

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi

**Aspectes metabòlics i paper de l'agregat genètic Al-CIII-AIV
en la hiperlipèmia familiar combinada**

Josep Ribalta Vives

Tesi Doctoral

1997

C 1342-93360

0096-69260

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi

**Aspectes metabòlics i paper de l'agregat genètic AI-CIII-AIV
en la hiperlipèmia familiar combinada**

T 100

Josep Ribalta Vives

Tesi Doctoral

1997

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
BIBLIOTECA



1700130191



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

CARRER SANT LLORENÇ, 21
TEL. 977 - 75 93 00
FAX 977 - 75 93 22
43201 - REUS -

Lluís Masana Marín, Catedràtic de Medicina de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili,

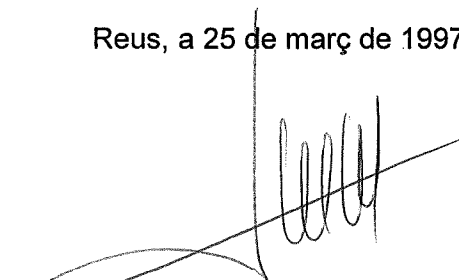
CERTIFICA :

Que Josep Ribalta Vives

ha realitzat sota la meva direcció la tesi doctoral titulada **Aspectes metabòlics i paper de l'agregat genètic AI-CIII-AIV en la hiperlipèmia familiar combinada** i que aquesta està en condicions de ser presentada per a l'obtenció del grau de Doctor.

Per a que així consti i tingui els efectes oportuns, signo la present.

Reus, a 25 de març de 1997



Prof. Lluís Masana Marín





UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

CARRER SANT LLORENÇ, 21
TEL. 977 - 75 93 00
FAX 977 - 75 93 22
43201 - REUS -

José Luis Paternain Suberviola, Professor Titular de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICA :

Que Josep Ribalta Vives

ha treballat sota la meva tutoria la Tesi Doctoral que porta per títol **Aspectes metabòlics i paper de l'agregat genètic AI-CIII-AIV en la hiperlipèmia familiar combinada** i que està en condicions de ser presentada per a l'obtenció del grau de Doctor.

Ho certifico a Reus el 25 de març de 1997.

Dr. José Luis Paternain Suberviola



A l'Elisabet i en Joan

Agraïments

A la Núria i en Josep, els meus pares, que sempre m'han donat prou llibertat per equivocar-me i aprendre.

Al professor Lluís Masana, perquè es un plaer treballar amb algú que creu en la recerca i en el seu equip. M'ha ensenyat a no oblidar que darrera de les xifres hi ha una malaltia i un malalt.

A la Merche Heras i a la Dra. Agnes La Ville perquè són la veritable garantia de qualitat de les anàlisis d'aquest estudi. Sense elles aquest treball no hauria estat possible.

Al Dr. Peter R Turner per haver pensat en mi l'any 1990. D'ell he après moltes coses, algunes de tant importants com llegir i escriure.

Al Jimmy Vallvé i la Josefa Girona per la generositat amb que m'han ofert la seva col·laboració en tot moment. A la Sílvia Olivé que s'ha preocupat dels meus nivells de sucre en sang. Ells són els millors companys de laboratori. Són "*estupendus*".

A la Dra. Rosa Solà, pels seus consells i, sobretot, perquè quan cal un cop de mà ella sempre hi és.

Als Drs. Núria Plana, Pilar Sardà i Carlos Alonso Villaverde per la seva col·laboració en la selecció dels pacients i la recollida de mostres.

Al professor Steve Humphries i a la Dra. Philippa Talmud per la seva hospitalitat i pels seus consells en relació a les anàlisis genètiques.

A la Dra. Fanli Xu per la seva paciència durant el meu aprenentatge de les tècniques de biologia molecular i per la seva deliciosa companyia.

A l'Alexandre Xifró i al Dr. Joan Fernández que són capaços de fer que l'estadística sigui una eina i no pas un enemic.

Al Dr. Jordi Balanyà i a en Quim Margalef pel seu ajut i estímul durant els inicis d'aquest estudi.

A les famílies Vilella, Olivé, Vallvé, Girona, Plana, Garcia, Nogués, Masana, Giralt, Solà, Labad, Polo i a L'Eva Ortoll pel seu inestimable ajut en l'obtenció dels controls.

A la Dra. Elisabet Vilella per la saludable influència que el seu inconformisme, la seva capacitat de reflexió, el seu gust per la discussió i la seva tossuderia infinita tenen sobre mi i la meva feina. Perquè creu de debò en allò de 'fer un món millor'.

De manera molt especial, als pacients i els seus familiars per la seva paciència i col·laboració.

INDEX

1. Introducció	7
1.1. La cardiopatia isquèmica, l'arteriosclerosi i les hiperlipoproteinèmies	9
1.2. Elements del transport i del metabolisme dels lípids	10
1.2.1. Lipoproteïnes	10
1.2.2. Apolipoproteïnes	13
1.2.3. Enzims i proteïnes transportadores	18
1.2.4. Receptors	21
1.3. Metabolisme de les lipoproteïnes	23
1.3.1. Transport dels lípids exògens	23
1.3.2. Transport dels triglicèrids endògens	24
1.3.3. Transport centrífug de colesterol	25
1.3.4. Transport centrípet de colesterol	26
1.4. Alteracions del metabolisme de les lipoproteïnes	27
1.5. Hiperlipèmia familiar combinada	29
1.5.1. Característiques analítiques	29
1.5.2. Característiques clíniques	31
1.5.2. Diagnòstic	33
1.5.3. Bases metabòliques	35
1.5.4. Bases genètiques	37
1.5.5. Models animals	41
2. Hipòtesi i Objectius	43
2.1. Hipòtesi	45
2.2. Objectius	45
3. Pacients i Mètodes	47
3.1. Pacients	49
3.1.1. Criteri diagnòstic.	49
3.1.2. Composició de les famílies.	51

3.2. Mètodes	60
3.2.1. Fraccionament lipoproteic. Ultracentrifugació seqüencial.	60
3.2.2. Hibridació amb oligonucleòtids específics (ASO).	63
3.2.3. Determinació de les concentracions plasmàtiques de retinol.	67
3.2.4. Determinació de l'activitat de l'enzim LCAT.	68
3.2.5. Determinació del genotip d'apo E.	70
<p>Vallvé JC, Margalef J, <u>Ribalta J</u>, Turner PR, Masana L. 1996. <i>Comparación de la determinación de genotipos y fenotipos de las isoformas de apolipoproteína E. Clin Invest Arteriosclerosis 8 : 59-65.</i></p>	
4. Resultats i Discussió	82
4.1. Resum dels Estudis	84
4.2. ESTUDI 1	89
<p>Detecció i caracterització del fenotip hiperlipèmic en infants i adolescents descendents de pacients amb hiperlipèmia familiar combinada.</p> <p><u>Ribalta J</u>, La Ville AE, Heras M, Plana N, Masana L. <i>Hiperlipèmia familiar combinada: Detección y caracterización del fenotipo hiperlipémico en niños y adolescentes. Med Clin (Barc).</i> (En premsa)</p>	
4.3. ESTUDI 2	107
<p>Estudi de la influència del gen de l'apolipoproteïna C-III sobre el perfil lipoproteic d'individus hiperlipèmics i normolipèmics pertanyents a famílies diagnosticades d'hiperlipèmia familiar combinada.</p> <p><u>Ribalta J</u>, La Ville AE, Vallvé JC, Turner PR, Humphries SE, Masana L. <i>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.</i> (En premsa)</p>	

4.4. ESTUDI 3	129
Estudi de les concentracions plasmàtiques de retinol en individus afectes d'hiperlipèmia familiar combinada.	
<u>Ribalta J</u> , La Ville AE, Girona J, Vallvé JC, Masana L. <i>Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia.</i> (En revisió pel consell editorial de la revista <i>Arch Intern Med</i>).	
4.5. ESTUDI 4	145
Estudi de les lipoproteïnes d'alta densitat i la seva relació amb l'activitat de l'enzim LCAT en pacients amb hiperlipèmia familiar combinada .	
<u>Ribalta J</u> , La Ville AE, Vallvé JC, Girona J, Masana L. <i>Lecithin :cholesterol acyltransferase activity is not altered in familial combined hyperlipidemia.</i> (En revisió pel consell editorial de la revista <i>Atherosclerosis</i>)	
4.6. Resum dels resultats	167
5. Conclusions globals	169
6. Referències bibliogràfiques	173

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La cardiopatia isquèmica, l'arteriosclerosi i les hiperlipoproteïnèmies.

Les malalties cardiovasculars són la principal causa de morbiditat i mortalitat en el món occidental. En podem destacar l'infart de miocardi, l'angina de pit i la mort sobtada. Totes aquestes patologies són el resultat d'un procés de lenta i progressiva oclusió de les artèries que s'anomena arteriosclerosi. L'inici i el desenvolupament de l'arteriosclerosi estan determinats per la interacció de factors genètics i ambientals vinculats al control de la pressió arterial, el sistema de coagulació, la resposta immunitària, la resposta inflamatòria i, de forma especialment rellevant, el metabolisme dels lípids. Alteracions d'aquest metabolisme poden resultar en elevacions en les concentracions de lípids en sang que comporten, a la seva vegada, un augment considerable del risc cardiovascular. Encara que el metabolisme dels lípids es pot veure fortament alterat per factors ambientals com la dieta, un percentatge important de la població presenta alteracions que tenen una base genètica. Una de les més freqüents, i sobre la que tracta aquest estudi, és la que es coneix amb el nom d'Hiperlipèmia Familiar Combinada.

1.2. Elements del transport i metabolisme dels lípids.

1.2.1. Lipoproteïnes

Concepte

Les lipoproteïnes són complexos macromoleculars que tenen la funció de vehiculitzar lípids insolubles en el plasma. Transporten els lípids des del budell i el fetge cap als teixits perifèrics i els retornen cap al fetge per a la seva eliminació en forma de sals biliars.

La partícula lipoproteica té un nucli hidròfob format per lípids no polars, triglicèrids i colesterol esterificat, i una superfície hidròfila que conté colesterol no esterificat, fosfolípids i proteïnes. Aquestes proteïnes reben el nom d'apoproteïnes o apolipoproteïnes.

Classificació

La classificació de les lipoproteïnes es basa en les seves característiques físicoquímiques i el seu comportament en els processos de purificació. Aquests estan basats en la seva mobilitat electroforètica o bé en la seva densitat.

En electroforesi realitzada a pH bàsic es poden observar tres bandes mòbils i una d'estàtica. Les β -lipoproteïnes amb mobilitat β -globulina, les pre- β -lipoproteïnes amb mobilitat α_2 -globulina i les α -lipoproteïnes amb mobilitat α_1 -globulina. La banda estàtica correspon als quilomicrons.

A partir d'ultracentrifugació del plasma en gradient de densitat o seqüencialment s'obtenen les següents classes de lipoproteïnes: els **quilomicrons** de densitat inferior a 0.95 g/ml; les **lipoproteïnes de molt baixa densitat** (*Very low density lipoproteins*, *VLDL*) de densitat entre 0.95 g/ml i 1.006 g/ml; les **lipoproteïnes de densitat intermèdia** (*Intermediate density lipoproteins*; *IDL*) de densitat entre 1.006 i 1.019 g/ml; les **lipoproteïnes de baixa densitat** (*Low density lipoproteins*, *LDL*) de densitat entre 1.019 i 1.063 g/ml i les **lipoproteïnes d'alta densitat** (*High density lipoproteins*; *HDL*) amb densitat entre 1.063 i 1.210 g/ml. Les HDL poden diferenciar-se en HDL₂ de densitat entre 1.063 i 1.125 g/ml i HDL₃ de densitat entre 1.125 i 1.210 g/ml. Es detecta també una altra classe lipoproteica, quantitativament poc important, i que se separa entre les densitats 1.080 i 1.100 g/ml anomenada lipoproteïna (a) (Lp(a)) (Berg K, 1963). (Taula 1)

Cadascuna de les bandes obtingudes per electroforesi es correspon unívocament amb les diferents classes de lipoproteïnes separades per ultracentrifugació, excepte en el cas de la Lp(a).

TAULA 1. PROPIETATS FÍSQUES DE LES LIPOPROTEÏNES PLASMÀTIQUES

	Mobilitat electroforètica	Diàmetre (nm)	Pes molecular	Densitat (Kg/L)
QUILOMICRONS	origen	75-1200	4×10^6	0.93
VLDL	pre- β	30-80	$10-80 \times 10^6$	0.93-1.006
IDL	pre- β	25-35	$5-10 \times 10^6$	1.006-1.019
LDL	β	18-25	2.3×10^6	1.019-1.063
Lp(a)	β - pre- β	26-30	$4-8 \times 10^6$	1.050-1.100
HDL ₂	α	9-12	3.6×10^5	1.063-1.125
HDL ₃	α	5-9	1.7×10^5	1.125-1.210

Extret de Gotto AM *et al*, 1986; Dolphin PJ, 1985.

Descripció

Quilomicrons : Són lipoproteïnes d'origen intestinal d'un gran mida. Més del 85% del pes de la lipoproteïna correspon als triglicèrids mentre que només un 2% és proteïna. Els quilomicrons transporten els lípids absorbits en el budell cap al fetge i la resta de teixits. A més de triglicèrids poden transportar colesterol, altres esterols de la dieta i vitamines liposolubles. La vida mitjana dels quilomicrons en plasma és de l'ordre de minuts. La seva degradació resulta en l'aparició de **quilomicrons residuals** que són comparativament més petits i més rics en colesterol que les partícules de les que es deriven. Dos trets composicionals diferencien els quilomicrons de la resta de lipoproteïnes. Per una banda

posseeixen l'apolipoproteïna (apo) B-48 que se sintetitza exclusivament en els enteròcits. A més, són les úniques lipoproteïnes que contenen ésters de retinol. (Havel RJ, 1994).

Lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL) : Les VLDL són d'origen hepàtic. Els seu component majoritari, els triglicèrids, representa el 55% de la massa de la partícula. La seva funció més rellevant és la de transportar triglicèrids des del fetge a la resta de teixits. Juntament amb els quilomicrons constitueixen les anomenades "lipoproteïnes riques en triglicèrids". Contenen una molècula de l'apo B-100 i són més pobres en apos A que els quilomicrons. A mesura que les VLDL es van degradant disminueix el seu contingut en apos E, C i triglicèrids. Mitjançant tècniques com la cromatografia en gel d'agarosa amb heparina o anticossos contra l'apo E s'han pogut detectar varies subpoblacions de VLDL amb diferent contingut en apo E i també diferent comportament metabòlic (Gómez Coronado D *et al*, 1989).

Lipoproteïnes de densitat intermèdia (IDL) : Són minoritàries en condicions fisiològiques normals i producte de la degradació plasmàtica de les VLDL. Anàlisis en gels de poliacrilamida permeten diferenciar dues subpoblacions que, tal com succeeix amb les VLDL, són funcionalment diferents. La primera d'elles, les IDL-1, són catabolitzades a LDL. Les IDL-2 no entren en aquesta ruta catabòlica i esdevenen un factor important de risc cardiovascular (Krauss RM *et al*, 1987).

Lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) : El seu component majoritari és el colesterol esterificat que representa un 40% del pes sec de la partícula. La seva funció principal és el transport de colesterol entre teixits. El seu únic component proteic és l'apo B-100, de la qual tenen una sola molècula. Al igual que amb els anteriors tipus lipoproteïcs es poden diferenciar subpoblacions de LDL. En concret tres, LDL-I, LDL-II i LDL-III. És interessant constatar que l'abundància d'aquestes subpoblacions està determinada genèticament (Austin MA *et al*, 1988). Mentre que en el 85% de la població predominen les LDL-II (patró A), les LDL-III (patró B) estan associades a un major risc cardiovascular (O'Brien R, 1994).

Lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) : Són les lipoproteïnes de menor mida i major relació superfície/volum i presenten una alta proporció de proteïnes i fosfolípids comparat amb ésters de colesterol. El número d'aquestes partícules en plasma és de 10-20 vegades

superior al dels altres tipus lipoproteics. Hi ha tres subpoblacions que poden identificar-se per ultracentrifugació (Levy RI *et al*, 1965). Les HDL₁ són la subpoblació minoritària. Són les de major mida, relativament riques en colesterol i amb un alt contingut en apo E. Les HDL₂ són considerablement més petites i la seva proteïna majoritària és l'apo A-I. Les HDL₃ són les més denses i abundants. Algunes HDL₃ només tenen apo A-I, d'altres només apo A-II i la resta totes dues apoproteïnes (Cheung MC *et al*, 1984). També poden contenir apos C, D i E. Mitjançant ultracentrifugació en gradient o electroforesi en gel de poliacrilamida es poden detectar noves subpoblacions: HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b} i HDL_{3c} de menor a major densitat i de major a menor mida.

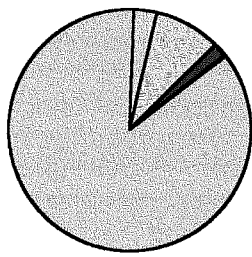
En la Figura 1 es detalla el contingut en lípids i proteïna de cadascuna d'aquestes fraccions lipoproteiques.

1.2.3. Apolipoproteïnes

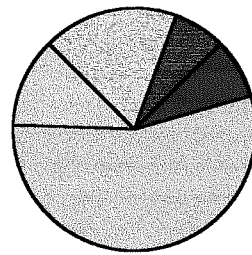
Les apolipoproteïnes (apos) tenen un paper molt important en el metabolisme dels lípids mitjançant les seves tres funcions més destacades: mantenen l'estructura de les lipoproteïnes i faciliten així el seu transport a través del medi intern, determinen el destí dels lípids en ser algunes d'elles reconegudes per receptors específics de membrana i modulen l'activitat de determinats enzims (Taula 2). Les apolipoproteïnes pertanyen a una mateixa família genètica que es caracteritza per presentar repeticions en tàndem de 11 codons (Luo C-C *et al*, 1986).

Apolipoproteïna A-I: És l'apolipoproteïna més abundant en el plasma humà (100-150 mg/dl). En ser el component majoritari de les HDL la seva concentració és indicativa de la d'aquesta lipoproteïna. L'apo A-I se sintetitza en el fetge i el budell en forma de pre-pro-pèptid del qual s'escindeix un pèptid senyal de 18 aa donant lloc a una pro-apo A-I de 249 aa que surt a la circulació. La forma madura té 243 aa i un pes molecular de 28 kD.

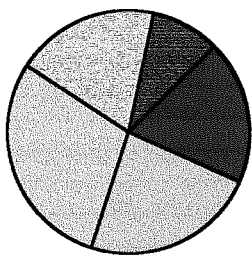
A més d'estabilitzar les HDL l'apo A-I realitza dues funcions importants. Per una banda és l'activador de la LCAT (*Lecithin cholesterol acyl transferase*), l'enzim que esterifica el colesterol que transporta la pròpia HDL en la seva superfície (Nichols AV *et al*, 1985). A més, se li atribueix el paper de lligand per un receptor o acceptor de membrana (Oram JF *et al*, 1983) que s'ha identificat recentment com a membre de la família dels receptors *Scavenger* (Acton S *et al*, 1996).



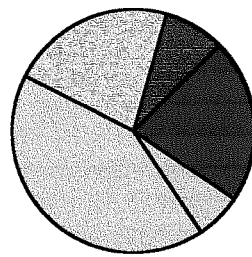
Quilomicró



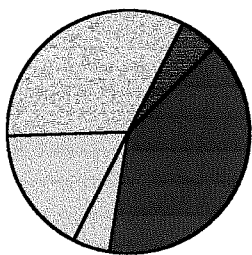
VLDL



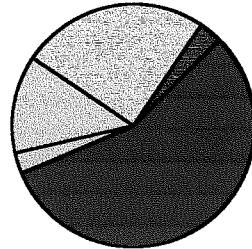
IDL



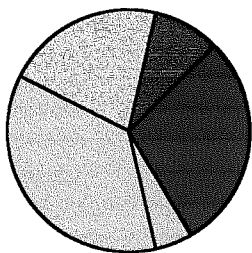
LDL



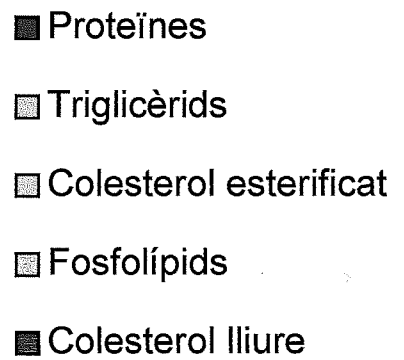
HDL2



HDL3



Lp(a)



El gen que codifica per l'apolipoproteïna A-I es troba en el cromosoma 11 formant part de l'agregat genètic AI-CIII-AIV (Figura 3).

Apolipoproteïna A-II : És la segona proteïna més abundant de les HDL i, a diferència de l'apo A-I, la seva concentració no es correlaciona amb la de la HDL. La seva concentració en plasma humà oscil·la entre 30 i 50 mg/dl. Se sintetitza principalment en el fetge en forma d'un pre-pro-pèptid del que s'escindeix un pèptid senyal de 18 aa. El pro-pèptid que en resulta surt al plasma on és processat per una tiolproteasa (Gordon JI *et al*, 1986) per donar una apo A-II madura de 77 aa. L'apo A-II circula en sang en forma d'un dímer de 17.4 kD. També pot formar un heterodímer amb l'apo E. Es detecten varies isoformes de l'apo A-II segons el seu contingut en àcid siàlic, la forma més abundant és la que no en presenta.

Potser degut a la seva gran afinitat pels fosfolípids, l'apo A-II és capaç de desplaçar a l'apo A-I en la superfície de les HDL (Mahley RW *et al*, 1984). No està clara la relació que hi pugui haver entre aquest fet i la capacitat que l'apo A-II té d'inhibir la LCAT *in vitro*. Experiments amb animals transgènics per l'apo A-II humana suggereixen que un augment relatiu d'aquesta apolipoproteïna en la HDL s'acompanya d'una disminució de la seva eficàcia per a realitzar el transport revers de colesterol (Schultz JR *et al*, 1992).

El gen que codifica per l'apolipoproteïna A-II es troba al cromosoma 1.

Apolipoproteïna A-IV : S'associa als quilomicrons i a la HDL tot i que la major part es troba lliure, no associada a lipoproteïnes (Dolphin PJ, 1985). La seva concentració en plasma és d'uns 15 mg/dl. Se sintetitza al budell en forma de pre-apo A-IV de la que s'escindeix un pèptid senyal de 20 aa que dona una apo A-IV madura de 376 aa amb un pes molecular de 45 kD. Tot i que aquesta proteïna no es glicosila se'n poden trobar diverses isoformes en la naturalesa.

Se li atribueix una capacitat activadora de la LCAT (Ohta T *et al*, 1984) i un paper facilitador de l'intercanvi d'apo C-II entre HDL i quilomicrons d'importància en la hidròlisi dels triglicèrids. Estudis amb animals han posat de manifest una certa capacitat de l'apo A-IV de regular la gana i per tant la ingesta d'aliment (Merrill AH Jr, 1993).

El gen que codifica l'apolipoproteïna A-IV es troba al cromosoma 11.

Apolipoproteïna B : Hi ha dues formes d'apo B, l'apo B-48 i l'apo B-100 (Kane JP *et al*, 1983). L'apo B-48 es troba en els quilomicrons i l'apo B-100 és constituent de les VLDL, IDL i LDL (Olofsson S-O *et al*, 1987). L'apo B-48 se sintetitza exclusivament a l'enteròcit mentre que l'apo B-100 és de procedència hepàtica. L'apo B-100, que és una de les proteïnes monomèriques més grans que es coneixen, té 4.536 aa i un pes molecular de 512 kD. L'apo B-48 té 2.152 aa i un pes molecular que és el 48% del de l'apo B-100 (Marcel YL *et al*, 1982). Totes dues estan codificades pel mateix gen però el RNA missatger (RNAm) resultant és processat de forma diferent en fetge o budell (Chen S-H *et al*, 1987). En el budell el RNAm pateix una transformació que consisteix en un canvi de citosina per uracil en la posició 2.153 i que genera un codó de parada prematur. Aquest canvi es introduït per un enzim que rep el nom de APOBEC-1 (*Apo B mRNA editing component-1*) (Teng BB *et al*, 1993).

