 resulted in probability values of 0.04 and 0.02 (Table 2a). These results are in accordance with the results obtained when testing for linkage and association in the extended families using the gamete competition test (Table 2a). Moreover, haplotype analysis for SNPs hCV1459766-rs3737787 provided evidence of association with both traits, TGs (*P*=0.0009) and FCHL (*P*=0.02) using the HBBAT option -e (Table 2b). Although these 3 SNPs are in strong LD with one another, their pairwise *r*² measurements of 0.86 for SNPs hCV1459766 and rs3737787 in probands compared with 0.64 in spouses appears to allow for the additional evidence of association obtained by haplotype analysis. The pairwise *r*² measurement for SNPs rs3737787 and rs2073658 was 1.0 in probands and 0.73 in spouses. Interestingly, LD between the SNPs hCV1459766, rs3737787, and rs2073658 appeared thus to be tighter in probands than in spouses. The Figure shows the locations of the 13 SNPs and the pairwise LD between them separately in spouses and probands. As in the Finns,¹³ the preferentially transmitted alleles of these SNPs and their haplotypes were the major alleles (Table 2b). The haplotype of the minor alleles in turn was significantly less transmitted to the affected individuals (*P*=0.001 for TGs and *P*=0.02 for FCHL) (Table 2b). None of the other SNPs produced significant probability values. The nucleotides for minor alleles in Mexicans are shown in Supplementary Table 1 (available at the web site, <http://www.genetics.ucla.edu/labs/pajukanta/fchl/mex/>).

TABLE 2B. Haplotype Analysis for the TG and FCHL Traits

	Haplotype of SNPs hCV1459766-rs3737787		Haplotype of SNPs rs3737787-rs2073658	
	TG	FCHL	TG	FCHL
Haplotype 11	0.0009	0.02	0.006	0.03
Haplotype 22	0.001	0.02	0.02	0.06

All results represent *P* values for association with the HBBAT -e option. The segregating susceptibility haplotype was 1-1 (1 indicates the major allele) in all of the analyses above. The haplotype 2-2 (2 indicates the minor allele) was less transmitted, protective haplotype in all of the analysis above.

TABLE 3. Two-Point Linkage and ASP Analyses for Chromosome 16q24.1 with the TC Trait

Marker	Position* (cM)	LOD Score†	ASP LOD Score
D16S507	105.17	0.1 (0.3)	1.1
D16S505	108.96	0.6 (0.1)	2.6
D16S3091	111.12	0.2 (0.3)	0.0

ASP indicates affected sib-pair test.

*The position is based on the Marshfield Center for Medical Genetics Database. †Maximum LOD scores using a dominant mode of inheritance. The recombination fractions are given in parentheses.

The pedigree structure and phenotypic characteristics of the Mexican families used in the full pedigree linkage analyses are shown in Tables 1a and 1b. In 2-point linkage analyses of the 7 regions previously linked to FCHL and its component traits,^{6-8,26} we obtained maximum lod scores of 1.8 for chromosome 10q11.23 with marker D10S1772 for TGs and 2.6 for chromosome 16q24.1 with marker D16S505 for TC (Table 3). We also analyzed these 2 regions in a multipoint analysis using the GENEHUNTER software. For chromosome 16q24.1, an NPL score of 2.2 was obtained, whereas for 10q11.23, an NPL score of 0.6 was observed. Thus, no additional support was obtained for chromosome 10q11.23 in the multipoint analysis. No lod scores over 2.0 were observed for TG, FCHL, or low HDL-C in any of the investigated regions, nor for TC in the 6 remaining regions. Linkage results for all analyzed regions with the FCHL and its component traits are shown in Supplementary Table II (available at the web site, <http://www.genetics.ucla.edu/labs/pajukanta/fchl/mex/>).

Discussion

Our results taken in aggregate provide evidence that variants in *USF1* are associated with FCHL and TGs in Mexican FCHL families. The SNPs hCV1459766, rs3737787, and rs2073658 showed significant evidence for association with both traits. As in the original study,¹³ the most significant association was observed with the high TG trait. Furthermore, haplotype analysis for SNPs hCV1459766-rs3737787 showed significant evidence for association with both traits, TGs ($P=0.0009$) and FCHL ($P=0.02$). As in the Finns,¹³ the major alleles and haplotypes formed by the major alleles were associated with FCHL and TGs. Similarly, the transmission of the haplotype of minor alleles to the affected individuals was reduced. However, there were differences in these results when compared with the Finns,¹³ possibly because of a different underlying LD structure. First, the most significant evidence for association was observed with the haplotypes of the SNPs hCV1459766-rs3737787 (versus the SNPs rs3737787-rs2073658 in Finns). Second, the association was restricted to a 14-kb region in the Mexican families with FCHL when compared with the 46-kb in the TG-affected Finnish males.¹³ Third, in contrast to these Finnish results that showed extension of the associated region specifically in TG affected males, no sex-specific effects were observed in the Mexican families. Although

we cannot exclude the possibility that the relatively small sample size of this Mexican study contributes to these results, the observed results suggest that the FCHL/TG-associated region can be restricted to 14 kb between intron 7 of *USF1* (rs2073658) and intron 1 of *F11R* (hCV1459766). Thus the association evidence extends to *F11R* with the FCHL and TG traits, and we cannot genetically exclude *F11R* as an underlying gene for FCHL. However, the known functions of *F11R*, mainly associated with T-cell migration and epithelial tight junction formation,³⁶ make it a substantially less likely candidate for FCHL than *USF1*.

None of the associated SNPs in the Finns or Mexicans result in an amino acid change, and in sequence analyses of the Finnish probands, no missense or nonsense variants were identified in *USF1*.¹³ Therefore, restriction of the associated region by 70% in these Mexican families makes the possibility for functional analysis of these variants considerably more feasible because a shorter region with fewer variants is now available for these analyses. This conclusion is also supported by the differences we observed in the LD structure between probands and spouses in the Mexican families.

In spite of the compelling evidence for the replication of the original association in the Mexican population, it is important to emphasize the need to sequence the *USF1* and *F11R* genes in the Mexicans in future studies. We could fail to detect additional, possibly even coding variants that are associated in the Mexican population, as well as important differences in LD structure and allelic heterogeneity. Therefore, a gene-based approach that considers all common variations within a gene jointly is needed to resolve the possible inconsistencies arising from population differences.³⁷

Here we also report a region on chromosome 16q24.1 to show suggestive evidence for linkage with TC in the Mexican families. Previous data from a combined analysis of the Dutch and Finnish genome-wide scans for FCHL provided evidence that the 16q24.1 region is linked to low HDL-C,⁷ producing a parametric multipoint LOD score of 3.6 for the low HDL-C trait. Importantly, this region on 16q24.1 has also been linked to HDL-C in an independent study of Mexican Americans.³⁸ In the combined analysis of the Dutch and Finnish FCHL families,⁷ the maximum 2-point LOD score of 2.0 was obtained with marker D16S505 for low HDL-C; whereas for TC, the adjacent marker D16S3091 (2.1 cM apart) produced the highest 2-point LOD score of 1.6. Interestingly, the TC trait produced the highest evidence for linkage in the Mexican FCHL families, resulting in a 2-point ASP LOD score of 2.6 with marker D16S505 and a multipoint NPL score of 2.2. Although the maximum LOD scores for this region on 16q24.1 were observed for different traits in the Mexicans than in the Finns and Dutch, we assume that the complexity of the genetic and environmental processes that regulate the expression of the complex FCHL phenotypes in each population contributes to this difference.

Several studies have demonstrated that the Mexican population has a high genetic predisposition to the type 2

diabetes mellitus, metabolic syndrome, and some primary forms of dyslipidemias.²²⁻²⁴ In Mexicans, at age 50, 27.6% of men and 21% of women exhibit mixed dyslipidemia.²³ These data suggest that the most common causes of mixed dyslipidemias, such as type 2 diabetes mellitus and FCHL, are common abnormalities in the Mexican population. Therefore, it is critical to identify genetic variants that confer susceptibility to high serum lipid levels in this population. The present study is the first report to extensively investigate the genetic component of the common FCHL disorder in the Mexican population.

Acknowledgments

This research was supported by the UC-MEXUS CONACYT grant, National Institutes of Health grants HL-28481 and HL-70150, as well as American Heart Association grant 0430180N. A.H.V. received support through CONACYT fellowship. We thank the family members for participating in this study. We thank S. Ramirez and M. Rodriguez for technical support.