Tant l'apo B-100 com l'apo B-48 són essencials per la síntesi i secreció de les lipoproteïnes de les que formen part. A més, però, l'apo B-100 té un domini que interactua amb el receptor LDL (rLDL) i condiona la destinació metabòlica d'aquestes partícules. Aquest domini se situa entorn els aminoàcids 3.352 i 3.371 i, per tant, no és present a l'apo B-48 (Caladaras C *et al*, 1986). Les apos B, a diferència de totes les altres apolipoproteïnes, no es transfereixen entre lipoproteïnes (Schumaker VN *et al*, 1994).

El gen que codifica per les apolipoproteïnes B es troba al cromosoma 2.

Apolipoproteïnes C : Aquesta família inclou tres polipèptids de baix pes molecular : les apos C-I, C-II i C-III. Es troben en VLDL, quilomicrons i HDL i es transfereixen amb facilitat entre aquestes lipoproteïnes. Poden sintetitzar-se al budell tot i que la seva síntesi és majoritàriament hepàtica. També se sintetitzen amb un pèptid senyal que és escindit intracel·lularment.

L'apolipoproteïna C-I té 57 aa i un pes molecular de 6.500 D, per tant és la més petita de les apolipoproteïnes. És una apolipoproteïna minoritària no glicosilada que es troba a unes concentracions aproximades de 6 mg/dl en plasma. S'ha observat que *in vitro* activa la LCAT i inhibeix la lipoproteïna lipasa (LPL) (Jackson RJ *et al*, 1976). El gen que la codifica es troba al cromosoma 19.

L'apolipoproteïna C-II se segrega a la circulació con una molècula de pro-apo C-II que pot tenir una (C-II-1) o dues (C-II-2) molècules d'àcid siàlic. En el plasma perd l'àcid siàlic (C-II-0) donant lloc a la seva forma majoritària de 79 aa i 8.850 D de pes molecular.

Curiosament, aquesta no és la forma madura de la proteïna (C-II-1/2) que s'obté després de la hidròlisi de 6 aa de l'extrem N terminal. Les concentracions d'apo C-II en plasma ronden els 4 mg/dl. En la seva regió C-terminal presenta un domini d'interacció amb la lipoproteïna lipasa de la qual n'és el cofactor activador (LaRosa JC *et al*, 1970 ; Havel RJ *et al*, 1970). El gen que codifica per l'apolipoproteïna C-II es troba en el cromosoma 19.

L'apolipoproteïna C-III és la més abundant de les apos C (8-15 mg/dl) i la trobem a les VLDL i HDL. Té 79 aa i pot estar associada a 1 o 2 molècules d'àcid siàlic. L'apo C-III aconsegueix dues funcions importants, modula la interacció entre l'apo E i els receptors hepàtics (Shelburne F *et al*, 1980) i pot inhibir, almenys *in vitro*, l'activitat de la LPL (Cardin AD *et al*, 1982). El gen que la codifica es troba al cromosoma 11 formant part de l'agregat genètic (*cluster*) AI-CIII-AIV (Figura 3).

Apolipoproteïna D : Inicialment se la va denominar apo A-III i és una apolipoproteïna minoritària (5-6 mg/dl). La seva síntesi és hepàtica i té un pes molecular de 32 kD (Drayna DT *et al*, 1987). Es troba associada a les HDL de major densitat (HDL₃).

La seva funció podria estar relacionada amb l'enzim LCAT.

El gen que la codifica es troba al cromosoma 3.

Apolipoproteïna E : Té 299 aa i un pes molecular de 34 kD. La seva concentració en plasma és de 3-6 mg/dl i es troba present a totes les lipoproteïnes excepte la LDL. Se sintetitza en el fetge i d'altres teixits i de manera escassa en el budell. Tot i que se segrega al plasma sialitzada, el 80% de les molècules perden l'àcid siàlic. Hi ha diferents polimorfismes de l'apo E en humans que provoquen canvis en un o més aminoàcids. Aquests poden ser fàcilment identificats per isoelectroenfocament ja que les variants proteiques presenten diferents punts isoelèctrics (pI). Les isoformes més freqüents en humans són les anomenades E2, E3 i E4, respectivament (Warnick GR *et al*, 1979 ; Utermann G *et al*. 1984a,b).

L'apo E pot reconèixer el LRP (*Low density lipoprotein receptor related protein*) també anomenat "receptor de remanents". El domini de reconeixement per aquest receptor es troba entre els aminoàcids 140-150. L'apo E també és reconeguda pel receptor LDL i amb major afinitat que la pròpia apo B-100 ja que el rLDL pot reconèixer 4 molècules d'apo E simultàniament. L'afinitat pel rLDL depèn de la isoforma d'apo E. Així, les formes E4 i E2

tenen major i menor afinitat pel rLDL, respectivament, que la forma més comú E3. *In vitro*, l'apo E és capaç d'activar la LCAT i d'inhibir la LPL.

El gen que la codifica es troba al cromosoma 19.

Apolipoproteïna (a) : És un pèptid molt polimòrfic en humans que pot presentar pesos moleculars des de 400 fins 800 kD (Fless GM *et al*, 1984). Se sintetitza en el fetge i en el plasma s'associa a l'apo B-100 mitjançant un pont disulfur conformant l'anomenada lipoproteïna (a) o Lp(a) (Ehnholm C *et al*, 1972). La concentració de Lp(a) en plasma és inversament proporcional a al mida de l'apo (a) sintetitzada. Aquesta relació s'explica per diferències en la producció i no pas en el catabolisme (Rader DJ *et al*, 1994) d'aquesta partícula. L'apo (a) presenta una alta homologia amb el plasminogen (McLean JW *et al*, 1987). Conté dos tipus de dominis semblants als *Kringle domains* IV i V del plasminogen (Eaton DL *et al*, 1987), concretament, una còpia del *kringle* 5 i vàries del *kringle* 4. Això permet que l'apo (a) competeixi amb el plasminogen per la unió als seus acceptors cel·lulars la qual cosa redueix la producció de plasmina. La seva homologia estructural també li permet d'enllaçar-se amb la fibrina i el fibrinogen. La inhibició que la Lp(a) exerceix sobre la capacitat fibrinolítica de l'organisme pot significar un allargament de la vida del trombo i podria relacionar-se amb el risc cardiovascular associat a aquesta partícula.

1.2.4. Enzims i proteïnes transportadores

HMG-CoA Reductasa : Abreviatura de 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzim A Reductasa (EC 1.1.88). És l'enzim clau en la síntesi plasmàtica de colesterol. La seva activitat està regulada per les concentracions intracel·lulars d'esterols. Aquesta regulació es pot dur a terme tant transcripcionalment com post-transcripcional (Lutton C, 1991).

LCAT (*Lecithin :Cholesterol AcylTransferase*) : És un enzim de 59 kD sintetitzat al fetge. Catalitza la transferència de l'àcid gras en posició 2 de la fosfatidil colina o lecitina al OH-3 del colesterol. El seu activador és l'apolipoproteïna A-I (Albers JJ *et al*, 1981). També té activitat lisolecitina aciltransferasa, fosfolipasa i colesterol esterasa. La LCAT viatja en el plasma associada a les HDL i la seva deficiència s'associa a concentracions molt baixes d'aquesta lipoproteïna (Rader DJ *et al*, 1994). La sobreexpressió de la LCAT en animals

TAULA 2. PROPIETATS FÍSQUES, DISTRIBUCIÓ I FUNCIÓ DE LES APOPOPROTEÏNES

Apoproteïna	PM (kD)	Nº aa	Origen	Distribució	Funció
A-I	28	243	Budell, fetge	HDL, Qn	Activació LCAT Unió receptor
A-II	17	2x77	Budell, fetge	HDL, Qn	?
A-IV	46	376	Budell	HDL, Qn	Activació LCAT Intercanvi apo C-II Regulació gana
(a)	400 a 800		Fetge	Lp(a)	?
B-100	550	4.536	Fetge	VLDL, LDL	Estructural Unió receptor B/E
B-48	275	2.152	Budell	Qn, Qr	Estructural
C-I	7	57	Fetge	Q, VLDL, HDL	Activació LCAT ? Inhibició LPL ?
C-II	9	79	Fetge	Q, VLDL, HDL	Activació LPL
C-III	9	79	Fetge	Q, VLDL, HDL	Inhibició LPL i receptor apo B/E i E
D	33		Fetge	HDL	Regulació LCAT ?
E	34	299	Fetge	Q, VLDL, HDL	Unió receptor E i B/E

Qn = Quilomicró naixent ; Qr = Quilomicró residual.

Actualitzat de Dolphin PJ, 1985

transgènics comporta un augment molt important dels ésters de colesterol de les HDL i un enlentiment del catabolisme de les apos A-I i A-II (Francone OL *et al*, 1995).

LPL (Lipoproteïna Lipasa): La LPL (EC 3.1.1.34) és una glicoproteïna de 67 kD que se sintetitza a diversos teixits diferenciats (múscul esquelètic, glàndula mamària, teixit adipós) però no al fetge. La seva funció més reconeguda és la hidròlisi dels triglicèrids transportats per quilomicrons i VLDL que realitza en forma de dímer no covalent (Osborne JC *et al*, 1985). Els seu activador és l'apolipoproteïna C-II i el seu inhibidor, almenys *in vitro*, l'apolipoproteïna C-III (Cardin AD *et al*, 1982). Actua ancorada a la superfície luminal de les cèl·lules endotelials que, d'altra banda no poden sintetitzar-la. Altres funcions de la LPL relacionades amb el metabolisme lipoproteic són la seva capacitat de retenir lipoproteïnes en la paret vascular, de regular la secreció de lipoproteïnes (Williams KJ *et al*, 1991) i d'actuar com a lligand del LRP (Nykjaer A *et al*, 1993). La sobreexpressió de la LPL en animals transgènics resulta en una disminució dels triglicèrids i un augment del colesterol LDL (Liu M-S *et al*, 1994).

Lipasa hepàtica : La lipasa hepàtica (EC 3.1.1.3) és un pèptid de 53 kD de pes molecular que hidrolitza triglicèrids i fosfolípids i es troba a les membranes cel·lulars dels sinusoides hepàtics. No necessita cofactors apoproteics i la seva síntesi sembla estar regulada pel contingut intracel·lular hepàtic de colesterol. La seva funció està relacionada amb la conversió hepàtica d' IDL a LDL (Nozaki S *et al*, 1986), amb facilitar la retirada de quilomicrons remanents del plasma (Diard P *et al*, 1994) i amb la conversió de HDL₂ a HDL₃. La sobreexpressió de la lipasa hepàtica en animals transgènics (Fan J *et al*, 1994) resulta en una clara disminució de les lipoproteïnes riques en colesterol.

CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein): La proteïna de transferència d'ésters de colesterol és un pèptid glicosilat de 476 aa i un pes molecular de 70kD (Hesler C *et al*, 1987). La CETP s'expressa en fetge, budell i sobretot a la melsa i teixit adipós (Jiang X *et al*, 1991). La CETP fa de mitjancer en els processos de transferència de lípids neutres en el plasma humà. Això inclou la transferència recíproca d'ésters de colesterol i triglicèrids entre HDL i LDL i VLDL (Yen FY *et al*, 1989) i de fosfolípids entre lipoproteïnes. La deficiència d'aquesta proteïna s'associa a nivells elevats de colesterol HDL (Inazu A *et al*, 1990) i aquesta associació s'ha pogut constatar també amb l'estudi d'animals transgènics per la

CETP (Marotti KR *et al*, 1992). La comprensió que es té sobre la funció biològica d'aquesta proteïna és encara molt incerta.

1.2.5. Receptors

Receptor LDL o receptor apo B/E : El descobriment d'aquest receptor va obrir el camí per què Goldstein i Brown desvetllessin els mecanismes involucrats en l'homeostasi del colesterol (Brown MS i Goldstein JL, 1986). El receptor LDL (rLDL) és una glicoproteïna de membrana de 160 kD i 839 aa, abocada a l'espai extracel·lular. És receptor de dues proteïnes, l'apo B-100, única proteïna de les LDL i l'apo E, present als quilomicrons, VLDL, IDL i alguna subclasse de HDL. Les lipoproteïnes riques en apo E tenen molta més afinitat pel rLDL que les riques en apo B-100 (Innerarity TL *et al*, 1978). Un cop completada la seva síntesi, que es dona a totes les cèl·lules, els receptors són desplaçats a la superfície cel·lular on es reuneixen en uns pous recoberts de la proteïna clatrina (*Coated pits*). Aquí és on reconeixen el seu lligand que posteriorment internalitzen en uns endosomes o pous recoberts (*Coated endosomes*). Els receptors es dissocien d'aquesta estructura i són reciclats tornant a la superfície cel·lular. Aquesta operació pot repetir-se unes 100 vegades. En aquest procés hi intervenen els 5 dominis en que es divideix el receptor. El domini 1 té 292 aa i és el responsable de la unió al lligand. El domini 2, que té 400 aa, presenta homologia amb l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) i la seva alteració afecta la unió amb el lligand i la taxa de recanvi del receptor. El domini 3 té 58 aa i és punt d'unió de cadenes oligosacàrides. El domini 4 té 22 aa hidròfobs que travessen la membrana plasmàtica (Brown MS *et al*, 1986). El cinquè domini té 50 aa responsables de les interaccions proteïna-proteïna que manté amb la clatrina dels pous recoberts (Davis CG *et al*, 1987)

L'expressió del rLDL està regulada per diversos mecanismes. La regulació per producte final (*Down regulation*) que exerceix el colesterol sembla ser la més important (Brown MS *et al*, 1986). A més cal considerar la regulació hormonal (Havel RJ, 1988) i la regulació per fosforilació depenent de proteïnes quinasa (Kishimoto A *et al*, 1987).

El receptor LDL és el vehicle de captació de LDL, i per tant de colesterol, de les cèl·lules dels teixits. Aquest punt queda plenament confirmat amb l'estudi d'animals que sobreexpressen el rLDL (Hoffmann SL *et al*, 1988). Encara que degut a la seva capacitat d'unir apo E el rLDL pot actuar com a receptor de remanents (Willnow E *et al*, 1994),

aquesta no és una de les seves funcions principals tal com demostra el fet que els individus amb deficiència de rLDL no acumulin partícules remanents.

LRP (LDL receptor-related protein): Estudis *in vivo* i *in vitro* indicaven que els quilomicrons remanents eren eliminats per les cèl·lules hepàtiques a través d'un receptor diferent del receptor B/E (Mahley RW *et al*, 1981). Aquest va ser identificat com una proteïna de membrana molt semblant al receptor apo B/E (Beisiegel U *et al*, 1989) i al receptor de l'alfa-2-macroglobulina activada (Kristensen T *et al*, 1990). El LRP és una proteïna de membrana de 4.544 aa i un pes molecular d'uns 500 kD que conté seqüències reiterades del receptor apo B/E. El LRP interacciona de forma directa amb l'apo E (Beisiegel U *et al*, 1989), la LPL i la lipasa hepàtica (Nykjaer A *et al*, 1994). La unió del LRP amb el seu lligand és fortament dependent de Ca^{2+} . Igual que el receptor apo B/E, la seva activitat provoca acumulació d'ésters de colesterol però aquests no regulen la seva expressió en la superfície cel·lular (Kowal RC *et al*, 1989). Associada al LRP s'ha identificat una proteïna de 39 kD anomenada RAP (*Receptor-Associated Protein*) que regula la seva activitat. Totes dues proteïnes són força abundants en el cervell (Bu G *et al*, 1994).

Receptor Scavenger: A finals dels anys 70 Goldstein i els seus col·laboradors van descobrir un receptor que *in vitro* reconeixia les LDL acetilades (Goldstein JL *et al*, 1979). Més tard es veié que tenia afinitat per qualsevol modificació que representés un fort increment de les càrregues negatives de la LDL. Això fa que reconeguin un ventall molt ampli de lligands i d'aquí els ve el nom de *scavenger*, o sigui, recollidor de deixalles. Es divideixen en dos tipus, I i II. Les funcions fisiològiques i patofisiològiques d'aquests receptors no estan ben establertes però es creu que participen en tres processos fonamentals: arteriosclerosi, adhesió i defensa. En l'arteriosclerosi el seu paper està sobretot relacionat amb l'acumulació de lípids a l'íntima arterial. En macròfags madurs, aquests receptors poden estar involucrats en el reconeixement entre cèl·lules o amb la matriu extracel·lular (Krieger M, 1992).

Receptor VLDL (VLDLr): El receptor VLDL va ser inicialment identificat en conills (Shimano H *et al*, 1994) i posteriorment en humans (Sakai J *et al*, 1994) com un receptor de lipoproteïnes que contenen apo E i amb una gran semblança amb el receptor LDL. S'expressa en teixits diferenciats (múscul esquelètic, cor, ronyó) que metabolitzen àcids

grassos com a font d'energia i gairebé no s'expressa al fetge (Webb JC *et al*, 1994). La transcripció del gen que codifica aquest receptor no està regulada pels esterols. La seva funció en mamífers és encara incerta.

Receptor HDL : De l'estudi de la unió de les HDL amb les membranes de diferents tipus cel·lulars (Reichil D *et al*, 1989) es despenia que aquesta unió estava mitjançada per un receptor. Aquest receptor ha estat identificat com un receptor *scavenger* de la classe B anomenat SR-BI (Acton S *et al*, 1996) que té una molt elevada afinitat per les HDL i que s'expressa sobretot en el fetge.

1.3. Metabolisme de les lipoproteïnes

Un 80% del carboni i l'hidrogen dels substrats energètics es troba en forma d'algun intermediari lipídic abans de ser oxidats i donar els productes finals. La major part d'aquests intermediaris lipídics viatgen en la sang en forma d'àcids grassos lliures o triglicèrids. Aquest trànsit el realitzen associats a proteïnes. L'associació lípid-proteïna més simple és la dels àcids grassos lliures amb l'albumina mentre que del transport de lípids més complexes se n'encarreguen les lipoproteïnes. Les lipoproteïnes acompleixen quatre funcions bàsiques relacionades amb el transport dels lípids. Les dues primeres són el transport de triglicèrids d'origen exògen i endògen, respectivament, als teixits. La tercera és el transport de colesterol al teixits. La quarta és la retirada de l'excés de colesterol d'aquests teixits.

1.3.1 Transport dels lípids exògens

És la ruta de transport que segueixen els lípids que ingerim amb la nostra dieta i que duen a terme les lipoproteïnes conegudes com quilomicrons.

Els triglicèrids de la dieta són digerits per la lipasa pancreàtica per donar β -monoglicèrids i àcids grassos lliures que són absorbits pels enteròcits. Els enteròcits, a més, absorbeixen colesterol lliure producte de la hidròlisi dels ésters de colesterol d'origen animal. Aquests lípids absorbits comencen a associar-se a l'apolipoproteïna B-48 immediatament després de la seva traducció i quan aquesta abandona el reticle endoplasmàtic (RE). Un augment en la ingesta de triglicèrids no implica un augment en la síntesi d'apo B-48 (Imaizumi K *et al*,

1978) sinó la secreció d'unes partícules més voluminoses. En un segon pas, el complex apo B-48-lípids es fusionarà amb una vesícula lipídica en un procés dirigit per la proteïna MTP (*Microsomal Triglyceride Transfer Protein*) (Wetterau JR *et al*, 1992). La partícula resultant serà transportada a l'aparell de Golgi on serà enriquida en fosfolípids i apos A (AI, AII i AIV) per donar lloc al **quilomicro naixent**. Aquest abandona la cèl·lula i passa a la limfa on immediatament intercanvia apo A per apos C i E amb les HDL previ al seu pas definitiu al torrent sanguini.

La hidròlisi d'aquests quilomicrons té lloc a l'endoteli vascular on es dona una complexa interacció entre el quilomicro, la lipoproteïna lipasa (LPL) i els proteoglicans endotelials (Olivecrona T *et al*, 1993). Aquesta hidròlisi resulta en l'alliberament d'àcids grassos i glicerol i és responsable de la pèrdua d'un 70% del contingut inicial en triglicèrids del quilomicro i de la disminució del diàmetre de la partícula. A més, hi ha una cessió de fosfolípids i colesterol lliure a les HDL dirigit per una proteïna transferidora de fosfolípids (LPT-II) (Tollefson JH *et al*, 1988) relacionada evolutivament amb la CETP. Aquesta transferència amb les HDL també afecta les apos C i E. La partícula resultant d'aquest procés, més pobre en triglicèrids i apos C i E, s'anomena **quilomicro remanent**. El temps que transcorre entre la secreció del quilomicro i la seva transformació en quilomicro remanent és, en un individu normal, d'uns 15 minuts (Stalenhoef AFH *et al*, 1984).

Els quilomicrons remanents són retirats de la sang pels hepatòcits (Shafi S *et al*. 1994). Aquest procés d'endocitosi és molt eficaç i està dirigit per receptors que reconeixen l'apo E. D'entre aquests, el LRP és el que es considera responsable de l'eliminació dels quilomicrons remanents (Brown MS *et al*, 1991). La lipasa hepàtica facilita el reconeixement entre quilomicro i receptor enriquint el primer en apo E (Sultan F *et al*, 1990). A diferència del que passa amb els remanents de VLDL, no es formen "lipoproteïnes filles" a partir dels quilomicrons remanents.

1.3.2. Transport dels triglicèrids endògens

És la ruta de transport dels triglicèrids de síntesi hepàtica que viatgen en les lipoproteïnes conegudes com VLDL.

La via de la VLDL permet que el fetge exporti triglicèrids, colesterol, apolipoproteïnes intercanviables i tocoferol. Els àcids grassos emprats en la síntesi de triglicèrids provenen

de diverses fonts la més important de les quals és la hidròlisi intracel·lular que té lloc en el teixit adipós. El regulador més potent d'aquesta hidròlisi és la insulina.

La VLDL humana conté una única còpia d'apo B-100 (Kane JP *et al*, 1994) i no conté apo B-48. Durant la traducció de l'apo B-100 alguns lípids se li associen. Aquesta associació lípid-proteïna determinarà que l'apo B-100 segueixi acumulant lípid per formar una VLDL o bé sigui degradada (Thrift RN *et al*, 1992). Igual que en el cas dels quilomicrons, la proteïna MTP és important en el progressiu acoblament de la VLDL. Un cop repleta de lípids, la VLDL passa a l'aparell de Golgi on es glicosilen les apolipoproteïnes (apo B-100, apo C i apo E). Des d'aquí la VLDL serà transportada a la membrana i alliberada a l'espai de Disse on comença l'intercanvi de fosfolípids i apolipoproteïnes amb les HDL.

Els augments en la síntesi de triglicèrids no fan augmentar la síntesi d'apo B-100 sinó la mida de les VLDL. Factors que afecten la síntesi i secreció de l'apo B-100 són la insulina (Patsch W *et al*, 1983), que les inhibeix, i els estrògens (Tam S-P *et al*, 1986), que les estimulen.

Un cop secretades, les VLDL són hidrolitzades per la LPL. La vida mitjana d'una VLDL en plasma és de 30 a 60 minuts (Stalenhoef AFH *et al*, 1984). La hidròlisi de les VLDL és modulada per l'apolipoproteïna C-III. L'apo C-III evita que la VLDL s'uneixi de forma prematura al receptor LDL. A mesura que la VLDL va perdent el seu contingut en triglicèrids també es va empobrint en apos C. Això fa que la LPL sigui cada cop menys eficaç. En aquest punt, la VLDL s'ha convertit en una IDL enriquida en ésters de colesterol. Aproximadament la meitat d'aquestes IDL, probablement les més riques en apo E, són eliminades pels receptors LDL hepàtics. La resta es convertiran en unes partícules encara més riques en ésters de colesterol anomenades LDL.

1.3.3. Transport centrífug de colesterol

És la ruta de transport del colesterol de síntesi hepàtica que viatja en les lipoproteïnes anomenades LDL.

La lipasa hepàtica és l'enzim responsable de convertir els remanents de VLDL en partícules LDL que només contenen un 3-6% de triglicèrids. La LDL, a l'igual que la VLDL, té una sola molècula d'apo B-100 tot i que aquesta presenta una conformació molt diferent en els dos casos (Chen GC *et al*, 1989).

TAULA 3. CLASSIFICACIÓ DE LES HIPERLIPOPROTEINÈMIES PRIMÀRIES.