References

- Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. 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.* 1973;52:1544-1568.
- Brunzell JD, Albers JJ, Chait A, Grundy SM, Grosszek E, McDonald GB. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res.* 1983;24:147-155.
- Soro A, Jauhainen M, Ehnholm C, Taskinen. Determinants of low HDL levels in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2003;44:1536-1544.
- Wojciechowski AP, Farrall M, Cullen P, Wilson TM, Bayliss JD, Farren B, Griffin BA, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Familial combined hyperlipidaemia linked to the apolipoprotein AII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature.* 1991;349:161-164.
- Pajukanta P, Nuoio I, Terwilliger JD, Porkka KV, Ylitalo K, Pihlajamäki J, Suomalainen AJ, Syvänen AC, Lehtimäki T, Viikari JS, Laakso M, Taskinen MR, Ehnholm C, Peltonen L. Linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet.* 1998;18:369-373.
- Pajukanta P, Terwilliger JD, Perola M, Hiekkalinna T, Nuoio I, Ehnholm C, Parkkinen M, Harttala J, Ylitalo K, Pihlajamäki J, Porkka K, Laakso M, Viikari J, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L. Genomewide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet.* 1999;64:1453-1463.
- Pajukanta P, Allayee H, Krass KL, Kuraishy A, Soro A, Lilja HE, Mar R, Taskinen MR, Nuoio I, Laakso M, Rotter JJ, de Bruin TW, Cantor RM, Lusa AJ, Peltonen L. Combined analysis of genome scans of dutch and finnish families reveals a susceptibility locus for high-density lipoprotein cholesterol on chromosome 16q. *Am J Hum Genet.* 2003;72:903-917.
- Aouizerat BE, Allayee H, Cantor RM, Davis RC, Lanning CD, Wen PZ, Dallong-Thie GM, de Bruin TWA, Rotter JJ, Lusa AJ. A genome scan for familial combined hyperlipidemia reveals evidence of linkage with a locus on chromosome 11. *Am J Hum Genet.* 1999;65:397-412.
- Coon H, Myers RH, Borecki IB, Arnett DK, Hunt SC, Province MA, Djousse L, Leppert MF. Replication of linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q with additional heterogeneous effect of apolipoprotein A-I/C-III/A-IV locus: the NHLBI Family Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2275-2280.
- Pei W, Baron H, Muller-Mysok B, Knoblauch H, Al-Yahyaee SA, Hui R, Wu X, Liu L, Busjahn A, Luft FC, Schuster H. Support for linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families. *Clin Genet.* 2000;57:29-34.
- Allayee H, Krass KL, Pajukanta P, Cantor RM, van der Kallen CJ, Mar R, Rotter JJ, de Bruin TW, Peltonen L, Lusa AJ. Locus for elevated apolipoprotein B levels on chromosome 1p31 in families with familial combined hyperlipidemia. *Circ Res.* 2002;90:926-931.
- Huertas-Vazquez A, Del Rincon JP, Canizales-Quintero S, Riba L, Vega-Hernandez G, Ramirez-Jimenez S, Auron-Gomez M, Gomez-Perez FJ, Aguilar-Salinas CA, Tusie-Luna MT. Contribution of Chromosome 1q21-q23 to Familial Combined Hyperlipidemia in Mexican Families. *Ann Hum Genet.* 2004;68:419-427.
- Pajukanta P, Lilja HE, Sinheimer JS, Cantor RM, Lusa AJ, Gentile M, Duan XJ, Soro-Paavonen A, Naukkarinen J, Saarela J, Laakso M, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet.* 2004;36:371-376.
- Casado M, Vallet VS, Kahn A, Vaulont S. Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *J Biol Chem.* 1999;274:2009-2013.
- Vallet VS, Casado M, Henrion AA, Bucchini D, Raymondjean M, Kahn A, Vaulont S. Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J Biol Chem.* 1998;273:20175-20179.
- Putt W, Palmieri J, Nicoud V, Tregouet DA, Tahiri-Daizadeh N, Flavell DM, Humphries SE, Talmud PJ, EARSII group. Variation in USF1 shows haplotype effects, gene: gene and gene: environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II. *Hum Mol Genet.* 2004;13:1587-1597.
- Nowak M, Hellebrand-Chapman A, Jäkel H, Martin G, Duran-Sandoval D, Staels B, Rubin EM, Pennacchio LA, Taskinen MR, Fruchart-Najib J, Fruchart JC. Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein a5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor. *Mol Cell Biol.* 2005;25:1537-1548.
- Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science.* 2001;294:169-173.
- Eichenbaum-Voline S, Olivier M, Jones EL, Naoumova RP, Jones B, Gau B, Patel HN, Seed M, Betteridge DJ, Galtton DJ, Rubin EM, Scott J, Shoulders CC, Pennacchio LA. Linkage and association between distinct variants of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:167-174.
- Mar R, Pajukanta P, Allayee H, Groenendijk M, Dallong-Thie G, Krauss RM, Sinheimer JS, Cantor RM, de Bruin TW, Lusa AJ. Association of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hyperlipidemia. *Circ Res.* 2004;94:993-999.
- Ribault J, Figueroa L, Fernández-Ballart J, Vilella E, Castro Cabezas M, Masana L, Joven J. Newly identified apolipoprotein av gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. *Clinical Chemistry.* 2002;48:1597-1600.
- Stern MP, Knapp JA, Hazuda HP, Haffner SM, Patterson JK, Mitchell BD. Genetic and environmental determinants of type II diabetes in Mexican Americans. Is there a "descending limb" to the modernization/diabetes relationship? *Diabetes Care.* 1991;14:649-654.
- Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Gomez Perez FJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepulveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res.* 2001;42:1298-1307.
- Aguilar-Salinas CA, Velazquez Monroy O, Gomez-Perez FJ, Gonzalez Chavez A, Esqueda AL, Molina Cuevas V, Rull-Rodrigo JA, Tapia Conyer R. Encuesta Nacional de Salud 2000 Group characteristics of patients with type 2 diabetes in Mexico: results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes Care.* 2003;26:2021-2026.
- Naoumova RP, Bonney SA, Eichenbaum-Voline S, Patel HN, Jones B, Jones EL, Amey J, Colilla S, Neuwirth CK, Allotey R, Seed M, Betteridge DJ, Galtton DJ, Cox NJ, Bell GI, Scott J, Shoulders CC. Confirmed locus on chromosome 11p and candidate loci on 6q and 8p for the triglyceride and cholesterol traits of combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2070-2077.
- Soro A, Pajukanta P, Lilja HE, Ylitalo K, Hiekkalinna T, Perola M, Cantor RM, Viikari JS, Taskinen MR, Peltonen L. Genome scans provide evidence for low-HDL-C loci on chromosomes 8q23,