Hiperlipoproteinèmia	Etiopatogènia	Base metabòlica	Prevalença
HIPERCOLESTEROLÈMIES PRIMÀRIES			
Hipercolesterolèmia familiar	Mutació receptor LDL	↓ Catabolisme LDL ↑ Síntesi LDL	1/500 Heterozigot 1/10 ⁶ Homozigot
Apoproteïna B-100 defectuosa familiar	Mutació apo B Residu 3.500	↓ Catabolisme LDL	≅ 1/500
Hipercolesterolèmia poligènica	Multifactorial genètica i ambiental	↓ Catabolisme LDL ↑ Síntesi LDL	≅ 2/100
Hiperlipèmia familiar combinada	Desconeguda	↑ Síntesi apo B	1/100
HIPERLIPÈMIES MIXTES			
Disbetalipoproteinèmia tipus III	Fenotip apo E _{2/2}	↓ Catabolisme IDL	1/10.000
Hiperlipèmia familiar combinada	Desconeguda	↑ Síntesi apo B	1/100
HIPERTRIGLICERIDÈMIES PRIMÀRIES			
Dèficit de LPL	Mutacions LPL	↓ Catabolisme Quilomicrons	1/10 ⁶
Dèficit d'apo C-II	Mutacions apo C-II	↓ Catabolisme Quilomicrons	≅ 1/10 ⁶
Hipertrigliceridèmia familiar moderada	Desconeguda	↓ Catabolisme VLDL	1/100
Hipertrigliceridèmia familiar greu	Desconeguda	↓ Catabolisme VLDL i quilomicrons	
Hiperlipèmia familiar combinada	Desconeguda	↑ Síntesi apo B	1/100

Modificat de Farreras P i Rozman C, 1995.

i les **secundàries**. Les formes secundàries són aquelles que no resulten d'alteracions pròpies del metabolisme lipoproteic tot i que sovint, però, coexisteixen amb formes primàries. En la Taula 3 es detallen les hiperlipèmies primàries, el seu mecanisme patogènic i la seva prevalença.

D'entre elles destaca, per la seva elevada prevalença entre la població general i pel poc coneixement que es té de la seva etiopatogènia, la **hiperlipèmia familiar combinada**.

1.5. Hiperlipèmia familiar combinada

La Hiperlipèmia familiar combinada (HLFC) va ser descrita per primera vegada el 1973 (Goldstein JL *et al*, 1973 ; Rose HG *et al*, 1973) com una síndrome dislipèmica detectada en famílies de supervivents d'infart agut de miocardi prematur. Entre els propis supervivents d'infart de miocardi, la HLFC va resultar ser l'alteració lipídica hereditària més freqüent (11.3%) (Goldstein JL *et al*, 1973). Aquesta alteració es caracteritzava per elevacions en el colesterol o els triglicèrids plasmàtics que també es podien presentar de forma combinada. A més, els individus afectes podien presentar alteracions associades com ara hipertensió, obesitat, diabetis o l'anomenada síndrome X, totes elles prevalent en la malaltia coronària.

Avui es considera a la HLFC com la Hiperlipèmia genètica més freqüent en l'home i com un dels factors més influents en el desenvolupament de la malaltia coronària prematura.

1.5.1. Característiques analítiques

L'analítica de la HLFC està típicament associada a elevacions en les fraccions VLDL i LDL i, molt rarament a quilomicronèmia (Brunzell JD *et al*, 1983). Seguint la classificació de Fredrickson (Taula 4) es poden presentar els fenotips IIa (elevacions de LDL), IIb (elevacions de VLDL i LDL) i IV (VLDL molt elevada) (Beaumont JL *et al*, 1970). Una de les característiques de la HLFC és que el patró lipoproteic varia entre els membres afectes de la família i fins i tot en el propi pacient al llarg del temps. Les alteracions en les lipoproteïnes no només afecten la seva concentració en plasma sinó també la seva composició. Així, les VLDL són més nombroses i petites. Les LDL presenten una heterogeneïtat de mides on predominen unes partícules petites i denses pobres en colesterol i riques en apo B-100 (Teng B *et al*, 1983). Les HDL es veuen afectades de forma variable encara que tendeixen a

estar reduïdes, sobretot en la fracció HDL₂ (Brunzell JD *et al*, 1983). Són particularment característics de la HLFC les alteracions composicionals de la LDL que afecten el seu contingut proteic (Hiperapobetalipoproteinèmia) i la seva mida (subfraccions de LDL).

TAULA 4. CLASSIFICACIÓ DE LES HIPERLIPOPROTEINÈMIES (OMS 1970).

Fenotip	Lipoproteïna acumulada	Hiperlipèmia predominant
Tipus I	Quilomicrons	Hipertrigliceridèmia
Tipus IIa	LDL	Hipercolesterolèmia
Tipus IIb	LDL i VLDL	Hipertrigliceridèmia Hipercolesterolèmia
Tipus III	IDL	Hipertrigliceridèmia Hipercolesterolèmia
Tipus IV	VLDL	Hipertrigliceridèmia
Tipus V	Quilomicrons i VLDL	Hipertrigliceridèmia

Extret de Farreras F, Rozman C, 1995.

Hiperapobetalipoproteinèmia : Se la va descriure inicialment com un augment desproporcionat del contingut d'apo B-100 de les LDL comparat amb el seu contingut en colesterol (Sniderman A *et al*, 1980). Ve definida per valors de LDL-*apo B* > 130 mg/dl i colesterol LDL < percentil 90 segons edat i sexe (Kwiterovich Jr PO *et al*, 1993) i pot trobar-se en pacients tant normotrigliceridèmics com hipertrigliceridèmics. La rellevància clínica de l'hiperapobetalipoproteinèmia queda patent en un estudi on se la descriu com el fenotip més freqüent (34%) entre individus amb malaltia coronària prematura (Kwiterovich Jr PO *et al*, 1993). En relació a la HLFC, una conseqüència important de la hiperapobetalipoproteinèmia és que resulta en unes LDL més petites, nombroses i denses (Teng B *et al*, 1983) que han estat identificades en aquests pacients (Brunzell JD *et al*, 1983).

Subclasses de LDL : Mitjançant electroforesi de poliacrilamida en gradient, Austin i col·laboradors (Austin MA *et al*, 1986 ; Austin MA *et al*, 1988) van demostrar que en la població general es detectaven 2 subpoblacions de LDL. Les del patró A, més grans (Ø 26.6 nm) i les del patró B, més petites (Ø 24.8 nm) mentre que en alguns pacients era possible detectar un patró intermedi.

El fet que en famílies dislipèmiques l'existència de LDL del patró B tripliqués el risc de patir infart de miocardi de forma no independent a la presència d'hipertrigliceridèmia (Austin MA *et al*, 1987) ha fet que es denominés aquesta subclasse de LDL com el "**fenotip lipoproteic aterogènic**" (Austin MA *et al*, 1990).

En pacients HLFC el patró B de les LDL és especialment predominant en individus amb hipertrigliceridèmia. En els pacients amb HLFC, el patró B de les LDL segueix una distribució bimodal si se l'estudia en funció de les concentracions d'apo B. Això suggereix que hi ha un subgrup d'individus HLFC amb LDL del patró B que tenen una susceptibilitat genètica a nivells més alts d'apo B (Austin MA *et al*, 1992).

1.5.1. Característiques clíniques

La HLFC és una alteració extesa entre la població que es presenta amb una freqüència del 0.3-2% (Goldstein JL *et al*, 1973 ; Grundy SM *et al*, 1987). Representa més del 10% de les formes d'hiperlipèmia genètica en supervivents d'infart de miocardi en comparació al 3% associat a la hipercolesterolèmia familiar. També és la hiperlipèmia familiar més freqüent entre pacients d'accident vascular no embòlic d'etiologia desconeguda (Bansal BC *et al*, 1986).

La hiperlipèmia familiar combinada, que alguns estudis suggereixen que es transmet de forma autosòmica dominant (Glueck CJ *et al*, 1973) presenta una clínica molt pobre on senyals clínics o símptomes característics com xantomes i xantel·lasmes són molt menys freqüents que en altres dislipèmies.

L'expressió de la HLFC, entesa com el desenvolupament d'una hiperlipèmia detectada de forma analítica, no es dona abans dels 20 anys (Goldstein JL *et al*, 1973 ; Rose HG *et al*, 1973) encara que un fenotip equivalent ha estat descrit en descendents de pacients amb malaltia arterial coronària (Sniderman A *et al*, 1985). Tot i que aquest criteri és àmpliament acceptat, hi ha estudis posteriors que suggereixen que aquest fenotip podria manifestar-se en la infantesa (Cortner JA *et al*, 1990).

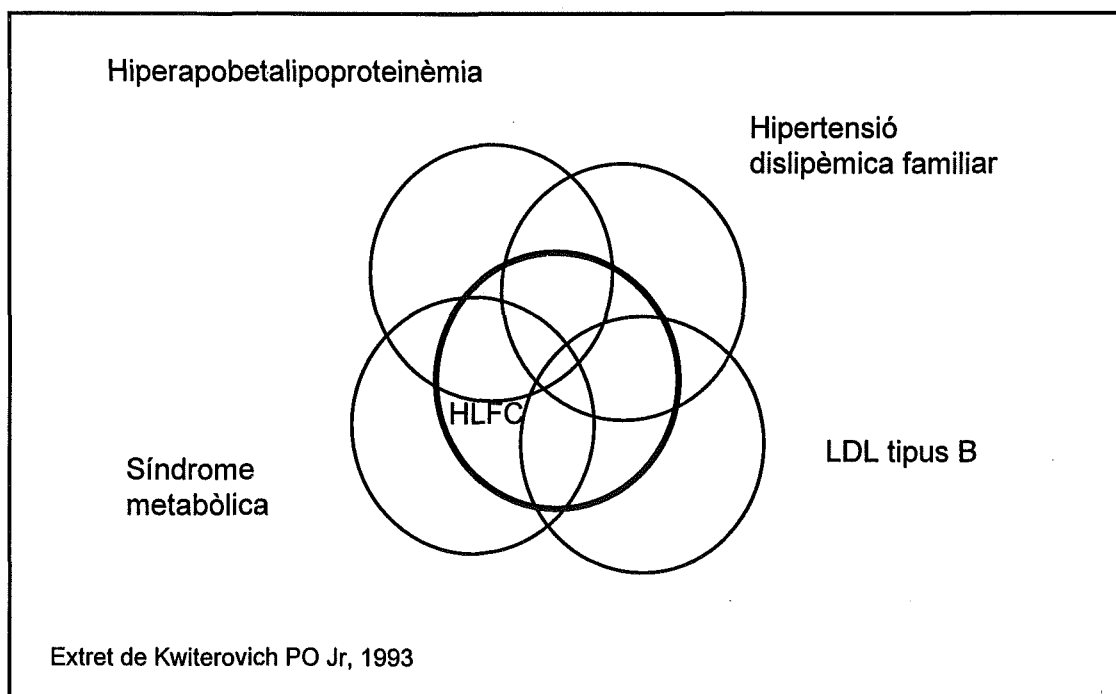
La HLFC tot i estar mancada d'una simptomatologia clara es presenta sovint associada a síndromes com la hipertensió dislipèmica familiar (HDF) i la síndrome metabòlica.

Hipertensió dislipèmica familiar : Aquesta síndrome d'hipertensió prematura (< 60 anys) pot anar acompanyada d'alguna de les següents alteracions lipídiques : a) Elevacions del colesterol LDL b) Elevacions dels triglicèrids c) Disminució del colesterol HDL (Williams RR *et al*, 1988). Arrel d'aquesta observació Hunt i col·laboradors van explorar la possibilitat d'un vincle amb la HLFC (Hunt SC *et al*, 1989) que va demostrar que un 30% dels pacients amb HDF presentaven el fenotip HLFC. La major part d'aquests individus presentaven també hiperinsulinèmia. Això suggereix que la hiperlipèmia, la hipertensió i la hiperinsulinèmia poden tenir una base genètica comú.

Síndrome metabòlica : El terme original de síndrome X va ser proposat per Reaven (Reaven GM, 1988) per descriure un conjunt d'alteracions que podien aparèixer plegades : resistència a la insulina, intolerància a la glucosa, hiperinsulinèmia, elevacions en la VLDL, disminucions en la HDL, hipertensió i obesitat.

Sembla, doncs, que la hiperapobetalipoproteinèmia, la hipertensió dislipèmica familiar, la síndrome metabòlica i la hiperlipèmia familiar combinada comparteixen una sèrie de característiques encara que no es coneix en quin grau ho fan (Figura 2).

Figura 2



1.5.2. Diagnòstic

Alguns autors han suggerit que el fenotip IIb d'hiperlipèmia mixta podria ser un marcador específic per a la hiperlipèmia familiar combinada (Nikkilä EA *et al*, 1973 ; Glueck CJ *et al*, 1973). Abans, però, cal descartar la possibilitat d'una hiperlipèmia secundària a : diabetis mellitus, malaltia hepàtica, hipotiroidisme, malaltia renal, malabsorció, obesitat (Brunzell *et al*, 1974), ingesta excessiva d'alcohol (Phillips NR *et al*, 1981) o l'ús de medicació que pugui influenciar el perfil lipoproteic (corticosteroides, andrògens, beta-bloquejants) entre d'altres.

El patró més consistent de diagnòstic inclou (Brunzell JD *et al*, 1984):

1. **Múltiples tipus d'hiperlipèmia dins d'una mateixa família.**
2. **Historial familiar de malaltia coronària prematura (< 60 anys).**

A més hi ha d'altres paràmetres bioquímics i característiques clíniques que recolzen el diagnòstic de la HLFC (Taula 5). Un diagnòstic segur haurà de tenir sempre en compte l'estudi de la família del pacient.

TAULA 5. CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques I BIOQUÍMIQUES DE DIAGNÒSTIC.

Característiques clíniques i bioquímiques que donen suport al diagnòstic de la HLFC
1. Múltiples tipus d'hiperlipèmia en familiars de primer grau.
2. Antecedents familiars d'arteriosclerosi prematura.
3. Concentracions elevades d'apo B plasmàtica.
4. Absència de xantomes en familiars de primer grau.
5. Absència d'hiperlipèmia en familiars menors de 20 anys.
6. Presència de fenotips IIa, IIb, IV o V.
7. Baixa relació LDLc / apo B.
8. Baixes concentracions de HDL2.

LDLc = colesterol LDL . Extret de Castro Cabezas *et al*, 1992.

Quan es descarta una hiperlipèmia secundària cal incloure en el diagnòstic diferencial la hipertrigliceridèmia familiar (HTGF), la disbetalipoproteinèmia familiar (DF) i la hipercolesterolèmia familiar (HF) (Taula 6).

HLFC : Sobreproducció de VLDLs normals i més aviat petites. Nivells plasmàtics d'apo B elevats (Brunzell JD *et al*, 1983). Forta associació amb arteriosclerosi prematura.

HTGF : Producció normal de VLDLs riques en triglicèrids. Nivells d'apo B normals. Poca associació amb arteriosclerosi prematura (Brunzell JD *et al*, 1989).

DF : Acumulació d'IDL. Homozigositat per apo E2/E2 (Weisgraber KH *et al*, 1982) encara que també s'han descrit altres mutacions en el gen de l'apo E (Zannis VI *et al*, 1980). Presència de xantomes. Colesterol elevat en VLDL i disminuït en LDL (gregg RE *et al*, 1988)

HF : Acumulació de LDL aïllada. Possible presència de xantomes (Brown MS *et al*, 1973). Poden presentar sovint xantel·lasmes i arc corneal. Es manifesta aviat en la vida del pacient.

TAULA 6. DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL DE LA HLFC.

	HLFC	HTGF	DF	HF
Arteriosclerosi prematura	++	±	++	++
Xantomes				
Tendó d'Aquiles	-	-	±	+
Tendons extensors	-	-	±	+
Palmells	-	-	±	+
Tuberós	-	-	+	+
Sobreproducció apo B	+	-	-	-
Funció deficient del rLDL	-	-	+	+
Hiperlipèmia <20 anys	-	+	-	+

++ Sempre present + Present ± Pot presentar-se rLDL = Receptor LDL

Extret de Castro Cabezas *et al*, 1992.

Alguns d'aquests criteris són avui motiu de debat i la seva validesa es discuteix en algunes seccions d'aquest treball.

1.5.3. Bases metabòliques

Encara que l'etiopatogènia de la hiperlipèmia familiar combinada és encara desconeguda, hi ha alguns trets metabòlics que s'han trobat de forma consistent en un nombre considerable d'aquests pacients, si bé no en tots. Això fa pensar que aquests mecanismes poden estar involucrats en l'etiologia d'aquesta alteració. Aquests trets són la sobreproducció hepàtica d'apolipoproteïna B, el retard en l'aclariment de lipoproteïnes post-pandrials i l'estat d'heterozigositat per la deficiència de LPL.

Sobreproducció hepàtica d'apolipoproteïna B-100

Diversos estudis cinètics, els primers d'ells emprant isòtops radioactius (Chait A *et al*, 1980 ; Janus ED *et al*, 1980) i alguns de posteriors utilitzant isòtops estables (Cortner JA *et al*, 1991 ; Venkatesan S *et al*, 1993), indiquen que hi ha una sobreproducció hepàtica d'apo B-100, que resulta en un augment del nombre de partícules VLDL, en pacients diagnosticats d'HLFC. Aquesta és una característica que la HLFC comparteix amb la hiperapobetalipoproteinèmia, on també s'ha descrit una major síntesi de VLDL apo B i un major *pool* de partícules VLDL (Teng B *et al*, 1986).

Un aspecte important d'aquests treballs és que es va descriure que en totes dues alteracions el catabolisme de les VLDL era més lent. Molt lent en el cas de la hiperapobetalipoproteinèmia i només lleugerament en la HLFC. Aquest fenomen ha estat confirmat recentment en el cas de la HLFC (Aguilar-Salinas CA *et al*, 1997).

L'augment en la síntesi de VLDL apo B té com a conseqüència un increment de partícules LDL sense que això estigui acompanyat de cap defecte en el catabolisme d'aquestes partícules. Ja s'ha comentat anteriorment que les LDL obtingudes en aquestes condicions són més petites i denses.

No es coneix quin mecanisme hi ha implicat en aquest procés de sobreexpressió hepàtica tot i que s'ha proposat que hi podria haver involucrats defectes en el tractament post-traducciona l de la proteïna (La Belle M *et al*, 1990). Aquesta afirmació es basa en el menor grau de glicosilació que les LDL del tipus B presenten respecte a les del tipus A i que implicaria alteracions en el procés d'elaboració de la LDL a través del reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi.

Una altra hipòtesi més versemblant està relacionada amb un augment del flux d'àcids grassos lliures cap el fetge i es discuteix en el següent apartat sobre el retard en l'aclariment post-pandrial.

Retard en l'aclariment de lipoproteïnes post-pandrials

És característic de la hiperapobetalipoproteinèmia (Genest J *et al*, 1986) i de la HLFC (Castro Cabezas M *et al*, 1993a) un retard en l'aclariment de lipoproteïnes post-pandrials riques en triglicèrids (quilomicrons) fortament associat a les concentracions plasmàtiques basals d'apo C-III.

En tots dos casos això provoca un augment anormal en les concentracions plasmàtiques post-pandrials d'àcids grassos lliures que sovint s'observa associat a un fenomen de resistència insulínica (Sniderman A *et al*, 1987 ; Castro Cabezas M *et al*, 1993b).

Actualment s'especula amb la possibilitat que aquest augment elevaria el flux d'àcids grassos cap el fetge i estimularia la síntesi hepàtica de triglicèrids i, per tant, la síntesi de VLDL.

Baixa activitat de la lipoproteïna lipasa

Babirak i col·laboradors van ser els primers de proposar que l'estat d'heterozigositat per la deficiència de LPL podria trobar-se en un subgrup de pacients HLFC (Babirak SP *et al*, 1989). En concret van trobar els fenotips IV i IIb en individus amb valors de massa i activitat post-heparina de la LPL que corresponien aproximadament a un 50% de la normalitat. Aquests fenotips hiperlipèmics, a més, variaven al llarg del temps. El mateix Babirak va estimar més tard que 1/3 dels pacients HLFC podrien presentar aquest defecte (Babirak SP *et al*, 1992).

Les alteracions en l'activitat de la LPL tindrien 3 implicacions fisiològiques i metabòliques fonamentals :

Per una banda afectaria el que és la funció més ben coneguda de la LPL, és a dir, la hidròlisi de triglicèrids per donar una molècula de glicerol i àcids grassos lliures (Auwerx J *et al*, 1992).

En segon lloc afectaria el nombre de partícules VLDL que, un cop sintetitzades, serien alliberades a la sang. Williams i col·laboradors van demostrar que una part important de les VLDL sintetitzades era immediatament recaptada per les cèl·lules hepàtiques, *in vitro* (Williams KJ *et al*, 1991). Aquesta recaptació estava provocada per modificacions en la

lipoproteïna induïdes per la LPL. Un funcionament reduït de la LPL podria resultar, doncs, en una aparent sobreproducció de VLDL.

En últim lloc podria afectar la retirada de remanents de lipoproteïnes en triglicèrids que es veu facilitada per la unió de la LPL als proteoglicans situats en la superfície cel·lular i adjacents als receptors hepàtics (Eisenberg S *et al*, 1992).

Integrant tota aquesta informació es podria hipotetitzar que en aquests pacients hi ha un flux exagerat d'àcids grassos cap el fetge que estimula la síntesi d'apo B. Això resulta en una hipersecreció de VLDL que provoca hipertrigliceridèmia. El posterior processament d'aquestes VLDL explicarà els diferents fenotips observats. Si també hi ha augment de la lipòlisi es potencia la formació de LDL (fenotip IIa), quan la lipòlisi no pot compensar la sobreproducció de VLDL hi ha una hipertrigliceridèmia aïllada (fenotip IV). El cas intermedi donarà lloc al fenotip IIb.

Aquesta és una hipòtesi versemblant però que no explica quins factors determinen el grau de lipòlisi o d'aclariment de les lipoproteïnes remanents.

1.5.5. Bases genètiques

La presència d'un component genètic en la HLFC es posa de manifest amb elements com l'existència d'antecedents familiars de cardiopatia isquèmica prematura o la presència de diversos individus afectes dins d'una mateixa família. Són diverses les estratègies que s'han utilitzat per conèixer les característiques genètiques d'aquesta alteració.

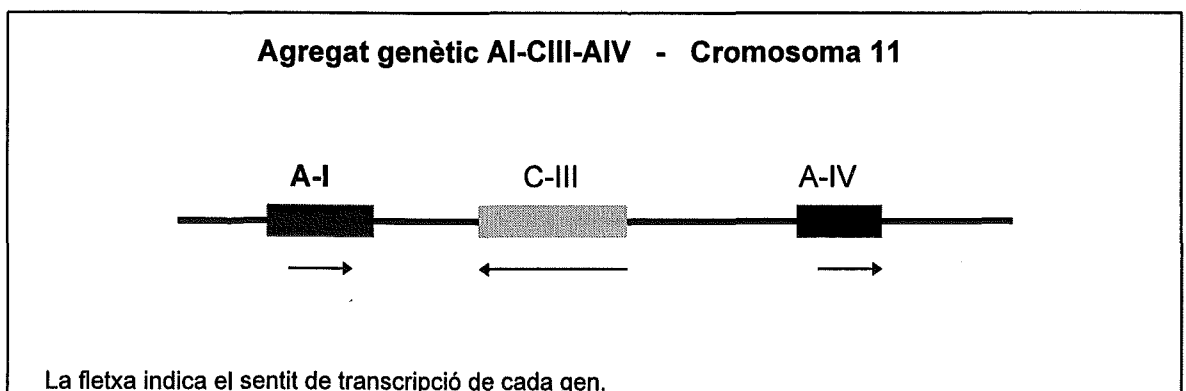
Una d'elles es basa en les anomenades *Complex segregation analysis*, o anàlisi de segregació complexa, on es dissenyen models genètics hipotètics i es posen a prova aplicant-los a famílies afectes. Els resultats obtinguts emprant aquesta metodologia fan pensar que hi ha un gen (desconegut de moment) amb un efecte molt important sobre els triglicèrids en la HLFC (Cullen P *et al*, 1994). Altres estudis suggereixen l'existència d'un *locus* amb un efecte important sobre les elevacions plasmàtiques d'apo B específiques de la HLFC (Jarvik GP *et al*, 1993). No s'ha trobat, però, cap evidència d'un gen que tingui un efecte similar sobre el colesterol. S'ha senyalat que hi hauria un *locus* responsable de les elevacions plasmàtiques d'apo B i un de diferent que actuaria sobre el fenotip de les LDL.

(Austin MA *et al*, 1991) i que tots dos tindrien un efecte additiu en l'expressió de la HLFC (Jarvik GP *et al*, 1994).

Una metodologia més extesa és la que es basa en l'estudi de **gens candidats**. Aquests gens es consideren candidats a ser portadors d'una variant genètica que participi en l'etiologia de la HLFC degut al paper que la proteïna que codifiquen té en la fisiopatologia de l'alteració. Aquestes variants o mutacions genètiques, que si són relativament freqüents en la població general s'anomenen **polimorfismes genètics**, poden ser responsables d'un canvi estructural en la proteïna introduint alhora un canvi **funcional** que es relacioni amb la malaltia. És possible també que aquestes mutacions no alterin la proteïna que codifiquen però que estiguin relacionades amb la presència de la malaltia o amb algun tret clínic o analític. En aquests casos es diu que la mutació o polimorfisme està en **desequilibri d'unió** amb la mutació responsable del tret o la malaltia estudiats. La presència de **desequilibri d'unió** entre una mutació i un tret és indicatiu que en una regió **pròxima** a la de la mutació detectada es troba la **mutació funcional**, és a dir la que altera l'estructura o l'expressió de la proteïna, responsable de l'alteració que estem estudiant.

Són tres els gens o regions genètiques que s'han estudiat més a fons en relació a la HLFC : el gen de l'apo B, el gen de la lipoproteïna lipasa i l'agregat o *cluster* genètic que conté els gens de les apo A-I, C-III i A-IV (Figura 3). L'elecció d'aquests gens candidats s'ha fet sobre la suposició que les concentracions elevades d'apo B en plasma d'aquests pacients són el resultat d'un dels següents processos : sobreproducció d'apo B en el fetge, lipòlisi deficient de les VLDL relacionada amb un mal funcionament de la LPL, unió deficient de l'apo B al receptor LDL o un defecte en el propi receptor.

Figura 3



Gen de l'apolipoproteïna B

Fetes aquestes precisions, el gen de l'apo B semblava en un principi ser el candidat més lògic a afectar les seves pròpies concentracions en plasma. No obstant, els estudis realitzats fins ara indiquen clarament que el gen de l'apo B no és el gen clau en la regulació de les concentracions plasmàtiques d'apo B (Coresh J *et al*, 1992) així com tampoc és responsable de les LDL aterogèniques del tipus B (LaBelle M *et al*, 1991). Aquests resultats han estat també constatats en relació a la hiperlipèmia familiar combinada (Raugh G *et al*, 1990 ; Austin MA *et al*, 1991).

Gen de la lipoproteïna lipasa

L'interès en l'estudi d'aquest gen es va suscitar arrel del descobriment que un subgrup de pacients heterozigots per la deficiència de LPL presentaven un fenotip lipoproteic semblant al de la HLFC (Babirak SP *et al*, 1989). L'existència de baixa activitat LPL en pacients HLFC ha estat confirmada amb posterioritat (Seed M *et al*, 1994), no obstant, estudis genètics duts a terme en pacients HLFC (Gagné E *et al*, 1994) i en pacients HLFC amb baixa activitat LPL (Nevin DN *et al*, 1994) indiquen d'una forma prou convincent que mutacions en el gen de la LPL no són la principal causa de les alteracions de la LPL associades a la hiperlipèmia familiar combinada. El que van fer aquests treballs va ser suggerir que les alteracions en l'activitat LPL que presentaven alguns pacients HLFC eren d'origen funcional. Això va centrar part de l'interès en les proteïnes reguladores de l'activitat d'aquest enzim, les apolipoproteïnes C-II i C-III, sobretot en aquesta última per motius que s'exposen a continuació.

Agregat genètic AI-CIII-AIV

L'interès de l'agregat AI-CIII-AIV en relació a la HLFC el marca un estudi publicat per Wojciechowski i col·laboradors (Wojciechowski AP *et al*, 1991) on es descrivia un marcador genètic (Xmnl) que co-segregava amb la HLFC en set famílies estudiades. Tot i que alguns aspectes sobre el disseny d'aquest estudi són qüestionables i que els resultats no han estat confirmats amb posterioritat (Wijsman EM *et al*, 1992) aquest va ser el punt de partida d'un gran nombre d'estudis sobre la variabilitat genètica d'aquesta regió. Aquests estan referits sobretot al gen de l'apo A-I, on s'han detectat variacions relacionades amb les concentracions d'apo A-I i colesterol HDL (Sigurdsson G Jr *et al*, 1992 ; Xu CF *et al*, 1993), i

al gen de l'apo C-III on les variacions es relacionen amb les concentracions de la pròpia apo C-III i dels triglicèrids (Shoulders CC *et al*, 1991 ; Ordovas JM *et al*, 1991).

En relació a la HLFC s'ha trobat que variacions en aquesta regió genètica modulen les concentracions de triglicèrids (Xu CF *et al*, 1994) i les de colesterol LDL (Dallinga-Thie G *et al*, 1996).

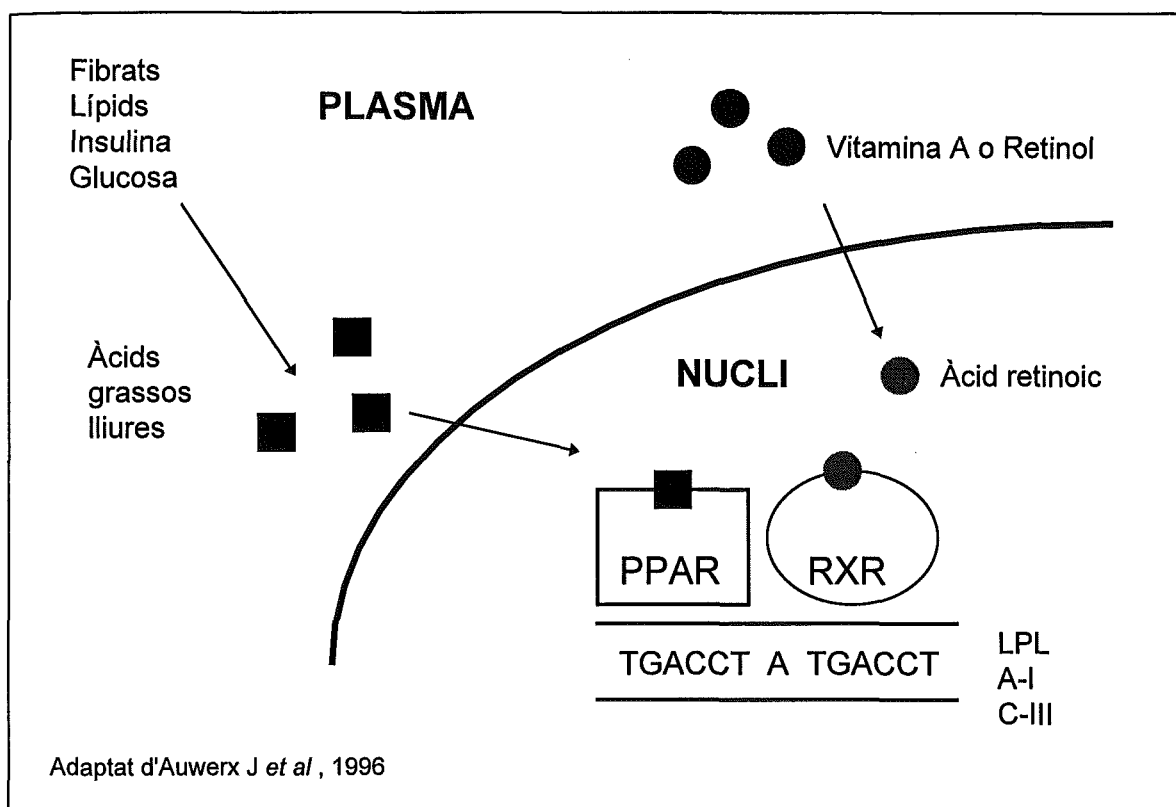
Dins de l'estudi de les bases genètiques de la HLFC no només són importants les alteracions en la seqüència del gen que puguin modificar l'estructura o l'expressió de la proteïna, també ho són aquells mecanismes que regulen la transcripció, i per tant de síntesi, d'aquestes proteïnes. En el context de la HLFC un d'aquests mecanismes és especialment rellevant ja que controla l'expressió, entre d'altres, dels gens de la LPL i l'apo C-III.

El sistema de regulació PPAR/RXR

Els gens de la LPL i l'apo C-III són regulats per agents com els fibrats o els àcids grassos de la dieta (Auwerx J *et al*, 1996). Aquests tenen un efecte estimulador sobre el gen de la LPL (Schoonjans K *et al*, 1996) i inhibidor sobre el gen de l'apo C-III (Staels B *et al*, 1995). Més concretament, la pertorbació metabòlica que indueixen aquests factors provoca l'activació d'una classe de proteïnes que pertanyen a la superfamília de receptors nuclears PPAR (*Peroxisome proliferator activated receptors*) (Schoonjans K *et al*, 1996). Aquestes formen heterodímers amb el RXR (*9-cis-retinoic acid receptor*) que reconeixen regions específiques dels promotors dels gens esmentats i que, per tant, controlen la seva expressió. Aquests dos elements, PPAR i RXR, han d'ésser activats per promoure aquest efecte regulador. Els PPARs s'activen, tal com s'ha dit, a partir de l'acció d'agents hipolipemians com els fibrats o d'altres estímuls dietètico-ambientals. El RXR és activat per l'àcid retinoic, la forma activa intracel·lular de la vitamina A (Figura 4).

Per tant hom podria interpretar que la regulació d'aquests gens, i per extensió del metabolisme dels triglicèrids, està regulada per un sistema l'eficàcia del qual podria dependre de la disponibilitat de vitamina A.

Figura 4



1.5.5. Models animals

Només hi ha un model animal acceptat com a model de la hiperlipèmia familiar combinada. Aquest és el conill hiperlipèmic desenvolupat al *St. Thomas Hospital* per La Ville i col·laboradors (La Ville AE *et al*, 1987). Aquest conill és una soca hiperlipèmica del conill *New Zealand White* que pot presentar hipercolesterolèmia i/o hipertrigliceridèmia, patrons lipoproteics variables, arteriosclerosi prematura, sobreproducció hepàtica d'apo B en VLDL i LDL i activitat del receptor LDL normal.

Les noves tècniques de manipulació genètica que permeten obtenir animals que sobreexpressen una proteïna humana (transgènics) o que estan mancats d'un gen concret (*knockout*) tot i que són molt útils per conèixer la funció fisiològica de determinades proteïnes no han permès encara obtenir un model genèticament manipulat de la HLFC. No

obstant les característiques d'alguns ratolins on s'han manipulat els gens d'apolipoproteïnes humanes fan pensar que això pot ser possible en un futur. Així, el ratolí *knockout* per l'apo A-II té baixes concentracions plasmàtiques d'àcids grassos lliures, glucosa i insulina així com un augment en la retirada de remanents. El cas contrari és característic de la HLFC, per tant, aquests resultats suggereixen que un excés d'apo A-II podria provocar un fenotip semblant al de la HLFC (Weng W *et al*, 1996). Un segon exemple és el del ratolí transgènic per l'apo C-I humana que desenvolupa hiperlipèmia combinada (Shachter NS *et al*, 1996).

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

2.1. Hipòtesi

Alteracions dels gens de les apolipoproteïnes codificades en l'agregat genètic AI-CIII-AIV i dels seus mecanismes de regulació participen en la patogènia de la hiperlipèmia familiar combinada.

2.2. Objectius

Aquest treball té com objectiu general millorar el coneixement d'aspectes metabòlics i genètics de la hiperlipèmia familiar combinada que contribueixin a entendre la seva etiopatogènia. Els objectius concrets han estat:

- Estudiar la relació entre el polimorfisme C₁₁₀₀-T del gen de l'apolipoproteïna C-III i el perfil lipoproteic dels pacients amb HLFC.
- Mesurar les concentracions plasmàtiques de retinol en pacients amb HLFC com a indicador de possibles alteracions dels mecanismes de regulació gènica dependents d'àcid retinoic.
- Estudiar la relació entre les HDL d'aquests pacients, l'activitat de l'enzim LCAT i el polimorfisme G₇₅-A del gen de l'apolipoproteïna A-I.

Objectius secundaris:

- Determinar la prevalença d'hiperlipèmia entre els descendents dels pacients amb HLFC i caracteritzar el seu perfil lipoproteic.
- Comparar diferents mètodes per a determinar les isoformes de l'apolipoproteïna E.

3. PACIENTS I MÈTODES

3.1. Pacients

Els 16 pacients HLFC del present estudi es van seleccionar del Dispensari de Lípids de l'Hospital Universitari de Sant Joan de Reus. Un cop identificats es van reclutar les seves famílies amb un total de 106 individus. D'aquests, 32 van ser hiperlipèmics i 74 normolipèmics.

3.1.1. Criteri diagnòstic

Es va diagnosticar HLFC a tots aquells individus amb concentracions plasmàtiques de colesterol i triglicèrids superiors a 6.4 mmol/l i 2.8 mmol/l, respectivament, i amb almenys un familiar de primer grau amb colesterol o triglicèrids plasmàtics superiors als esmentats valors. Dos mesos abans de l'estudi els pacients van deixar de prendre fàrmacs hipolipemiants tot i que van seguir les dietes recomenades. En la taula 1 es mostren els seus valors lipídics en el moment de la selecció (A) i a l'inici de l'estudi (B).

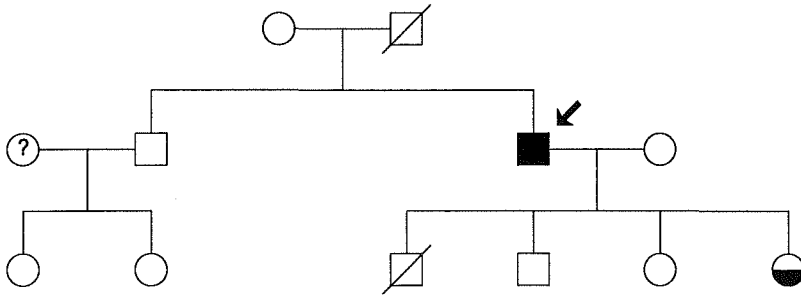
TAULA 1. Valors lipídics, en mmol/l, dels 16 pacients HLFC.

Família	Pacient	Edat	Sexe	Chol A/B	Trig A/B	HDLc	ApoE
1	1	51	H	7.1/6.5	3.1/2.9	1.2	3/4
2	2	29	H	8.1/6.8	3.0/2.0	1.1	3/3
3	3	54	D	8.7/6.0	4.8/2.6	1.7	3/3
4	4	48	H	8.7/8.2	3.3/3.3	1.4	3/4
5	5	42	H	6.9/6.5	6.5/2.1	1.0	3/3
6	6	44	H	6.4/5.8	5.0/2.4	0.9	3/3
7	7	54	H	7.8/6.5	6.6/2.0	1.1	3/3
8	8	59	D	7.0/6.1	4.4/2.8	1.5	3/3
9	9	62	H	8.3/6.7	3.3/3.1	1.1	3/3
10	10	47	H	7.3/6.3	4.5/3.2	0.7	3/4
11	11	46	H	6.9/6.7	6.8/2.2	0.7	3/4
12	12	57	D	9.4/7.6	3.2/2.9	1.3	3/3
13	13	51	H	7.8/8.2	3.6/3.5	2.1	3/4
14	14	53	H	6.3/5.2	9.1/1.5	1.7	3/3
15	15	36	H	6.6/6.3	3.9/1.9	0.9	3/3
16	16	32	H	9.8/7.6	5.9/2.1	0.9	3/3
16		48(9)		7.7(1.0)	4.8(1.7)	1.2(0.4)	

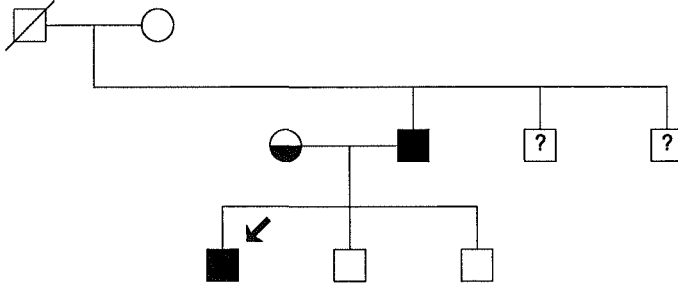
Es va excloure tots aquelles individus amb hiperlipèmies secundàries i es va determinar el genotip d'apo E per detectar una possible hiperlipèmia tipus III.

3.1.2. Composició de les famílies

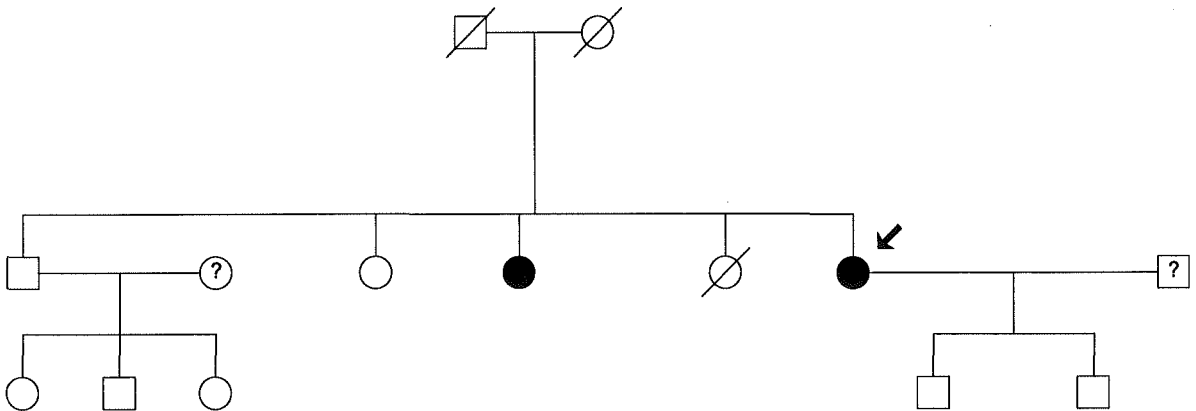
Família 1



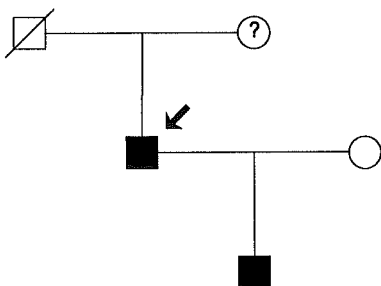
Família 2



Família 3



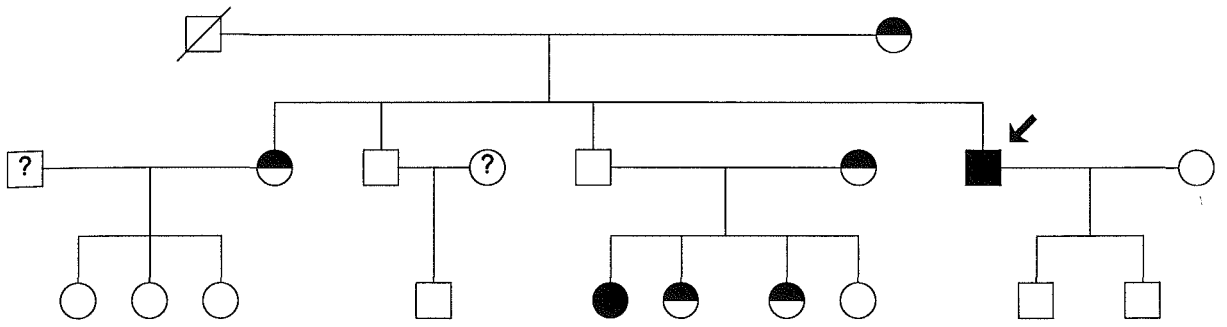
Família 4



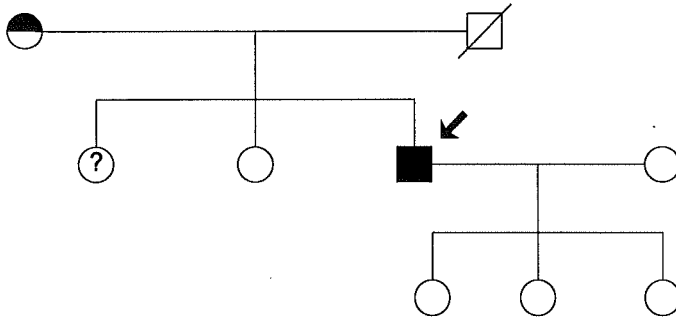
Symbol definitions

- ○ No afecte
- ● Hipercol + hipertrig
- ? ? No disponible
- ◻ ◐ Hipertrigliceridèmia

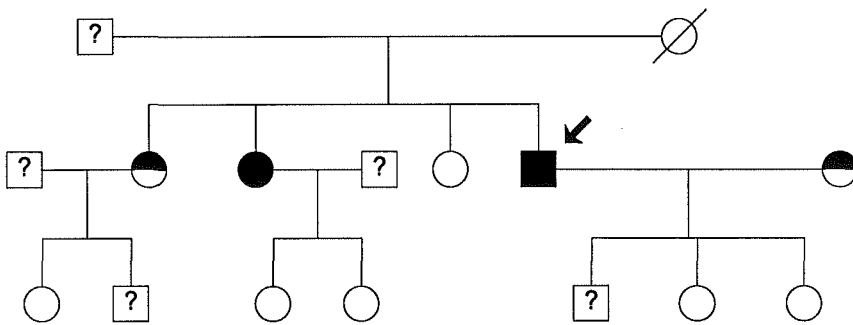
Família 5



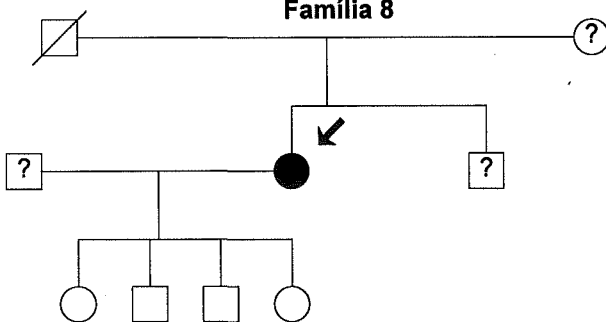
Família 6



Família 7



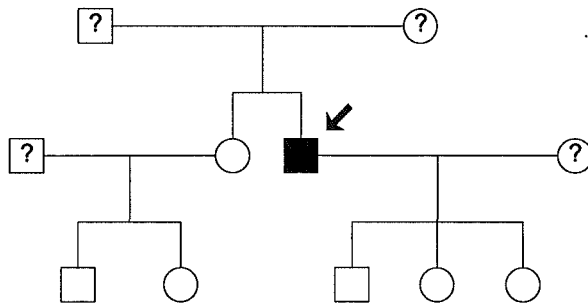
Família 8



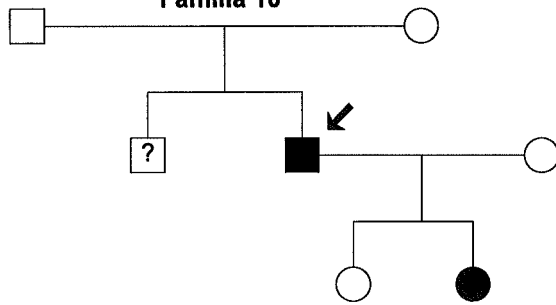
Symbol definitions

- ○ No afecte
- ● Hipercol + hipertrig
- ? ○ ? No disponible
- ● Hipercolesterolèmia

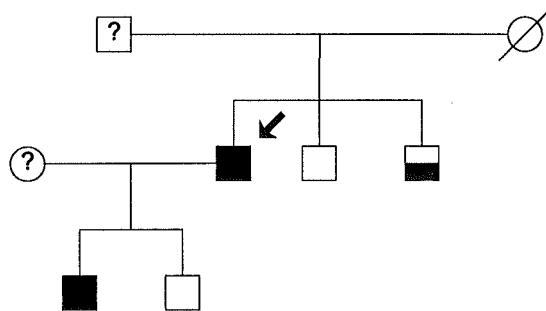
Família 9



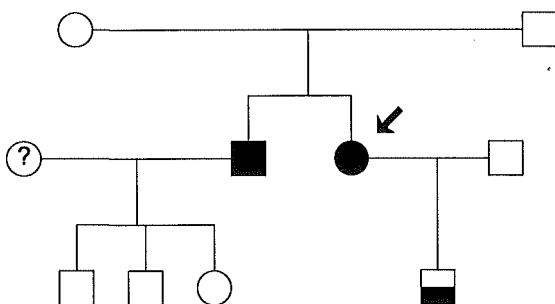
Família 10



Família 11



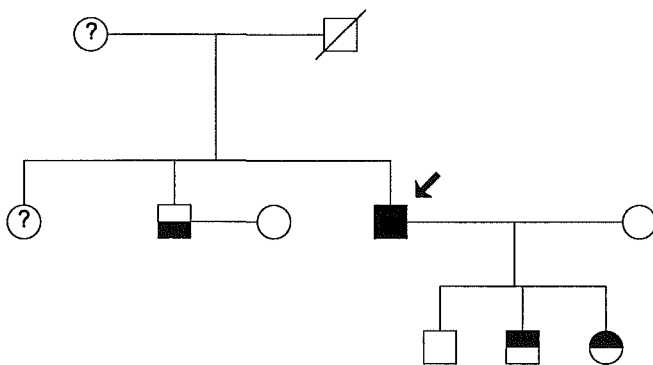
Família 11



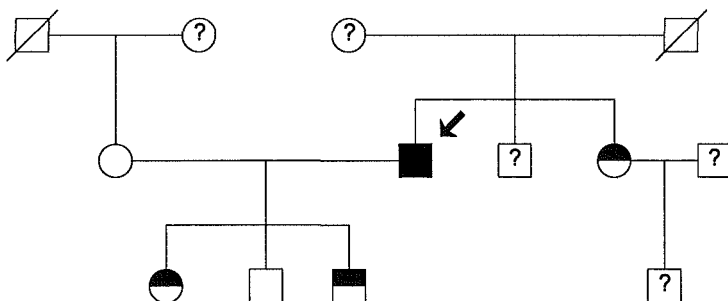
Symbol definitions

- ○ No afecte
- ● Hipercol + hipertrig
- ? ? No disponible
- ◻ ◐ Hipertrigliceridèmia

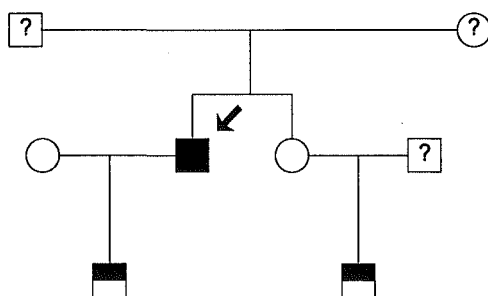
Família 13



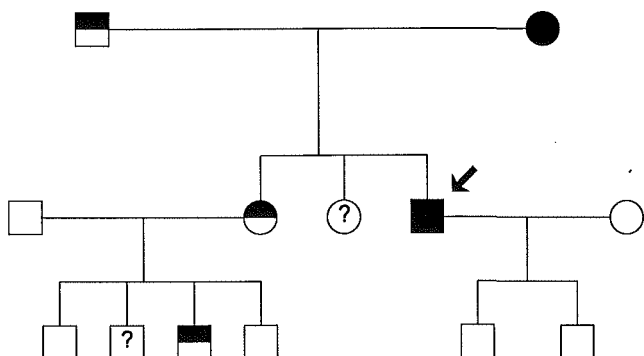
Família 14



Família 15



Família 16



Symbol definitions

- ○ No afecte
- ● Hipercol + hipertrig
- ? ○ ? No disponible
- ● Hipercolesterolèmia
- ● Hipertrigliceridèmia

3. 2. Mètodes

En aquest apartat es descriuen en detall les tècniques més rellevants emprades en aquest estudi. Donat que el format de determinades revistes científiques exigeix que la metodologia utilitzada sigui referenciada i presentada de forma resumida, aquesta secció recull tots els detalls metodològics no contemplats en els articles.