- 16q24.1-24.2, and 20q13.11 in Finnish families. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1333-1340.
27. Friedewald WT, Levy IR, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without the use of the ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:449-502.
 28. Terwilliger JD, Ott J. A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. *Hum Hered.* 1992;42:337-346.
 29. Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol.* 2000;19:S36-S42.
 30. Sinsheimer JS, Blangero J, Lange K. Gamete competition models. *Am J Hum Genet.* 2000;66:1168-1172.
 31. Göring HH, Terwilliger JD. Gene mapping in the 20th and 21st centuries: statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum Biol.* 2000;72:63-132.
 32. Göring HH, Terwilliger JD. Linkage analysis in the presence of errors III: marker loci and their map as nuisance parameters. *Am J Hum Genet.* 2000;66:1298-1309.
 33. O'Connell JR, Weeks DE. PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet.* 1998;63:259-266.
 34. Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Related Articles, Links Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet.* 1996;58:1347-1363.
 35. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet.* 1995;11:241-247.
 36. Ostermann G, Weber KS, Zernecke A, Schroder A, Weber C. JAM-1 is a ligand of the β_2 integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol.* 2002;3:151-158.
 37. Neale BM, Sham PC. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet.* 2004;75:353-362.
 38. Mahaney MC, Almasy L, Rainwater DL, VandeBerg JL, Cole SA, Hixson JE, Blangero J, MacCluer JW. A quantitative trait locus on chromosome 16q influences variation in plasma HDL-C levels in Mexican Americans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:339-345.