3.2.1. Fraccionament lipoproteic. Ultracentrifugació seqüencial.

El perfil lipoproteic dels individus estudiats es va obtenir pel mètode d'ultracentrifugació seqüencial preparativa (Havel RJ *et al*, 1955). Aquest mètode es basa en la diferent flotabilitat que tenen les partícules lipoproteiques sotmeses a força centrífuga. Per a la separació es va utilitzar una ultracentrífuga model Teknicon T-1055 i un rotor 45'6 Kontron (Kontron, Suïssa). Es van emprar tubs de polialòmer, d'una capacitat de 6 ml.

Aïllament de les VLDL (0.95 - 1.006 g/ml)

Les VLDL es van aïllar a partir de 2 ml de plasma als que es van afegir 3ml de solució de densitat 1.006 g/ml en capa. Es van centrifugar a 37.000 rpm, a 4°C durant 20 hores. Després es van recollir 2ml del sobrenedant que contenien les lipoproteïnes de densitat inferior a 1.006 g/ml.

Aïllament de les IDL (1.006 - 1.019 g/ml)

Als 3 ml d'infranedant de densitat 1.006 g/ml que restaven s'hi va afegir 1 ml de solució de la mateixa densitat. Es va afegir 1 ml de solució de densitat 1.071 g/ml per obtenir una densitat mitjana de 1.019 g/ml que després de la centrifugació a les mateixes condicions permetés de recollir les IDL.

Aïllament de les LDL (1.019 - 1.063 g/ml)

Es va repetir el procés anterior però es va afegir 1 ml de solució 1.239 g/ml. Després de la ultracentrifugació es van recollir els 2 ml del sobrenedant que contenien les LDL.

Aïllament de les HDL (1.063 - 1.210 g/ml)

Es van afegir 2 ml de solució 1.063 g/ml i 1 gram de bromur sòdic (NaBr). Després de la ultracentrifugació a 37.000 rpm, 4°C i 40 hores es va obtenir la fracció que contenia les HDL.

REACTIUS I SOLUCIONS**Solució conservant**

0.5 g cloramfenicol levògic pur

1.0 g sulfat de gentamicina

4.1 g EDTA Na₂

100 ml aigua destil·lada

pH 7.4

Utilitzar 10 µl de solució per cada ml de mostra.

Solucions de densitat**Densitat 1.006 (g/ml) :**

20.7 g NaCl

0.2 g EDTA Na₂

2 ml NaOH 1 M

2 L aigua destil·lada

Densitat 1.239 (g/ml) :

328 g NaBr

1 L aigua destil·lada

Densitat 1.019 (g/ml) :

4 :1, 1.006 - 1.071

Densitat 1.063 (g/ml) :

4 :1, 1.019 - 1.239

Densitat 1.071 (g/ml) :

4 :1, 1.239 - 1.019

Densitat 1.291 (g/ml) :

410 g NaBr

1 L solució 1.063 g/ml

EQUACIONS PER A LA ULTRACENTRIFUGACIÓ SEQÜENCIAL

- I. Equació de Radding - Steinberg (Radding CHM i Steinberg D, 1960)

$$V_0 D_0 + X = d(V_0 + V_x)$$

On X és la quantitat de NaBr a afegir, en grams, V_0 és el volum inicial en ml, D_0 la densitat inicial, d la densitat desitjada i V_x el volum específic aparent del NaBr en la solució final.

- II. Equació de Havel (Havel RJ *et al*, 1955)

$$(AY) + (BZ) = (A + B) X$$

On A és el volum de sèrum o infranadant, B el volum de solució de densitat, Y la densitat de la mostra que ha de ser modificada, Z la densitat de la solució de densitat i X la densitat de la barreja o densitat desitjada.

Precipitació selectiva de les HDL

S'utilitzen dues solucions de polietilènglicol (PEG) que difereixen en la seva concentració i el seu pH. Amb la primera de les solucions es precipiten les lipoproteïnes que contenen apo B (LDL i VLDL) i això permet recuperar en el sobrenadant la HDL total. En una reacció paral·lela, i mitjançant la segona de les solucions, es precipiten totes les lipoproteïnes excepte la HDL₃. Després es determina la concentració de colesterol en la HDL total i la HDL₃. La diferència entre aquests valors ens permetrà saber el colesterol contingut en la fracció HDL₂.

3.2.2. Hibridació amb oligonucleòtids específics (ASO).

Aquesta tècnica permet determinar el genotip d'un individu per una regió polimòrfica concreta del genoma. És una tècnica que es basa en l'amplificació de la regió que conté el polimorfisme mitjançant la tècnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), la transferència d'aquest ADN amplificat a un suport sòlid (membrana de niló) i la hibridació d'aquest ADN amb dues sondes, una amb la seqüència salvatge i l'altra amb la seqüència mutada.

Un dels trets característics d'aquesta tècnica és que permet determinar de forma simultània el genotip d'un elevat nombre d'individus.

Amplificació mitjançant la PCR

La seqüència dels oligonucleòtids emprats i les condicions pel que fa a temperatura, temps i número de cicles estan descrites en la secció *Resultats i Discussió* dins dels estudis 2 i 4 en els que aquesta tècnica ha estat emprada.

Doble transferència de l'ADN a una membrana de niló

L'objectiu d'aquesta tècnica és transferir l'ADN amplificat d'un suport semi-sòlid com és un gel d'agarosa a un suport sòlid i manejable com és una membrana de niló. Aquesta transferència facilitarà en gran manera totes les operacions posteriors. Un altre aspecte important d'aquesta transferència doble és que permet tenir dues membranes amb còpies idèntiques d'ADN. Els passos a seguir es descriuen a continuació :

1. Mantenir el gel durant 40 minuts en solució desnaturalitzant i agitació orbital.
2. Disposar el gel sobre una superfície sòlida.
3. Disposar una membrana de niló Hybond N⁺ (Amersham), sense sucari en solució desnaturalitzant, sobre el gel. Fer unes marques sobre la membrana que permetin identificar amb posterioritat la part inferior i la superior.
4. Disposar a sobre de la membrana un paper Watman 3M sucari en solució desnaturalitzant.
5. Cal evitar que en els passos 3 i 4 quedin bombolles.
6. Posar un gruix de 4 cm de paper absorbent.

7. Donar la volta a l'estructura de manera que el paper absorbent quedi en contacte amb el taulell i l'altra cara del gel a la superfície.
8. Repetir l'operació (passos 1-6) sobre la cara lliure del gel.
9. Esperar unes 4 hores per a que es produeixi la transferència.
10. Retirar les dues membranes i posar-les en solució desnaturalitzant durant 30 minuts.
11. Esvandir-les durant uns 20 segons amb 5 x SSC.
12. Guardar-les entre dos fulls de paper Watman 3M.
13. Si es fa servir una membrana de nylon no cal exposar-la a llum UV per fixar l'ADN a la membrana.

REACTIUS I SOLUCIONS

Solució desnaturalitzant

0.5 M NaOH

1.5 M NaCl

20 x SSC

3.0 M NaCl

0.3 M $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$

pH 7.0

Marcatge de les sondes

Abans d'hibridar l'ADN del pacient amb les sondes salvatge i mutada cal marcar aquestes sondes per a poder detectar-les amb posterioritat. En aquest estudi hem dut a terme un marcatge de tipus radioactiu utilitzant el radioisòtop ^{32}P . Els passos de què consta el marcatge d'aquests oligonucleòtids es detallen a continuació :

1. Preparar la barreja de reacció amb la sonda, la quinasa i el seu tampó, i el radioisòtop.
2. Incubar a 37°C durant 1 hora.

3. Preparar unes columnes de Sephadex G-25 per a purificar la sonda marcada.
4. Un cop finalitzada la reacció de marcatge de la sonda, afegir-hi 50 μl d'aigua destil·lada.
5. Carregar el contingut en una de les columnes de Sephadex i centrifugar 3 minuts a 1.500 rpm.
6. Recollir la sonda purificada i fer un contactge de la radioactivitat que ha incorporat la sonda.

REACTIUS I SOLUCIONS

Barreja de reacció

0.3 μl (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ADN
5.0 μl	Tampó de quinasa
38 μl	Aigua destil·lada
2-5 μl	(α - ^{32}P) dATP
2 μl	Quinasa T4

Hibridació específica

En aquest pas una de les membranes amb l'ADN del pacient és hibridada amb la sonda salvatge i l'altre amb la sonda mutada. Segons hi hagi unió o no, podem establir les condicions d'homozigot salvatge, homozigot mutant o heterozigot en cadascun dels pacients. Els passos de què consta aquesta hibridació específica es detallen a continuació :

1. Disposar les dues membranes en dos flascons d'hibridació.
2. Afegir 10 ml de solució de pre-hibridació als flascons i incubar en un forn d'hibridació durant uns 10-15 minuts a una temperatura 5°C inferior a la temperatura de *melting* de l'oligonucleòtid.
3. Llençar la solució de pre-hibridació i afegir-n'hi 3 ml.
4. Afegir la sonda marcada amb cura de dipositar-la al fons del flascó. Afegir unes 1×10^6 cpm per ml de solució d'hibridació.

5. Incubar durant 1 hora a la mateixa temperatura.
 6. Retirar les membranes dels flascons d'hibridació i procedir a rentar l'excés de sonda.
 7. Escalfar en una safata solució de rentat a una temperatura pròxima a la temperatura de *melting* de l'oligonucleòtid.
 8. Quan aquesta hagi assolit la temperatura desitjada, introduir-hi la membrana durant uns 2 minuts.
 9. Retirar la membrana, assecar-la lleugerament amb paper Watman i preparar-la per a exposar-hi pel·lícula d'autoradiografia.
-

REACTIUS I SOLUCIONS

Solució de pre-hibridació / hibridació

5 x SSPE

5 x Solució de Denhardt

0.5 % SDS

20 x SSPE

174 g NaCl

27.6 g NaH₂PO₄·H₂O

7.4 g EDTA

800 ml aigua destil·lada

pH 7.4 ajustar el volum a 1 litre

50 x Solució de Denhardt

5g Ficoll

5g Polivinilpirrolidona

5g BSA

500 ml Aigua destil·lada

Filtrar-ho

Solució de rentat

5 x SSC

0.1 % SDS Per 1 litre

3.2.3. Determinació de les concentracions plasmàtiques de retinol.

En l'estat post-absortiu la vitamina A es troba en plasma associada a la proteïna RBP (*Retinol Binding Protein*) i la seva concentració és un bon indicador de l'*status* de vitamina A en la població o els individus estudiats. Els passos per a la determinació d'aquestes concentracions es detallen a continuació :

Recollida de la mostra

És preferible extraure les mostres en tubs amb heparina ja que l'oxalat, el citrat i l'EDTA poden induir certes pèrdues en el retinol. Cal prendre les mesures apropiades per protegir la mostra de la llum i l'oxigen, a les quals la vitamina A és sensible. Aquestes mesures s'han de mantenir durant el procés d'extracció.

Extracció

Per a l'extracció de les vitamines de la resta de components del plasma se segueixen els següents passos :

1. Pipetejar 100 μ l de plasma en un tub de 1.5 ml.
2. Afegir 100 μ l d'una solució etanòlica d'acetat *all-trans* de retinol (1 μ g/ml) que es farà servir com estàndard intern. La missió d'aquest estàndard intern, que és una forma química del retinol que no es troba en plasma, és avaluar la pèrdua de vitamina que es produeix durant el procés d'extracció.
3. Barrejar amb *vortex* durant 15 segons.
4. Afegir 200 μ l de n-hexà i barrejar amb *vortex* durant 30 segons. Mantenir els tubs en rotació horitzontal durant 30 minuts.
5. Centrifugar en una micro-centrifuga durant 5 minuts i separar la fase superior (hexà) de la fase inferior (aigua-etanol).
6. Transferir la fase superior (hexà) a un tub net. Assecar sota un flux de nitrogen.
7. Immediatament abans d'injectar la mostra en el HPLC, reconstituir-la amb 100 μ l d'etanol i barrejar-ho breument amb *vortex*.
8. Injectar 20 μ l de la mostra reconstituïda en la columna.

Condicions de HPLC

- Columna : Spherisorb - ODS 2 (12.5 cm x 5 cm).
Fase mòbil : Metanol (98%)
Flux : 1 ml/min
Detecció : Absorbància a 325 nm.

3.2.4. Determinació de l'activitat de l'enzim LCAT.

L'activitat de l'enzim LCAT es determina mesurant la conversió de colesterol lliure marcat a colesterol éster a partir de la incubació de liposomes amb apo A-I i l'enzim.

Obtenció d'apolipoproteïna A-I purificada per cromatografia d'afinitat.

1. Deslipidar la HDL afegint 10 volums d'etanol :éter (3 :2 v/v) i deixar-ho a 20°C durant 12 hores.
2. Centrifugar a 4°C, 15 minuts, 3.000 rpm. Retirar els solvents.
3. Afegir 10 volums d'éter fred i deixar-ho 2 hores a -20°C. Centrifugar i repetir l'operació. Deixar 12 hores a -20°C. Assecat la mostra congelada sota un flux de nitrogen o àrgon.
4. Dissoldre la proteïna amb una solució de glicina (50 mM), NaOH (4 mM), NaCl (0.5 M) i urea (6 M) a pH 8.8.
5. Carregar-ho a la columna d'afinitat i recollir les fraccions.
6. Llegir les absorbàncies a 280 nm. El pic més alt correspon a l'apo A-I.
7. Dialitzar les fraccions amb tampó A.
8. Guardar les alíquotes a -70°C.

Preparació del substrat.

1. Pipetejar en un vial de vidre : 154 µl de lecitina d'ou (50 mg/ml), 116 µl de colesterol dissolt en etanol (1mg/ml) i 108 µl de (4-¹⁴C) colesterol.
2. Barrejar i assecat sota un flux de nitrogen a temperatura ambient.
3. Afegir 2.5 ml de tampó A, 0.8 ml d'apo A-I (1.1 mg/ml) i 0.3 ml de colat sòdic (7.5 mM).
4. Barrejar durant 1 minut i incubar 20 minuts a 24°C amb agitació.
5. Dialitzar amb tampó A, 20 hores a 4°C.

6. Ajustar el substrat dialitzat a 4 ml amb tampó A.
7. Preparar 50 μ l amb 4 ml d'aquasol per al comptador beta.

Assaig

1. Emprar tubs de vidre amb rosca.
2. Afegir 235 μ l tampó A, 125 μ l d'albumina humana (2%) i 100 μ l del substrat.
3. Incubar 15 minuts a 37°C.
4. Afegir 25 μ l de mercaptoetanol i 15 μ l de plasma.
5. Barrejar immediatament amb *vortex* i incubar durant 30 minuts a 37°C.
6. Incubar simultàniament mostres control sense l'enzim.
7. Aturar la reacció afegint 2 ml d'etanol.
8. El colesterol lliure i l'éster de colesterol s'extrauen de l'infranedant amb 4 ml d'hexà.
9. Evaporar l'extracte sota un flux de nitrogen.
10. Dissoldre'l amb 0.5 ml de cloroform.
11. Separar el colesterol lliure i els ésters de colesterol a partir de 25 μ l de mostra mitjançant cromatografia en capa fina (Silica gel H).
12. Visualitzar amb rodamina dissolta en etanol.
13. Rascar les bandes de l'éster de colesterol per a comptar-les en 4 ml d'aquasol.

REACTIUS I SOLUCIONS

Tampó A

- 10 mM Tris
- 140 mM NaCl
- 1 mM EDTA

pH 7.4 en 1 litre d'aigua destil·lada

3.2.5. Determinació del genotip de l'apolipoproteïna E.

La determinació de la isoforma d'apo E en el pacient HLFC és important ja que és necessària pel diagnòstic diferencial que permetrà no confondre-la amb la disbetalipoproteinèmia o hiperlipèmia tipus III. Clàssicament la isoforma d'apo E s'ha conegut determinant el fenotip de la proteïna per isoelectroenfocament. Aquesta tècnica, que comporta algunes dificultats en la interpretació dels resultats, s'ha vist complementada amb la possibilitat de determinar el genotip directament de l'ADN del pacient.

Per tal de valorar la fiabilitat i conveniència d'aquests mètodes vàrem realitzar un estudi en que es va determinar la isoforma de l'apo E a 121 mostres. De cada mostra es va determinar el fenotip i el genotip per restricció enzimàtica, SSCP i mitjançant in Kit comercial. Amb la determinació del genotip es va aconseguir un 100% de coincidència pel que fa als tres mètodes. Respecte al fenotip hi va haver un 6% de discrepàncies.

Es va concloure que la determinació del genotip era més senzilla i segura que la del fenotip. De les tres maneres de determinar el genotip, la del Kit era la més ràpida però més cara mentre que amb la tècnica del SSCP podien detectar-se a més noves mutacions.

Tots els aspectes comentats en aquest sumari estan desenvolupats en l'article que es presenta a continuació.

Determinació del genotip de l'apolipoproteïna E.

Vallvé JC, Margalef J, Ribalta J, Turner PR, Masana L.
*Comparación de la determinación de genotipos y fenotipos de
las isoformas de la apolipoproteína E. Clin Invest Arterios.*
1996 ;2 : 51-58.

Originals

Comparación de la determinación de genotipos y fenotipos de las isoformas de la apolipoproteína E

J.C. Vallvé, J. Margalef, J. Ribalta, P.R. Turner y L. Masana

Unitat de Recerca de Lípids, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili. Reus. Tarragona.

Debido a que, en general, la determinación de los fenotipos de la apolipoproteína E es más complicada y más larga que la determinación genotípica, hemos evaluado las ventajas de los métodos de determinación genéticos de las isoformas de apo-E frente a los fenotípicos. Los métodos utilizados para determinar el genotipo fueron: *a)* modificación del método descrito por Tsai et al (*Single-Strand Conformational Polymorphism*); *b)* mediante restricción enzimática con CfoI descrita por Hixson y Vernier, y *c)* mediante un kit comercial (INNOGENETICS N.V. Zwijnaarde, Bélgica). La determinación de los fenotipos se realizó a partir de la apo-E de las VLDL por isoelectroenfoque.

Se analizaron un total de 121 muestras. Los dos métodos genéticos presentaron un 100% de coincidencia. Sin embargo, al compararlos con los fenotipos determinados por isoelectroenfoque, se detectaron 7 muestras cuyos genotipos no coincidían con los fenotipos (6% de error). Los porcentajes de error por fenotipo fueron de un 16% al asignar los fenotipos 3/2, un 5,3% al asignar los 3/4 y un 5,6% al asignar los 3/3.

En general los métodos genéticos eliminan la mayoría de los inconvenientes de los métodos fenotípicos ya que producen una definición más clara de las bandas, son menos tediosos y mucho más fáciles de interpretar. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que los 2 métodos genéticos permiten determinar fácilmente los 6 genotipos más comunes, aunque con el método de restricción enzimática se obtiene una mejor definición de las bandas. Para la determinación de nuevas mutaciones es mejor la utilización de la

técnica del SSCP, ya que la restricción enzimática sólo detecta las nuevas mutaciones que alteren la secuencia de reconocimiento para la enzima. El kit comercial es el método más rápido de todos aunque por contra es relativamente caro y no permite detectar las nuevas isoformas.

Palabras clave:

Apolipoproteína E. Isoformas. Genotipos. Fenotipos. PCR. SSCP.

GENETIC VERSUS PHENOTYPE METHODS TO ASSESS APOLIPOPROTEIN E POLYMORPHISM

The phenotyping of apolipoprotein E takes more time and is more difficult to do than the genotype. For this reason we have evaluated the advantages of the genetic methods versus the phenotype methods. To assess the different isoforms of apolipoprotein E we used three methods: 1-a modification of the method described by Tsai et al (*Single Strand Conformational Polymorphism*), 2-by restriction isotyping with CfoI described by Hixson and Vernier and by a commercial kit (INNOGENETICS N.V. Zwijnaarde, Belgium). The phenotype of apolipoprotein E in VLDL was done by isoelectrofocusing.

We analyzed 121 samples. The genetic methods were in 100% agreement but when we compared these with the phenotype assignment we found 7 samples miss-assigned (6% error). The 2/3 phenotype showed a 16% error, the 3/4 a 5.3% error and the 3/3 a 5.6% error.

In general, the genetic methods eliminate most of the problems encountered with phenotype methods because they produce clearer bands, and are less tedious and easier to interpret.

Correspondencia: Dr. L. Masana.

Facultat de Medicina.

Sant Llorenç, 21. 43201 Reus. Tarragona.

CLIN. INVEST. ARTERIOSCLEROSIS, VOL. 8, NÚM. 2, 1996

From the results of this study we advocate the use of the two genetic methods to easily assign the 6 common genotypes of apolipoprotein E. However the restriction isotyping method gives clearer bands than the SSCP. For the determination of new mutations it is better to use the SSCP technique because the restriction isotyping can only detect new mutations which modify the restriction sites. The commercial kit is the quickest method but is relatively expensive, and new mutations cannot be detected.

Key words:

Apolipoprotein E. Isoforms. Genotypes. Phenotypes. PCR. SSCP.

Introducción

La apolipoproteína E (apo-E) se encuentra en los quilomicrones (QM) plasmáticos, en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de densidad intermedia (IDL) y de alta densidad (HDL). La apo-E desempeña un papel importante en el metabolismo lipídico mediando la internalización de los QM en los hepatocitos a través de receptores específicos para apo-E y de IDL mediante los receptores apo-B/E, habiéndose descrito su influencia en la absorción de lípidos por el intestino y otros tejidos¹.

El gen de la apo-E es polimórfico y está localizado en el cromosoma 19. Contiene 4 exones^{2,3} que codifican para los 299 residuos aminoácidos que componen la apolipoproteína madura⁴. Existen 3 alelos comunes del gen de la apo-E, ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 , que se heredan codominantemente y que codifican para 3 isoformas de la proteína E2, E3 y E4, respectivamente; en consecuencia se encuentran en la población 6 genotipos, 3 homocigotos y 3 heterocigotos, junto con algunas variantes raras. Las diferencias en las isoformas radican en los residuos aminoácidos de las posiciones 112 y 158 de la proteína; la isoforma E2 tiene Cys en las 2 posiciones, la E4 tiene Arg en las 2 posiciones y la E3, la isoforma más común, tiene Cys en la posición 112 y Arg en la posición 158⁵. Estas variaciones producen diferencias en las cargas netas de las diferentes isoformas, lo que permite su separación mediante técnicas de isoelectroenfoque⁵. El alelo ϵ_2 se asocia a concentraciones bajas de colesterol total plasmático excepto en los individuos homocigotos, que por acción de factores asociados presentan dislipemia tipo III, de apo-B y de colesterol LDL y a valores altos de apo-E plasmática, mientras que el alelo ϵ_4 produce el efecto contrario⁶. Por ello las variaciones genéticas en el *locus* de la

apo-E han sido consideradas un factor determinante de las concentraciones de lípidos plasmáticos y del riesgo relativo de arteriosclerosis. La región de unión de la apo-E al receptor está localizada entre los aminoácidos 136 y 158⁷, lo que explicaría por qué la isoforma E2, que difiere de la E3 en el residuo de la posición 158, sólo tiene un 1-2% de actividad de unión al receptor, y eso podría explicar, en parte, la disbetalipoproteinemia tipo III⁸.

Además de sus efectos lipídicos, recientemente el alelo ϵ_4 se ha identificado como un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer⁹; por ello la determinación de las isoformas de la apo-E se ha incluido en muchos estudios poblacionales. Esto ha hecho aumentar el interés para encontrar métodos que permitan una rápida determinación de estas isoformas. Tradicionalmente, los genotipos de apo-E se obtienen a partir de valoraciones fenotípicas determinadas por isoelectroenfoque a partir de la fracción purificada de VLDL o directamente del suero^{10,11}. Más recientemente, para aumentar la especificidad, el isoelectroenfoque se combina con inmunoblotting con suero que contiene un anticuerpo específico para la apo-E^{12,13}. En general la interpretación de los resultados con métodos fenotípicos es ambigua y confusa, en ocasiones debido a que los residuos de ácido siálico de la apo-E hacen migrar las isoformas como múltiples bandas¹⁴. Aunque estos residuos de ácido siálico pueden eliminarse mediante el tratamiento previo de la muestra con neuroaminidasas¹⁵, existen otros factores como modificaciones postraduccionales (glicación de la apo-E en individuos diabéticos¹⁶) o artefactos causados por un almacenamiento prolongado de la muestra¹³, que dificultan la interpretación. Con la secuenciación del gen de la apo-E y la identificación de las sustituciones específicas de las bases responsables de los diferentes polimorfismos⁴, se han desarrollado técnicas que permiten el análisis genético basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{14,15,17}, que han eliminado en gran parte los problemas de las técnicas anteriores. Algunos de estos métodos implican el uso de sustancias radiactivas¹⁸, y por tanto se tiende a limitar su uso, especialmente para la determinación de un elevado número de muestras. Los métodos de análisis genéticos no isotópicos son en general mucho más sencillos de realizar y mucho más rápidos de interpretar. Algunos estudios recientes han demostrado la existencia de diferencias entre la determinación genotípica y fenotípica^{19,21}. Debido a la existencia de una gran variedad de métodos, unos basados en el genotipo y otros en el fenotipo, para determinar las isoformas de apo-E y a que, en general, la valora-

ción fenotípica siempre es más complicada de realizar, en este estudio hemos evaluado cuáles son las ventajas de 3 métodos genéticos de determinación frente a la determinación fenotípica por isoelectroenfoque.

Métodos

Se aisló el ADN mediante el método de Miller et al²² de 121 sujetos a los que previamente se había determinado el fenotipo de apo-E por isoelectroenfoque en un gel de poliácridamida con un gradiente de pH de 4-6,5, después del aislamiento, dialización y deslipidación de las VLDL²³. Los fenotipos de estos 121 sujetos eran 53 3/3, 38 3/4, 12 3/2, 4 2/4, 11 4/4 y 3 2/2. El ADN fue amplificado por PCR y posteriormente se determinó el genotipo de apo-E mediante los siguientes métodos: a) una modificación del método del SSCP (*Single-Strand Conformational Polymorphism*) descrito por Tsai et al¹⁴; b) mediante el uso de la enzima de restricción CfoI (isoesquizomero HhaI) descrito por Hixson et al¹⁷, y c) mediante un kit comercial (INNO-LiPA Apo-E[®], INNOGENETICS N.V. Zwijnaarde, Bélgica).

Amplificación de la secuencia de apo-E

El ADN fue amplificado por PCR en un termociclador (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania) utilizando los oligonucleótidos G2210 (5'-ACAGAATTCGCCCGGCCTGGTACAC-3') y G2211 (5'-TAAGCTGGGGCACGGCTGCCAAGGA-3') descritos por Hixson et al¹⁷ que amplifican una región de 244 pb desde el codón 91 hasta el 165. Cada cóctel de reacción contenía 1 µg de ADN genómico, 0,01 µg/µl de cada oligonucleótido, 10% de DMSO, 5 µl de 10XPCR y una unidad de Taq polimerasa en un volumen final de 50 µl. La composición del 10XPCR era: 500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 15 mM MgCl₂, 2 mM de cada dNTP y 0,01% (w/v) de gelatina. Al cóctel de reacción se le añadieron 50 µl de aceite mineral para evitar las evaporaciones.

El protocolo de amplificación consistía en 2 ciclos formados por una desnaturalización a 95 °C durante un minuto, seguida de una hibridación de los oligonucleótidos a 65 °C durante un minuto y de una extensión a 72 °C durante 2 minutos; a estos 2 ciclos siguieron 30 formados por una desnaturalización a 95 °C durante un minuto seguida de una hibridación a 60 °C durante un minuto y de una extensión a 72 °C durante 2 minutos.

A continuación, con los productos de la amplificación, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio. Este gel se observó en un transiluminador de ultravioleta para confirmar la presencia del producto amplificado de 244 pb.

SSCP análisis

La técnica del SSCP está basada en la propiedad que tienen las cadenas sencillas de ADN de adoptar estructuras secundarias después de que éste haya sido desnaturalizado. Dependiendo de la composición en bases de las cadenas de ADN, éstas adoptan diferentes conformaciones secundarias que permiten diferenciarlas en un gel de poliácridamida.

Después de la amplificación del ADN se mezclaron 12 µl del producto con 12 µl de tampón de carga [98% (v/v) de formamida, 50 mM de EDTA, 0,01% (w/v) de xileno de cianol y 0,01% (w/v) de azul de bromofenol]. Esta mezcla se desnaturalizó durante 3 minutos a 95 °C y se puso en hielo rápidamente antes de sembrarla en un gel de poliácridamida al 12%. La electrofo-

resis se realizó en un gel vertical formado con el sistema Prolean[™] (BIO-RAD, California, USA) en un tampón TBE (trisborato-edta) a pH 8,0. Las condiciones de la electroforesis fueron las siguientes: 124 g/l de poliácridamida, 100 ml/l de glicerol, a 250 V y 40 mA durante 8 horas y a 4 °C. Después de la electroforesis el gel se reveló mediante tinción en plata²⁴.

Restricción con CfoI

El hecho de que las mutaciones en las posiciones 112 y 158 de la apo-E afecten los puntos de corte para la enzima CfoI nos permite una fácil determinación de los genotipos, mediante la observación de los diferentes patrones de bandas. La enzima CfoI reconoce específicamente la secuencia de 4 bases siguiente GCGC. La secuencia amplificada de la isoforma E4 tiene 6 puntos de corte para CfoI en una zona que incluye los 2 codones, que codifican para 2 Arg, de las posiciones 112 y 158. La isoforma E3 presenta un residuo de Cys en la posición 112 (GTGC) que anula un punto de corte para CfoI. Esto hace que esta isoforma sólo presente 5 puntos de corte en relación con E4. La isoforma E2 presenta 2 residuos de Cys en las posiciones 112 (GTGC) y 158 (GTGC) que anulan 2 puntos de corte para CfoI resultando en un total de 4 puntos de corte en relación con E4.

A 10 µl de producto de amplificación se añadieron 5 unidades de CfoI (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) así como 1,5 µl de tampón L y 3 µl de H₂O bidestilada. La digestión se llevó a cabo a 37 °C un mínimo de 3 horas. Después de la digestión cada cóctel de reacción se sembró en un gel de poliácridamida al 12% de iguales características al realizado para la técnica del SSCP pero sin glicerol. Las condiciones de electroforesis fueron: 124 g/l de poliácridamida a 250 V, 40 mA durante 2 horas. Después de la electroforesis, para obtener una mayor resolución de las bandas se reveló mediante tinción de plata. El tamaño de las bandas se observó mediante comparación con el marcador de peso molecular V (pBR 322 DNA, HaellII)

Determinación con el kit comercial (INNO-LiPA Apo-E)

La determinación de los genotipos mediante el kit comercial se realizó sobre 10 muestras con el fenotipo de apo-E determinado previamente por isoelectroenfoque y con el genotipo determinado en nuestro laboratorio por digestión con CfoI y por SSCP.

El test con INNO-LiPA está basado en el principio de hibridación reversa. El ADN amplificado se hibrida con sondas específicas que están inmovilizadas en unas cintas. Durante la amplificación, los oligonucleótidos que están marcados con biotina se incorporan a los fragmentos de ADN amplificados. Después de la hibridación del producto de amplificación con las sondas, se añade estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina, que se une a la biotina del complejo previamente formado. Seguidamente se incuba con el cromógeno BCIP/NBT y como resultado se obtiene un precipitado unido a la cinta de color marrón púrpura. Cada cinta contiene 4 sondas unidas, y la combinación de ellas da lugar a los diferentes genotipos.

Amplificación de la secuencia de apo-E

El ADN fue amplificado utilizando los oligonucleótidos marcados con biotina y los demás reactivos suministrados por INNOGENETICS N.V. (Zwijnaarde, Bélgica). El protocolo de amplificación consistió en un primer paso de desnaturaliza-

CLIN. INVEST. ARTERIOSCLEROSIS, VOL. 8, NÚM. 2, 1996

Tabla 1. Resultados cruzados de la determinación genotípica y fenotípica

Apo-E		3/3	3/4	3/2	4/2	4/4	2/2	Total
Genotipos	Fenotipos							
3/3		50	1	2				53
3/4		3	36					39
3/2				10				10
4/2					4			4
4/4			1			11		12
2/2							3	3
Total		53	38	12	4	11	3	121

ción a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de una desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, una hibridación de los oligonucleótidos a 60 °C durante 20 segundos y una extensión a 72 °C durante 20 segundos; después de estos 30 ciclos, finalmente, se realizó un paso de elongación a 72 °C durante 10 minutos.

Determinación del genotipo

Una vez amplificado el ADN, se siguió el protocolo de trabajo suministrado por INNOGENETICS N.V. (Zwijnaarde, Bélgica) para determinar cada uno de los genotipos.

Métodos estadísticos

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico para determinar si había diferencias significativas entre la determinación genotípica y la fenotípica. El test de la χ^2 no podía aplicarse debido a que había grupos con frecuencias más bajas de las permitidas por este test. Se compararon los diferentes métodos mediante el índice kappa. Este índice determina las diferencias entre 2 medidas cuando éstas miden lo mismo.

Resultados

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos al determinar los diferentes polimorfismos de la apo-E mediante métodos genéticos comparados con los resultados fenotípicos.

Los 2 métodos genéticos (restricción enzimática con CfoI y la técnica del SSCP) presentaron un 100% de coincidencia. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos mediante los métodos genéticos con los fenotipos determinados por isoelectrofoque, se detectaron 7 muestras cuyos genotipos no coincidían con los fenotipos (6% de error). De estas 7 muestras 2 genotipos 3/3 habían sido catalogados como fenotipos 3/2, un genotipo 3/3 y un genotipo 4/4 como fenotipo 3/4 y 3 genotipos 3/4 como fenotipos 3/3. Los porcentajes de error por fenotipo fueron de un 16% al asignar los fenotipos 3/2, un 5,3% al asignar los 3/4 y un 5,6% al asignar los 3/3. El índice kappa tenía un valor de 0,91 que indica que la igualdad entre los 2 métodos no es perfecta, pero que las diferencias son mínimas.

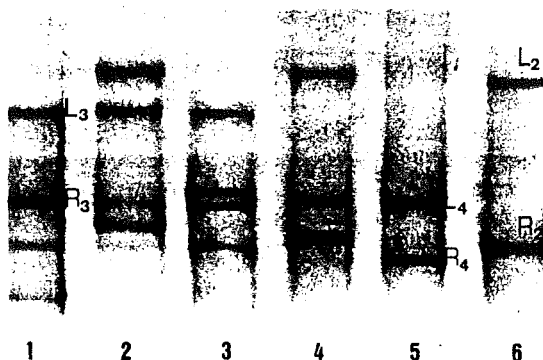


Figura 1. Resultados de un SSCP en el que se muestran los 6 genotipos posibles. 1-E3/3, 2-E2/3, 3-E3/4, 4-E2/4, 5-E4/4 y 6-E2/2. L₂, L₃ y L₄ son las conformaciones lentas de una cadena sencilla de ADN y R₂, R₃ y R₄ son las conformaciones rápidas de la otra cadena sencilla.

La figura 1 enseña los resultados del SSCP para el fragmento de 244 pb. Cada genotipo homocigoto presenta 2 bandas intensamente marcadas que representan las conformaciones mayoritarias de las cadenas sencillas de ADN. También se observan bandas marcadas más débilmente que representan las conformaciones minoritarias. De las 2 bandas más intensas de cada genotipo una presenta una movilidad rápida (R) y otra lenta (L). Las 3 bandas rápidas de cada genotipo (R₂, R₃, R₄) presentan a su vez una movilidad electroforética diferente, y lo mismo ocurre para las 3 bandas lentas (L₂, L₃, L₄). Esta movilidad electroforética diferente permite determinar claramente los diferentes genotipos.

Como puede observarse en la figura 1, el alelo ϵ_2 es el que presenta la banda lenta (L₂) situada más cerca del origen del gel, seguido del alelo ϵ_3 (L₃) y del ϵ_4 (L₄). Respecto a la banda rápida, el alelo ϵ_3 (R₃) es el que se halla más cerca del origen, seguido del alelo ϵ_2 (R₂) y del ϵ_4 (R₄).

En la figura 2 puede verse un gel de poliacrilamida donde se han separado los productos de digestión de 6 muestras que representan los 6 genotipos posibles. En la figura 3 se observa un mapa de restricción para cada isoforma con el tamaño de los fragmentos producidos. Como resultado de la digestión con CfoI se obtienen una serie de fragmentos que no pueden observarse en el gel debido a su pequeño tamaño. Estos fragmentos son: uno de 38 pb, otro de 18 pb y otro de 16 pb comunes a los 3 alelos. Uno de 35 pb que lo presenta el alelo ϵ_4 y el ϵ_3 , y otro de 19 pb que sólo lo presenta el alelo ϵ_1 . Como puede observarse en la figura 2 la isoforma E2/E2 presenta un fragmento de 91 pb y otro de 83 pb como consecuencia de la ausencia de

J.C. VALLVÈ ET AL.- COMPARACION DE LA DETERMINACION DE GENOTIPOS Y FENOTIPOS DE LAS ISOFORMAS DE APOPROTEÏNA E

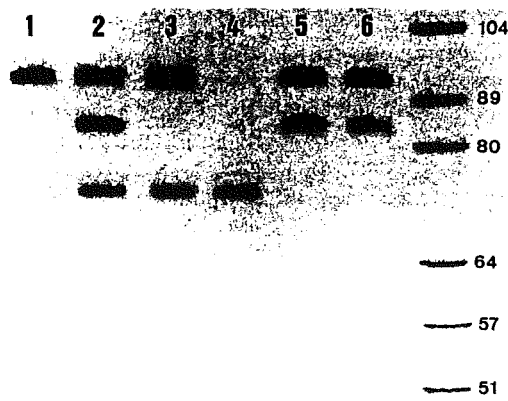


Figura 2. Resultados obtenidos después de la digestión con la enzima CfoI. 1-E3/3, 2-E2/4, 3-E3/4, 4-E4/4, 5-E2/2, 6-E2/3. También podemos observar el tamaño (en pb) de las bandas del marker V (pBR 322 DNA, HaeIII).

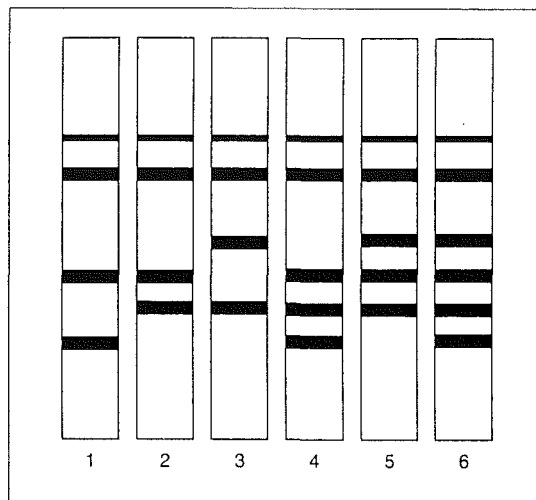


Figura 4. Combinación de bandas que se obtienen al determinar los genotipos mediante el kit comercial. 1-E2/2, 2-E3/3, 3-E4/4, 4-E3/2, 5-E3/4, 6-E2/4.

los 2 puntos de corte en las posiciones 112 y 158. La isoforma E3/E3 presenta el fragmento de 91 pb (ausencia del punto de corte en 112) y un fragmento de 48 pb debido a la presencia de punto de corte en la posición 158. La isoforma E4/E4 muestra el fragmento de 48 (presencia de punto de corte en la posición 158) y también uno de 72 pb debido a la presencia de punto de corte en la posición 112. Los individuos heterocigotos presentan la combinación de fragmentos de cada alelo.

La figura 4 enseña la combinación de bandas que puede obtenerse después de una determinación con el kit INNO-LiPA. Los resultados se obtienen comparando el patrón de bandas obtenido en cada cinta de reacción con la tabla de interpretación de la figura 3. La primera banda es común e indica la parte

superior de la cinta. La segunda, también común, es una línea de control que siempre debe dar positivo, y aproximadamente tiene que tener la misma intensidad en cada test individual.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la existencia de discrepancias entre los métodos genéticos y los fenotípicos al determinar los diferentes polimorfismos de la apo-E. Las diferencias (6% de error) que se observan en nuestro estudio no son tan bajas (2%) como las observadas en otros^{21,26,27} ni tan elevadas (16-20%) como las encontradas en otros más^{19,21,25}. Estas discrepancias

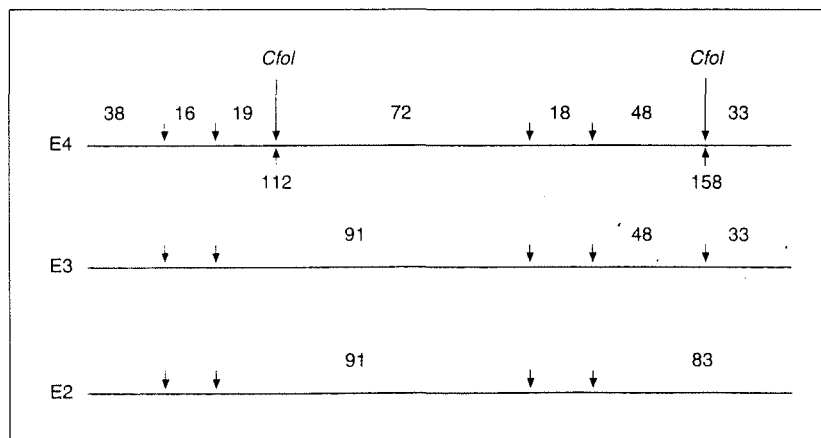


Figura 3. Mapa de restricción para cada isoforma de la apo-E con el tamaño de los fragmentos producidos.

CLIN. INVEST. ARTERIOSCLEROSIS, VOL. 8, NÚM. 2, 1996

que se producen en la determinación fenotípica pueden afectar la asociación de los diferentes alelos con los valores lipídicos y el riesgo de arteriosclerosis.

La determinación de los diferentes polimorfismos de la apo-E mediante métodos fenotípicos presenta, en general, muchos más inconvenientes que la determinación genotípica. Uno de estos inconvenientes es que los residuos de ácido siálico de la apo-E interfieren en la electroforesis y hacen migrar a las isoformas como múltiples bandas¹⁴. Estos residuos de ácido siálico pueden eliminarse con una digestión previa con neuroaminidasa¹⁵ a pesar de lo cual persisten ciertas dificultades de identificación. Otro inconveniente son las modificaciones postraduccionales, que pueden ocurrir en la apo-E, como por ejemplo, la glicación no enzimática que tiene lugar en pacientes con diabetes mellitus¹⁶, lo que agrupa las bandas en posiciones mucho más cercanas al ánodo de lo normal. Esto induce a errores al determinar los diferentes fenotipos incrementando la frecuencia de E2 y disminuyendo la de E4²¹. Otros inconvenientes en la utilización de los métodos de isoelectroenfoque son el tiempo necesario para el procesamiento de la muestra y la obtención de los resultados, dado que en muchos casos se requiere la purificación de VLDL por ultracentrifugación seguida de deslipidación. Recientemente se ha descrito un método que permite la determinación de los fenotipos directamente del plasma sin necesidad de procesar la muestra, lo que elimina algunos de estos inconvenientes²⁸.

Un almacenamiento prolongado de la muestra puede condicionar la presentación de artefactos que no permitan una clara lectura de los geles. Por otra parte, la identificación de los resultados hace que la efectividad de la técnica esté vinculada a la experiencia del operador a la hora de interpretar los mismos. Todo esto hace que las técnicas fenotípicas sean más laboriosas y que produzcan resultados ambiguos y a veces difíciles de interpretar.

Frente a los métodos que valoran el fenotipo hay una gran variedad de métodos genéticos que determinan los diferentes polimorfismos del gen de la apo-E. En general, estos métodos eliminan la mayoría de los inconvenientes de los métodos fenotípicos, ya que producen una definición de las bandas más clara, son menos tediosos y mucho más fáciles de interpretar. Sin embargo, hay algunos que presentan serios inconvenientes, dado que implican la utilización de marcajes radiactivos y por esto no son apropiados para un procesamiento rápido de un elevado número de muestras. Entre éstos cabe destacar los que utilizan sondas alelospes-

cíficas de oligonucleótidos marcados (ASO) para hibridar en las posiciones 112 y 158 del ADN genómico^{29,30}. Para aumentar la sensibilidad de este método se utiliza la amplificación de la secuencia de la apo-E mediante PCR³¹. En contraste con estos métodos existen las técnicas no radiactivas que son menos laboriosas, más económicas y fáciles de interpretar.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que tanto el método de restricción enzimática con CfoI como el método de aplicación de la técnica del SSCP permiten determinar fácilmente los 6 genotipos comunes de apo-E, si bien, el primero produce una mejor definición de bandas que el segundo, pero en cambio es más caro, no tan rápido y sólo permite detectar nuevas mutaciones en el caso de que éstas alteren la secuencia de reconocimiento de la enzima, ya sea produciendo un nuevo punto de corte o eliminando uno ya existente. En cambio la técnica del SSCP permite detectar cualquier tipo de nueva mutación. Por último, el kit comercial es el método más rápido de todos, es fácil de utilizar pero por el contrario es relativamente caro y sólo permite identificar los genotipos más comunes.

Bibliografía

1. Surguchov AP, Boerwinkle E, Sharet AR, Wolfgang P. Patsch. Apolipoprotein E genotype and lipid transport: insight into the role of the ϵ_3 allele. *Atherosclerosis* 1994; 106: 119-121.
2. Das HK, McPherson J, Bruns GAP, Karathanasis SK, Breslow JL. Isolation, characterization and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. *J Biol Chem* 1985; 260: 6.240-6.247.
3. Mahley RW. Atherogenic hyperlipidemia. The cellular and molecular biology of plasma lipoproteins altered by dietary fat and cholesterol. *Med Clin North Am* 1982; 66: 357-402.
4. Paik Y-K, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3.445-3.449.
5. Weisgraber KH, Rall Jr SC, Mahley RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo E isoforms. *J Biol Chem* 1981; 256: 9.077-9.083.
6. Steinmetz, A. Clinical implications of the apolipoprotein E polymorphism and genetic variants: current methods for apo E phenotyping. *Ann Biol Clin* 1991; 49: 1-8.
7. Innerarity RW, Friendlander EJ, Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW. The receptor binding domain of human apolipoprotein E3. Binding of apolipoprotein E fragments. *J Biol Chem* 1983; 258: 12.341-12.347.
8. Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J* 1987; 113: 433-440.
9. Tsai MS, Tangalos EG, Petersen RC. Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 643-649.
10. Warrick GR, Mayfield C, Albers JJ, Hazzard WR. Gel isoelectric focusing for specific diagnosis of familial hyperlipoproteinemia type 3. *Clin Chem* 1979; 25: 279-284.
11. Kana JW, Gowland E. A method for the identification of apolipoprotein E isoforms employing chemical precipitation and flat bed isoelectric focusing on agarose. *Ann Clin Biochem* 1986; 23: 509-513.

J.C. VALLVÉ ET AL.- COMPARACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS Y FENOTIPOS DE LAS ISOFORMAS DE APOPROTEÍNA E

12. Steinmetz A. Phenotyping of human apolipoprotein E from whole blood by immunoblotting. *J Lipid Res* 1987; 28: 1.364-1.370.
13. McDowell IFW, Wisdom GB, Trimble ER. Apolipoprotein E phenotype determined by agarose gel electrofocusing and immunoblotting. *Clin Chem* 1989; 35: 2.070-2.073.
14. Tsai MY, Suess P, Schwichtenberg K, Eckfeldt JH, Yuan J, Tuchman M et al. Determination of apolipoprotein E genotypes by single-strand conformational polymorphism. *Clin Chem* 1993; 39: 2.121-2.124.
15. Wenham PR, Newton CR, Price WH. Analysis of apolipoprotein genotypes by the amplification refractory mutation system. *Clin Chem* 1991; 37: 242-244.
16. Curtis LK, Witzum JL. Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI and E are glycosylated in hyperglycaemic diabetic subjects. *Diabetes* 1985; 34: 452-461.
17. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31: 545-548.
18. Houlston RS, Snowden C, Green F, Alberti KGMN, Humphries SE. Apolipoprotein (apo) E genotypes by polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes: no detectable linkage disequilibrium between apo E and CII. *Hum Genet* 1989; 83: 364-368.
19. Wenham PR, Sedky A, Spooner RJ. Apolipoprotein E phenotyping: a word of caution. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 599-605.
20. Stavljenc-Rukavina A, Sertic J, Salzer B, Dumic M, Radica A, Fumic K et al. Apolipoprotein E phenotypes and genotypes as determined by polymerase chain reaction using allele-specific oligonucleotide probes and the amplification refractory mutation system in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1993; 216: 191-198.
21. Hansen PS, Gerdes LU, Klausen IC, Gregersen N, Faergeman O. Genotyping compared with protein phenotyping of the common apolipoprotein E polymorphism. *Clin Chim Acta* 1994; 224: 131-137.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1.215.
23. Pagnan A, Havel RJ, Kane JP, Kotite L. Characterisation of human very low density lipoproteins containing two electrophoretic populations. *J Lipid Res* 1977; 18: 613.
24. Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; 48(1): 137-144.
25. Snowden C, Houlston RS, Arif MH, Laker MF, Humphries SE, Alberti KGMN. Disparity between apolipoprotein E phenotypes and genotypes (as determined by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1991; 196: 49-58.
26. Kontula K, Aalto-Setälä K, Kuusi T, Hämmäläinen L, Syvänen AC. Apolipoprotein E polymorphism determined by restriction enzyme analysis of DNA amplified by polymerase chain reaction: convenient alternative to phenotyping by isoelectric focusing. *Clin Chem* 1990; 36: 2.087-2.092.
27. Weisgraber KH, Newhouse YM, Mahley RW. Apolipoprotein genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 1.212-1.217.
28. Hackler R, Schäfer JR, Motzny S, Brand S, Kleine TO, Kaffarnik H et al. Rapid determination of apolipoprotein E phenotypes from hole plasma by automated isoelectric focusing using PhastSystem™ and immunofixation. *J Lipid Res* 1994; 35: 153-158.
29. Funke H, Rust S, Assman G. Detection of apolipoprotein E variants by an oligonucleotide "melting" procedure. *Clin Chem* 1986; 32: 1.285-1.289.
30. Smeets B, Poddighe J, Brunner H, Ropers HH, Wieringa B. Tight linkage between myotonic dystrophy and apolipoprotein E genes revealed with allele-specific oligonucleotides. *Hum Genet* 1988; 80: 49-52.
31. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR et al. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics* 1988; 3: 373-379.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ASPECTES METABÒLICS I PAPER DE L'AGREGAT GENÈTIC AL-CIIII-AIV EN LA HIPERLIPEMIA FAMILIAR
COMBINADA

Josep Ribalta Vives

ISBN:978-84-691-1879-5 /DL:T-341-2008

4. RESULTATS i DISCUSSIÓ

4.1. Resum dels Estudis

Els resultats d'aquest treball s'exposen en quatre parts que es presenten en forma d'article científic. En cadascun dels articles, la llengua i el format són els de la revista científica a la que s'han dirigit.

ESTUDI 1 *Hiperlipemia familiar combinada: Detección y caracterización del fenotipo hiperlipémico en niños y adolescentes.*

ESTUDI 2 *A variation in the apolipoprotein C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hyperlipidemia.*

ESTUDI 3 *Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia.*

ESTUDI 4 *Lecithin:cholesterol acyltransferase activity is not altered in familial combined hyperlipidemia.*

Estudi 1

L'absència d'hiperlipèmia abans dels 20 anys és una característica que ja formava part de la definició original de la HLFC feta l'any 1973. Aquest concepte s'ha mantingut i fins potenciat en ser inclòs en alguns criteris diagnòstics. L'any 1990 es va descriure per primera vegada la presència d'alteracions en el perfil lipídic de descendents menors de 20 anys d'aquests pacients. Aquestes alteracions, si bé no eren equiparables a les elevacions en el colesterol i els triglicèrids plasmàtics d'un pacient HLFC adult, sí que es podien considerar significatives en comparació als nivells lipídics d'infants o adolescents de la mateixa edat i sexe. Aquesta era una observació de gran transcendència ja que suggeria la possibilitat d'identificar de manera precoç els individus afectes d'HLFC i, per tant, amb una considerable predisposició a patir cardiopatia isquèmica.

A partir d'aquests antecedents, vàrem estudiar els 30 descendents menors de 19 anys de 16 famílies diagnosticades d'HLFC amb un doble objectiu: determinar el

percentatge d'infants i adolescents amb concentracions de colesterol i/o triglicèrids plasmàtics per sobre del percentil 95 segons cada edat i sexe i, en segon lloc, caracteritzar el seu perfil lipoproteic. Els resultats van demostrar que un 43% dels 30 descendents presentava elevacions dels lípids plasmàtics per sobre del percentil 95. El perfil lipoproteic d'aquests individus es caracteritzava per elevacions del colesterol i els triglicèrids en plasma, VLDL i LDL. A més, també hi havia elevacions en les apolipoproteïnes A-I, B, C-II i C-III. No obstant, a diferència del que és característic en adults, no presentaven cap alteració en la fracció IDL.

Aquests resultats confirmen l'existència d'alteracions en el perfil lipídic, abans dels 20 anys, en individus HLFC i, a més, indiquen que aquestes alteracions són presents en gairebé un 50% dels descendents d'aquests pacients tal com seria d'esperar d'una alteració amb transmissió autosòmica dominant. L'absència d'alteracions en IDL fa pensar que en l'evolució d'aquesta malaltia hi participen mecanismes que afecten el metabolisme dels triglicèrids i en concret els remanents de VLDL.

Estudi 2

En relació a la base genètica de la HLFC s'han estudiat diversos gens l'elecció dels quals ha estat basada, en la majoria de casos, en una característica concreta d'aquests pacients, les seves, sovint, elevades concentracions d'apolipoproteïna B en plasma i sobretot en la fracció VLDL. Aquestes són el resultat, per una banda, d'una sobreproducció hepàtica d'aquesta apolipoproteïna però també d'un catabolisme incomplet d'algunes de les partícules que la contenen. Tot i que per raons òbvies el gen de la pròpia apo B ha estat àmpliament explorat, no se li ha pogut demostrar cap relació amb la malaltia. Un altre gen que s'ha estudiat amb interès és el de l'apo C-III. Això és degut a la capacitat d'aquesta apolipoproteïna d'emascarar/desplaçar l'apo E en la superfície de la lipoproteïna i per tant interferir en el reconeixement de les VLDL per part dels receptors hepàtics. Aquest fenomen també resulta en unes concentracions altes d'apo B en plasma. L'estudi d'aquest gen ha donat uns resultats força més positius en relació a la HLFC. S'ha trobat que alguns polimorfismes en aquest gen o en l'agregat genètic en què es troba, el *cluster* AI-CIII-AIV, tenen una més alta prevalença entre aquests pacients que en controls i que s'associen a elevacions en les concentracions de diferents paràmetres lipídics, sobretot relacionats amb els triglicèrids. No obstant, el paper funcional que tenen les mutacions en aquesta regió en la HLFC és desconegut.

L'objectiu d'aquest treball era obtenir informació que ens permetés comprendre el paper d'aquesta regió del cromosoma 11 en l'etiologia d'aquesta alteració. Per fer-ho es va realitzar un perfil lipoproteic detallat d'aquests pacients i dels seus familiars per estudiar-lo en relació a un polimorfisme del gen de l'apo C-III que era el doble de freqüent entre pacients HLFC que en controls. Els resultats indicaven una forta associació d'aquest polimorfisme amb elevacions de tots els paràmetres relacionats amb els triglicèrids. Era especialment interessant l'associació d'aquesta variació genètica amb augments en la concentració d'apo B en les fraccions VLDL i IDL. Com que aquestes lipoproteïnes només tenen una molècula d'apo B per partícula, aquest resultat indicava que aquest polimorfisme estava relacionat amb l'acumulació d'aquestes partícules en plasma. Totes aquestes associacions només es van observar entre els membres hiperlipèmics de les famílies HLFC, no va detectar-se entre els familiar normolipèmics o els controls.

Aquests resultats confirmen el paper que la regió del *cluster* AI-CIII-AIV té sobre els metabolisme dels triglicèrids en pacients HLFC. Els fet que aquest polimorfisme estigui relacionat amb un augment de l'apo C-III i del número de partícules VLDL i IDL circulants, però no amb una major concentració d'apo B en plasma, suggereix que té un efecte sobre el catabolisme d'aquestes lipoproteïnes independent d'una possible sobreproducció hepàtica d'apo B. Des d'un punt de vista clínic es rellevant que només els pacients manifestin aquestes associacions. Això fa pensar que aquest polimorfisme podria predisposar els individus HLFC portadors a desenvolupar hiperlipèmia en presència de determinats factors com augments en la síntesi de VLDL o disminucions en l'activitat LPL.

Estudi 3

Una de les formes de combatre la hipertrigliceridèmia característica dels pacients HLFC és el tractament amb fibrats. Se sap que els fibrats exerceixen aquesta acció hipolipemiant estimulant l'expressió de la LPL i inhibint la síntesi del seu inhibidor l'apo C-III. Aquesta regulació genètica està mitjançada per l'acció conjunta de dues proteïnes ; la PPAR (*Peroxisome proliferator activated receptor*) i la RXR (*Retinoic acid receptor*). Aquestes proteïnes han d'estar activades per a ser funcionals. PPAR s'activa amb els fibrats o estímuls dietètico-ambientals i RXR s'activa amb l'àcid retinoic, la forma activa intracel·lular de la vitamina A. Aquest és un sistema, doncs, que hom podria hipotetitzar que depèn de l'àcid retinoic o del seu precursor, la vitamina A, per a ser operatiu. Com que els gens sobre els que actua aquest sistema de regulació s'ha descrit que estan relacionats amb la HLFC,

també podria hipotetitzar-se que alteracions en aquest mecanisme de regulació estan implicades en l'etiologia d'aquesta alteració.

Per tal de provar aquesta hipòtesi, vàrem estudiar les concentracions plasmàtiques del precursor de l'àcid retinoic, la vitamina A, en pacients HLFC i en controls. Els resultats van indicar que els pacients HLFC presentaven unes concentracions de vitamina A en plasma que eren un 50% més baixes que les dels controls. A més, la correlació entre el retinol i els paràmetres lipídics era marcadament diferent en pacients i controls. En pacients, el retinol només es correlacionava positivament i significativa amb paràmetres del transport centrípet de colesterol. En controls, només es correlacionava amb el transport centrífug de colesterol.

Tot i que aquests resultats recolzen la hipòtesi que el sistema PPAR/RXR pugui estar implicat en la HLFC, cal prendre'ls amb precaució i analitzar-ne alguns aspectes relacionats.

Els hàbits nutricionals poden, sens dubte, influir els nivells plasmàtics de vitamina A i, per tant, explicar les diferències observades. Aquest aspecte es va abordar estudiant per separat els individus HLFC que seguien una dieta i els que no tenien cap mena de restricció. Els resultats van mostrar que les reduccions en el retinol plasmàtic es presentaven en tots dos grups i que, per tant, les diferències observades no eren degudes a la nutrició dels pacients.

La hipòtesi que es posa a prova es basa en la suposició que la disponibilitat intracel·lular d'àcid retinoic és depenent o proporcional a la quantitat de precursor en sang. Tot i que aquest és un aspecte que caldrà investigar, hi ha estudis en animals que indiquen que la vitamina A regula l'expressió dels gens de les apos A-I i C-III.

Estudi 4

A més d'elevacions del colesterol i els triglicèrids plasmàtics, els pacients amb HLFC solen presentar baixes concentracions de colesterol HDL. No està del tot clar quins són els factors responsables d'aquestes disminucions però uns dels candidats és l'enzim LCAT. La LCAT és l'enzim encarregat d'esterificar el colesterol lliure que la HDL té a la seva superfície per incorporar-lo al seu nucli i així participar en el procés de maduració de la lipoproteïna.

Per aclarir si les disminucions en HDL podien estar causades per una activitat deficient d'aquest enzim es van estudiar les lipoproteïnes d'alta densitat i l'activitat LCAT de

25 individus HLFC. Els resultats van indicar que després de tenir en compte els factors que poden afectar les concentracions d'HDL (edat, sexe, índex de massa corporal o triglicèrids) hi havia una disminució significativa de la fracció HDL2 en el grup HLFC. Aquestes diferències no s'explicaven per l'activitat de la LCAT, que va ser igual en els dos grups. També es va estudiar un polimorfisme de l'apolipoproteïna AI, l'activador de la LCAT, que estava associat amb les concentracions d'aquesta apoproteïna però no amb les de la HDL o l'activitat LCAT.

Aquestes resultats confirmen la tendència d'aquests pacients a presentar disminucions en la fracció HDL2. Així mateix indiquen que l'activitat *in vitro* de l'enzim LCAT és normal. Cal tenir en compte, però, que aquesta activitat es valora amb un substrat artificial i que, per tant, no s'ha de descartar que *in vivo* l'activitat de l'enzim pugui veure's alterada, per exemple, per la composició específica de les HDL d'aquests pacients.

4.2. ESTUDI 1

Detecció i caracterització del fenotip hiperlipèmic en infants i adolescents descendents de pacients amb hiperlipèmia familiar combinada.

Ribalta J, La Ville AE, Heras M, Plana N, Masana L.
Hiperlipèmia familiar combinada : Detecció y caracterización del fenotipo hiperlipémico en niños y adolescentes. Med Clin-Barcelona. (Acceptat)

Hiperlipemia Familiar Combinada: Detección y caracterización del fenotipo hiperlipémico en niños y adolescentes.

Abstract

Fundamento: La hiperlipemia familiar combinada es la hiperlipemia de origen genético más común entre supervivientes de infarto agudo de miocardio, su detección precoz es, por tanto, de gran importancia para la prevención de la enfermedad coronaria. El objetivo de este estudio ha sido determinar la prevalencia de hiperlipemia entre descendientes de pacientes afectados y caracterizar su perfil lipídico, lipoproteico y apolipoproteico.

Pacientes y métodos: Se estudiaron 45 individuos con edad inferior a los 19 años, de los cuales 30 eran descendientes de familias afectas y 15 pertenecían a familias controles sanas. Se determinaron colesterol y triglicéridos en plasma y en las fracciones VLDL, IDL, LDL y HDL así como las concentraciones de apolipoproteínas AI, B, C-II y C-III.

Resultados: Se detectó hiperlipemia en 13 (43%) de los descendientes de las familias afectas. Estos presentaron concentraciones significativamente más altas de colesterol en plasma ($p < 0,0001$), LDL ($p < 0,0001$) y HDL ($p < 0,05$) y de triglicéridos en plasma ($p < 0,007$), VLDL ($p < 0,05$) y LDL ($p < 0,008$) y concentraciones significativamente elevadas de apolipoproteínas AI ($p < 0,02$), B ($p < 0,0004$), C-II ($p < 0,0005$) y C-III ($p < 0,03$). No se observaron alteraciones de la fracción IDL.

Conclusión: Existe una elevada prevalencia de hiperlipemia entre descendientes menores de 19 años de pacientes afectados de hiperlipemia familiar combinada. Al contrario de lo observado en adultos, el perfil de estos niños no presenta alteraciones en la fracción IDL.

Palabras Clave : HLFC, descendencia, IDL, detección precoz, arteriosclerosis.

Introducció

El sustrato anátomo-patològic de las enfermedades cardiovasculares, que constituyen la primera causa de mortalidad en la sociedad occidental, es la lesión arteriosclerótica. La arteriosclerosis es una alteración de etiología multifactorial que puede iniciarse en edades tempranas y que evoluciona lentamente a lo largo de la vida del individuo¹⁻³. De entre los factores que contribuyen a la aparición y progresión de la lesión ateromatosa cabe destacar las hiperlipemias⁴. En relación con el riesgo cardiovascular asociado a las hiperlipemias y a su detección precoz, tienen especial interés aquellas dislipemias de origen genético. La hiperlipemia familiar combinada (HLFC) es la más común de estas hiperlipemias, estando presente en un 10% de los supervivientes de infarto agudo de miocardio, en un 14% de los familiares de primer grado de pacientes con enfermedad coronaria prematura⁵ y con una frecuencia estimada de hasta el 2% en la población general. La HLFC es una alteración del metabolismo de los lípidos altamente heterogénea en la que tanto sus bases metabólicas como genéticas están lejos de ser comprendidas⁶⁻⁸. Cursa con elevaciones del colesterol y/o los triglicéridos plasmáticos⁹, en algunos pacientes con sobreproducción de apolipoproteína (apo) B y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)^{10,11}, presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de menor tamaño y mayor densidad^{12,13} y también se ha descrito asociada a una baja actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL)^{14,15}. Sus manifestaciones clínicas son escasas y el diagnóstico debe ser confirmado mediante el estudio de los familiares del paciente. Aunque el fenotipo hiperlipémico se ha considerado tradicionalmente de aparición tardía, la descripción en diversos estudios de fenotipos hiperlipémicos entre niños pertenecientes a familias HLFC^{16,17} ha generado un interés creciente por el perfil lipoprotéico de estos niños. El objetivo de este trabajo fue estudiar en detalle el perfil lipoprotéico de niños y jóvenes pertenecientes a familias diagnosticadas de HLFC con el objeto de detectar más fácil y precozmente a los individuos afectos y tener una mayor comprensión de las bases metabólicas de esta alteración del metabolismo de los lípidos.

Pacientes y métodos

Pacientes

La población de estudio se obtuvo de un conjunto de 16 familias diagnosticadas de HLFC (n=122) y 12 familias control (n=63). Todos los participantes en el estudio manifestaron por escrito su consentimiento a participar en el mismo. Las familias afectas de HLFC fueron seleccionadas a partir de la identificación de individuos con concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos superiores a los 250 mg/dL y al menos un familiar de primer grado con un perfil hiperlipémico diferente. Las familias control se reclutaron a partir de voluntarios sanos de nuestro centro. Ninguna de estas familias reunía las características propias de la HLFC. Para este estudio se seleccionaron aquellos niños y jóvenes de uno y otro sexo con una edad inferior a los 19 años pertenecientes tanto a las familias HLFC como a las familias control. Se consideró hiperlipémicos (HL) a todos aquellos descendientes con concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos o colesterol en LDL superiores al percentil 95 para cada edad y sexo¹⁸ y normolipémicos (NL) a aquellos con concentraciones inferiores.

Todos los individuos fueron sometidos a una exploración física en la que se determinó el peso (kg), la talla (m), el índice de masa corporal (IMC)(Kg/m²) y la presión arterial (mmHg).

Análisis lipídicos

Los análisis se llevaron a cabo en 10 ml de sangre obtenida tras un ayuno de 12 horas. Se valoró la función hepática y renal en todos los individuos con el fin de detectar posibles hiperlipemias secundarias y se determinó el genotipo de apo E en todos los pacientes, mediante PCR y digestión con la enzima HhaI¹⁹, para excluir las hiperlipemias del tipo III. El colesterol y los triglicéridos tanto en plasma como en las distintas fracciones lipoproteicas se determinaron mediante métodos enzimáticos utilizando Precilip EL^R (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) y Precinorm^R (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) como controles de calidad. Las fracciones lipoproteicas fueron obtenidas mediante ultracentrifugación secuencial preparativa²⁰ en un rotor de ángulo fijo. Las fracciones lipoproteicas aisladas fueron VLDL (d<1,006 g/mL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL) (d= 1,006-1,019 mg/dL) y LDL (d=1,019-1,063 mg/dL). El colesterol contenido en la lipoproteína de alta densidad (HDL) y en la subfracción HDL₃ fueron medidos por métodos

enzimáticos previa precipitación de las lipoproteínas con polietilenglicol. La HDL₂ fue deducida a partir de la diferencia entre el colesterol de la HDL total (cHDL) y el de la HDL₃. La determinación en plasma las apolipoproteínas A-I, B, C-II y C-III, de apo B en VLDL, IDL y LDL y de la lipoproteína (a) (Lp(a)) se llevo a cabo mediante incubación con antisueros específicos y detección por métodos inmunoturbidimétricos.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el paquete informático SPSS Versión 6.1 para Windows. Las comparaciones entre grupos de los diferentes parámetros se realizaron mediante la prueba de la *t* de Student para comparación de medias independientes. Para las comparaciones de frecuencias entre grupos se utilizó la prueba de la χ^2 . Se aceptó la significación estadística para valores de $p < 0,05$.

Resultados

De los 30 descendientes de pacientes diagnosticados de HLFC, 13 (43%) presentaron concentraciones plasmáticas de colesterol ($n=6$), triglicéridos ($n=9$) o colesterol LDL ($n=8$) superiores al percentil 95 (tabla 1) y 17 (56%) concentraciones inferiores a estas cifras. Se detectó hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia aislada o ambas en 4, 5 y 4 casos, respectivamente. Ninguno de los niños presentó cifras de colesterol HDL inferiores al percentil 5. No se detectó ningún caso de hiperapobetalipoproteinemia. Ninguno de los 15 descendientes de las familias control fue considerado hiperlipémico, por lo tanto, la prevalencia de hiperlipemia entre las familias HLFC fue significativamente más elevada ($p < 0,0001$) que entre las familias control. No se hallaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio en relación a la edad, sexo, índice de masa corporal (IMC) o presión arterial (PA) (tabla 2).

Lípidos y lipoproteínas

Las concentraciones de colesterol y triglicéridos en plasma y en las diferentes fracciones en cada uno de los grupos se muestran en la tabla 3. Los descendientes hiperlipémicos de pacientes HLFC presentaron concentraciones significativamente superiores de colesterol ($p < 0,0001$) y triglicéridos ($p < 0,007$) plasmáticos, triglicéridos en VLDL (trigVLDL; $p < 0,05$),

colesterol (cLDL; $p < 0,0001$) y triglicéridos (trigLDL; $p < 0,008$) en LDL y colesterol en HDL total (cHDL; $p < 0,05$) y HDL₃ ($p < 0,02$), respecto a los sujetos normolipémicos de las mismas familias, y de colesterol plasmático ($p < 0,0001$) y colesterol ($p < 0,0002$) y triglicéridos ($p < 0,02$) en LDL respecto a los niños controles. En la figura 1 se muestra como, aún teniendo un colesterol HDL más elevado, los niños hiperlipémicos tenían una relación cLDL/cHDL significativamente más elevada ($p < 0,05$). La relación cLDL/LDL-*apo B*, que refleja el contenido en colesterol de la partícula LDL y que permite detectar partículas LDL del tipo B, no mostró diferencias entre los grupos (Figura 1). No hubo diferencias en las concentraciones plasmáticas de Lp(a) entre los tres grupos, así como tampoco se observaron diferencias entre el grupo de niños normolipémicos de familias HLFC y los niños controles para ninguno de los parámetros lipídicos.

Apolipoproteínas

Las concentraciones de las apolipoproteínas A-I, B, C-II y C-III en plasma y de la apo B en las fracciones VLDL, IDL y LDL se muestra en la tabla 4. Los niños hiperlipémicos de las familias HLFC, respecto a los normolipémicos y control, presentaron concentraciones significativamente elevadas de apo A-I ($p < 0,01$; $p < 0,02$), apo B ($p < 0,0001$; $p < 0,0004$), apo C-II ($p < 0,001$; $p < 0,0005$), apo C-III ($p < 0,01$; $p < 0,03$) y LDL-*apo B* ($p < 0,001$; $p < 0,0008$).

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio indican una prevalencia de perfiles hiperlipémicos entre descendientes de familias diagnosticadas como HLFC del 43%. Este porcentaje es claramente superior al descrito por Goldstein et al.²¹ en el estudio que identificó por primera vez esta alteración y está de acuerdo con trabajos más recientes^{16,17}. Asimismo, es significativamente superior al observado entre las familias control.

Desde que se detectó una mayor incidencia de hiperlipemia entre los niños pertenecientes a familias HLFC de la que se había descrito en un principio, existe un interés creciente por obtener datos del perfil lipoprotéico de estos niños que faciliten tanto la detección como una mejor comprensión de esta alteración. El estudio de las fracciones lipoproteicas en estos niños revela que el exceso de colesterol y triglicéridos que presentan en plasma se halla localizado en las fracciones LDL y VLDL, respectivamente. El contenido

Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda de la doctora Pilar Sardà y el doctor Carlos Alonso-Villaverde durante la selección de los pacientes y la recogida de muestras.

Referencias bibliogràficas

- 1 Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol* 1993; 71: 9B-14B.
- 2 Enos WF, Beyer JC, Holmes RH. Pathogenesis of coronary disease in american soldiers killed in Korea. *JAMA* 1955; 158: 912-914.
- 3 McNamara JJ, Molot MA, Stremple JF, Cutting RT. Coronary artery disease in combat casualties in Vietnam. 1971; 216: 1185-1187.
- 4 Newman WP, Freedman DS, Voors AW, Gard P, Srinivasan SR, Cresanta J et al. Serum lipoproteins and systolic blood pressure are related to atherosclerosis in early life: The Bogalusa Heart Study. *N Eng J Med* 1986; 314: 134-144.
- 5 Genest JJ Jr, Martin Munley SS, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner J, Myers RH et al. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992 ; 85 : 2025-2033.
- 6 Grundy SM, Chait A, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia workshop. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 203-207.
- 7 Castro Cabezas M, de Bruin TWA, Erkelens DW. Familial Combined Hyperlipidemia: 1973-1991. *Neth J Med* 1992; 40: 83-95.
- 8 Kwiterovich PO Jr. Genetics and molecular biology of familial combined hyperlipidemia. *Cur Opin Lipid Res* 1993; 4: 133-143.
- 9 Nikkilä EA, Aro A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet* 1973; 1:954-959.
- 10 Janus ED, Nicoll AM, Turner PR, Magill P, Lewis B. Kinetic bases of the primary hyperlipidemias: studies of apolipoprotein B turnover in genetically defined subjects. *Eur J Clin Invest* 1980; 10: 161-172.
- 11 Cortner JA, Coates PM, Bennett MJ, Cryer DR, Le NA. Familial combined hyperlipidemia: use of stable isotopes to demonstrate overproduction of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B by the liver. *J Inherited Dis* 1991; 14: 915-922.
- 12 Austin MA, Brunzell JD, Fitch WL, Krauss RM. Inheritance of low density lipoprotein subclass patterns in familial combined hyperlipidemia. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 520-530.

- 13 Austin MA, Horowitz H, Wijsman E, Krauss RM, Brunzell J. Bimodality of plasma apolipoprotein B levels in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1992; 92: 67-77.
- 14 Babirak SP, Iverius P-H, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 326-334.
- 15 Babirak SP, Brown BG, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1176-1183.
- 16 Cortner JA, Coates PM, Gallagher PR. Prevalence and expression of familial combined hyperlipidemia in childhood. *J Pediatr* 1990; 116: 514-519.
- 17 Jansen S, Zambrana JL, López Miranda J, Blanco A, Blanco J, Jiménez Perepérez JA et al. Posible relación entre sobrepeso y prevalencia de hiperlipemia en hijos de enfermos con hipercolesterolemia familiar heterocigota e hiperlipemia familiar combinada. *Med Clin (Barc)*1995; 105: 85-88.
- 18 Plaza y Grupo de expertos de las Sociedades Españolas de Arteriosclerosis, Cardiología, Pediatría, Nutrición y Medicina Preventiva. Informe sobre el colesterol en niños y adolescentes españoles. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1991; 3:47-66.
- 19 Vallvé JC, Margalef J, Ribalta J, Turner PR, Masana LI. Comparación de la determinación de genotipos y fenotipos de las isoformas de apo E. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1996; 8: 59-65.
- 20 Schumaker VR, Puppione DL. Sequential flotation ultracentrifugation. *Method enzymol* 1986; 128: 155-170.
- 21 Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease II: Genetic analyses of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidaemia. *J Clin Invest* 1973; 52: 1544-1568.
- 22 De Silva HV, Lauer SJ, Wang J, Simonet WS, Weisgraber KH, Mahley RW et al. Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in accumulation of apolipoprotein B-48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J Biol Chem* 1994; 269:3: 2324-2335.
- 23 Aalto-Setälä K, Fisher EA, Chen X, Chajec-Shaul T, Hayek T, Zechner R, et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) C-III transgenic mice. *J Clin Invest* 1992; 90: 1889-1900.

- 24 Castro Cabezas M, De Bruin TWA, Jansen H, Kock AW, Kortlandt W, Erkelens DW. Impaired chylomicron remnant clearance in Familial Combined Hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 804-814.
- 25 Ginsberg HN, Le NA, Goldberg IJ, Gibson JC, Rubinstein A, Wang-Iverson P et al. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoprotein C-III and A-I: evidence that apolipoprotein C-III inhibits catabolism of triglyceride rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. *J Clin Invest* 1986; 8: 1287-1295.
- 26 Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. Lipoprotein lipase: Recent contributions from molecular biology. *Crit Rev Cl Lab Sci* 1992; 29: (3,4): 243-268.
- 27 Nordestgaard BG, Lewis B. Intermediate density lipoprotein levels are strong predictors of the extend of aortic atherosclerosis in the St. Thomas's Hospital rabbit strain. *Atherosclerosis* 1991; 87: 39-46.

Tabla 1. Niños y adolescentes pertenecientes a familias HLFC con valor/es de colesterol y/o triglicéridos superiores al percentil 95.

Edad	Familia	Sexo	Colesterol / ptl 95	Triglicéridos / ptl 95	Colesterol LDL / ptl 95
4	15	V	5,2 / 5,7	0,9 / 1,1	4,1 / 4,1
6	13	M	5,7 / 5,7	0,6 / 1,0	4,3 / 4,2
8	10	M	5,3 / 5,5	1,1 / 1,1	3,8 / 3,4
10	11	V	5,0 / 5,6	3,2 / 1,1	3,3 / 3,9
11	5	M	5,6 / 5,6	0,9 / 1,3	4,4 / 3,7
12	5	M	6,0 / 5,7	1,2 / 1,3	4,4 / 4,1
13	4	V	5,6 / 5,8	1,3 / 1,2	3,3 / 3,5
13	15	M	5,2 / 5,7	2,3 / 1,3	3,4 / 4,2
16	13	V	5,2 / 5,1	1,1 / 1,1	3,3 / 3,4
17	1	M	4,6 / 5,5	1,2 / 1,1	2,9 / 3,7
17	5	M	5,2 / 5,5	0,9 / 1,1	3,8 / 3,7
17	14	V	5,6 / 5,1	1,2 / 1,2	3,6 / 3,3
18	12	V	4,5 / 5,1	1,4 / 1,2	2,8 / 3,3

Valores expresados en mmol/L. Para colesterol y triglicéridos plasmáticos y colesterol LDL se dan los valores al inicio del estudio y el valor correspondiente al percentil 95 para cada edad y sexo (Varón/Mujer).

Tabla 2. Parámetros biométricos en niños y adolescentes de familias HLFC y control.

	HLFC		
	Hiperlipémicos	Normolipémicos	Controles
Número	13	17	15
Edad	13 (5)	13 (4)	14 (3)
Sexo (V/M)	6 / 7	9 / 7	5 / 2
IMC (Kg/m ²)	21,7 (4,9)	21,0 (3,0)	21,0 (2,9)
PA diastólica	62 (11)	60 (13)	65 (5)
PA sistólica	106 (16)	101 (15)	110 (10)

Los niños pertenecientes a familias HLFC fueron clasificados como hiperlipidémicos (HL) o normolipidémicos (NL) según su perfil lipoprotéico. No se hallaron diferencias significativas entre los tres grupos para ninguno de los parámetros estudiados (sexo (Varón/Mujer), Índice de masa corporal (IMC) y presión arterial (PA)). Valores expresados como media (DE).

Tabla 3. Lípidos plasmáticos y fracciones lipoproteicas en niños y adolescentes pertenecientes a familias HLFC y control.

	HLFC		
	Hiperlipémicos	Normolipémicos	Controles
Colesterol	5,28 (0,43) ^{a,b}	3,87 (0,58)	3,77 (0,54)
Triglicéridos	1,33 (0,69) ^a	0,66 (0,18)	0,77 (0,27)
VLDL			
Colesterol	0,31 (0,36)	0,15 (0,08)	0,15 (0,11)
Triglicéridos	0,65 (0,66) ^a	0,29 (0,17)	0,45 (0,37)
IDL			
Colesterol	0,14 (0,09)	0,10 (0,05)	0,08 (0,04)
Triglicéridos	0,13 (0,10)	0,09 (0,03)	0,09 (0,02)
LDL			
Colesterol	3,65 (0,54) ^{a,b}	2,56 (0,42)	2,44 (0,53)
Triglicéridos	0,23 (0,08) ^{a,b}	0,17 (0,02)	0,15 (0,03)
HDL ₂	0,23 (0,10)	0,18 (0,11)	0,21 (0,08)
HDL ₃	1,10 (0,25) ^a	0,87 (0,23)	0,92 (0,23)
HDL total	1,33 (0,31) ^a	1,12 (0,24)	1,13 (0,16)
Lp(a)	16,99 (16,46)	23,13 (22,27)	17,87 (12,33)

Valores expresados como media (DE). El colesterol y los triglicéridos en plasma, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), densidad intermedia (IDL), baja densidad (LDL) y alta densidad (HDL) están expresados en mmol/L. Lp(a) expresada en mg/dL. Significación estadística para valores de $p < 0,05$.

^a Significativamente diferente del grupo normolipémico.

^b Significativamente diferente del grupo control.

Tabla 4. Apolipoproteínas en plasma y fracciones en niños y adolescentes pertenecientes a la familias HLFC y control.

	HLFC		
	Hiperlipémicos	Normolipémicos	Controles
Plasma apo A-I	122,93 (21,81) ^{a,b}	105,5 (15,46)	102,43 (8,79)
Plasma apo B	86,57 (12,76) ^{a,b}	59,06 (14,10)	63,71 (8,71)
VLDL apo B	3,14 (6,07)	1,86 (3,99)	1,70 (2,70)
IDL apo B	4,57 (1,73)	4,26 (1,42)	4,00 (1,52)
LDL apo B	81,54 (12,76) ^{a,b}	59,35 (8,96)	52,86 (11,35)
Plasma apo C-II	5,44 (0,68) ^{a,b}	4,68 (0,53)	4,29 (0,30)
Plasma apo C-III	11,90 (2,18) ^{a,b}	9,91 (1,85)	9,92 (1,10)

Valores expresados como media (DE). Las concentraciones de apolipoproteína (apo) en plasma, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), densidad intermedia (IDL) y baja densidad (LDL). Significación estadística para valores de $p < 0,05$.

^a Significativamente diferente del grupo normolipémico.

^b Significativamente diferente del grupo control.

Figura 1. Relación colesterol LDL / colesterol HDL.

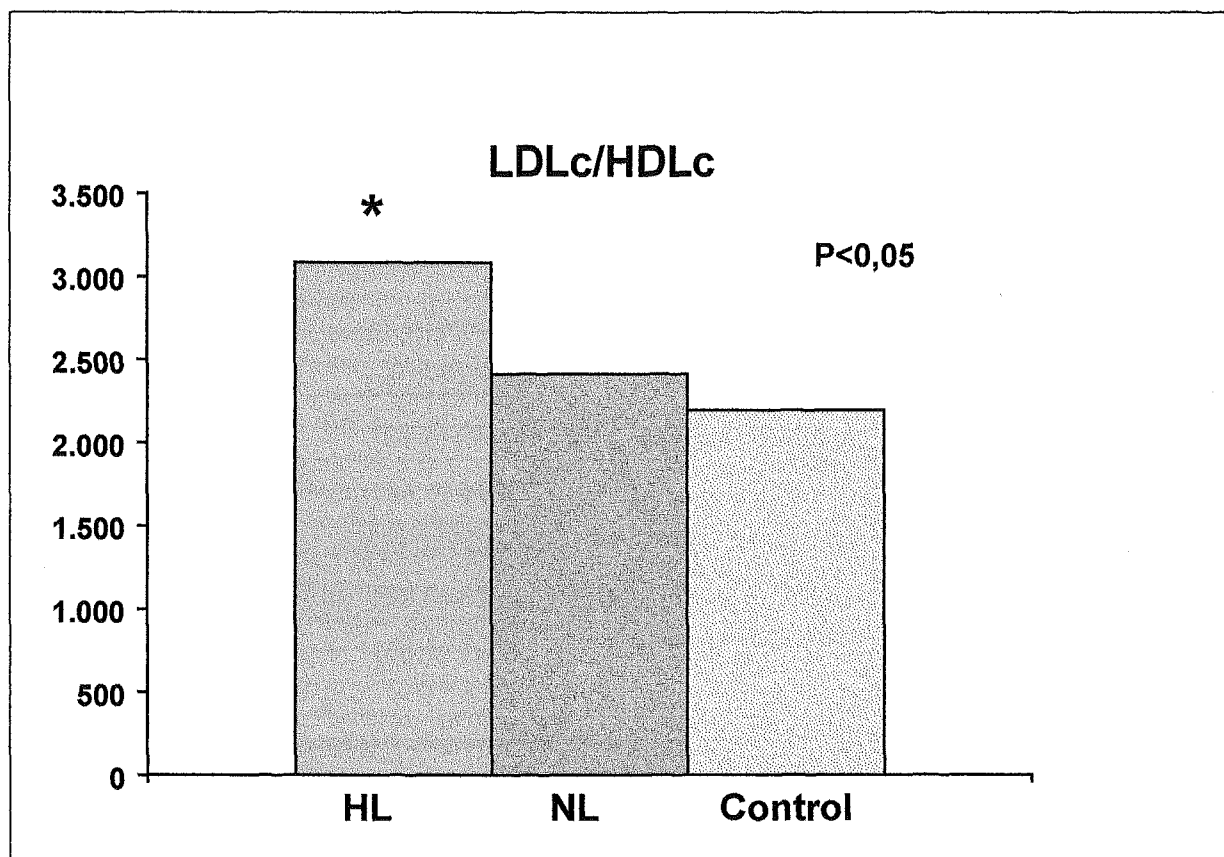


Figura 1 : Se muestran las relación entre colesterol LDL (cLDL) y colesterol de las HDL (cHDL) para los tres grupos de estudio ; niños pertenecientes a familias HLFC hiperlipémicos (HL), normolipémicos (NL) y niños controles.

4.3. ESTUDI 2

Estudi de la influència del gen de l'apolipoproteïna C-III sobre el perfil lipoproteic d'individus hiperlipèmics i normolipèmics pertanyents a famílies diagnosticades d'hiperlipèmia familiar combinada.

Ribalta J, La Ville AE, Vallvé JC, Turner PR, Humphries SE, 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. (Acceptat)*

A variation in the apolipoprotein C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hyperlipidemia.

Abstract

Detailed plasma lipoprotein analyses were conducted on 16 Familial Combined Hyperlipidemic (FCHL) probands, all their available family members (n=106) together with 12 normolipidemic control families (n=63) and the results assessed in relation to a C₁₁₀₀-T mutation in exon 3 of the apo C-III gene. The frequency of the T₁₁₀₀ genotype (CT+TT) was significantly elevated in the probands relative to control subjects (0.64 vs. 0.36; p<0.01) and was associated with elevated concentrations of plasma triglyceride (p<0.02) and apo C-III (p<0.03), VLDL cholesterol (p<0.005), VLDL triglyceride (p<0.009), IDL cholesterol (p<0.01) and IDL triglyceride (p<0.007). The T₁₁₀₀ genotype was also associated with elevations in VLDL-apo B (p<0.005) and IDL-apo B (p<0.04) indicating a relationship between this variation and an increased number of triglyceride-rich particles. These findings were confined to the hyperlipidemic members of the FCHL families and showed a strong genotype-status interaction (p<0.001). Of considerable clinical relevance is that the apo C-III gene may be acting as a modifier gene which is only expressed in the presence of other factors (e.g. increased VLDL flux, low LPL activity) and therefore may predispose those members of FCHL families carrying the T₁₁₀₀ allele to express the FCHL phenotype.

Keywords: Remnant particles, CAD, genotype-status interaction, metabolic syndrome, AI-CIII-AIV gene cluster, genetic marker, predisposition.

Introduction

Familial Combined Hyperlipidemia (FCHL) was first described in 1973 as a new, autosomal dominant, genetic disorder with an estimated prevalence of 0.5-2% in the general population and which was a condition frequently observed among survivors of a premature myocardial infarction (1,2). Since then it has been shown to be a highly heterogeneous disorder (3,4) and, although the hyperlipidemia does not normally manifest before the age of 20 years (5), the presence of the FCHL phenotype among children of affected families has been reported (6). Also, FCHL phenotype may vary among family members and, over a temporal sequence, even in the individual patient (7), with phenotypes IIa, IIb or IV hyperlipidemia being expressed (8).

An increased flux of apolipoprotein (apo) B of very low density lipoprotein (VLDL), together with a decreased catabolism of triglyceride-rich VLDL and IDL has been reported in these patients (9-12). These metabolic data strongly suggest the apo B gene as a candidate in FCHL, but since several studies have demonstrated that apo B does not play a major role in FCHL (13,14) other modulators of the metabolism of apo B-containing lipoproteins are being studied. One such is the apo C-III which is known to inhibit lipoprotein lipase (LPL) activity *in vitro* (15-17). A decreased LPL activity has been suggested to affect the hepatic re-uptake of nascent VLDL particles (18). Excess of apo C-III delays, by displacement of apo E, the clearance of IDL particles from plasma (19-20) and causes hypertriglyceridemia in transgenic mice (21). Increased concentrations of apo C-III have been observed in FCHL patients (22) and, in case/control studies, is also associated with the risk of coronary artery disease (CAD); elevated apo C-III concentrations being found in patients with carotid artery disease (23) and its concentration in the high density lipoprotein (HDL) fraction being reported as the best predictor of CAD progression (24).

Genetic data suggest that variations at the AI-CIII-AIV locus may be associated with the triglyceride distributions in a normal population as well as with the FCHL phenotype in a subset of hyperlipidemic patients (25-28). The aim of the present study was to investigate the effect of a common variation in the apo C-III gene on lipoprotein distributions in a group of well-characterized FCHL subjects and family members compared to an equivalent group of clinically-healthy control individuals.

Subjects and methods

All subjects recruited into the study gave fully-informed written consent and the protocol was approved by the Scientific and Ethical Committee of the Hospital Universitari de Sant Joan.

FCHL families

Sixteen index patients diagnosed as having FCHL were recruited from the Lipid Clinic of the Hospital Universitari de Sant Joan in Reus (Spain). Diagnosis was based on the subject having plasma concentrations of cholesterol (chol) and triglycerides (trig) ≥ 6.4 mmol/L and ≥ 2.8 mmol/L, respectively, detected at any time in the clinical history and at least one first degree relative with a hyperlipoproteinemic phenotype different from that of the proband.

Biochemical analyses were conducted to rule out secondary causes of hyperlipidemia and apo E genotyping was performed to exclude type III hyperlipidemia. All index subjects were on lipid lowering diet and had been taken off lipid lowering medication for a period of at least two months when recalled for the study. All available family members of index patients were recruited and totaled 106 individuals. At inclusion in the study hyperlipidemic relatives (n=32) were assigned the FCHL phenotype on the basis of the one lipid measurement if they presented plasma cholesterol concentrations ≥ 6.4 mmol/L and/or plasma triglycerides ≥ 2.8 mmol/L or elevated above the 95th percentile for age and gender in the case of children below the age of 19 years. Relatives who did not meet these criteria (n=74) were assigned the normolipidemic status.

Normolipidemic control families

Sixty three individuals belonging to 12 normolipidemic families volunteered to participate and were included as controls in this study. The families were from among the clinical and laboratory staff. Subjects undergoing lipid lowering therapy or with secondary causes of hyperlipidemia were excluded. None of the families met the criteria to be classified as FCHL.

Unrelated normolipidemic controls

Fifty four unrelated healthy normolipidemic controls were included in the study exclusively for comparison of allele and genotypic frequencies.

Analytical methods

A 10 ml venous blood sample was withdrawn after an overnight fast of 12 hours. Triglycerides and cholesterol in plasma and lipoprotein fractions were measured using enzymatic kits (Boehringer Mannheim, Germany) adapted for a Cobas Mira centrifugal analyzer (Roche Pharmaceuticals, Switzerland) with Precilip EL[®] and Precinorm[®] (Boehringer Mannheim, Germany) as quality controls. Immuno-turbidometry was employed for the measurement of the apolipoproteins using specific antiserum purchased from Boehringer Mannheim, Germany (for apo A-I and apo B), Daiichi Chemicals, Japan (for apo C-II and apo C-III) and Incstar Corporation, U.S.A (for Lp(a)).

Sequential preparative ultracentrifugation

Lipoproteins were separated by sequential preparative ultracentrifugation (29), using a Kontron 45.6 fixed-angle rotor in a Centrikon 75 (Kontron Instruments, Italy). The lipoprotein fractions isolated were VLDL ($d < 1.006$ g/ml), IDL ($d = 1.006-1.019$ g/ml) and LDL ($d = 1.019-1.063$ g/ml). Total HDL and HDL3 cholesterol were measured subsequent to the precipitation of the apo B-containing lipoproteins with polyethylene glycol (Immuno AG, Austria). HDL2 cholesterol was calculated from the difference between total HDL and HDL3 cholesterol.

DNA Analyses

DNA was extracted from an aliquot of frozen white cells by the salting out method (30). PCR was carried out to amplify the region containing the C₁₁₀₀-T transition which results in a non-functional polymorphism in exon 3 of the apo C-III gene (31). The reaction mixture (50 μ l) for amplification contained 250 ng of each of the two primers (Boehringer Mannheim, Germany), 5' primer, 5'-CAATGGGTGGTCAAGCAGAAGC-3' and 3' primer, 5'-GAGCACCTCCATTCCATTGTTGG-3', 200 ng of genomic DNA and 1 U of Taq polymerase (Boehringer Mannheim, Germany). Magnesium concentration in the reaction buffer was 1.5 mM. The reactions were performed on a Hybaid Omnigene thermocycler at 95°C for 5 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min. PCR products were run on a 2% agarose gel and double blotted on hybrid-N⁺ membrane (Amersham International, U.K). Membranes were hybridized as described elsewhere (31) with oligonucleotides C: 5'-ATGCAGGGCTACATGAA, T: 5'-TTCATGTAACCCTGCAT (Boehringer Mannheim, Germany).

Statistical analyses

The χ^2 -test was used to compare the frequency of the T₁₁₀₀ genotypes among groups. The Z-test for comparison of proportions was used to compare allele frequencies. ANOVA was performed to compare the means of the lipid, lipoprotein and apolipoprotein data adjusted for age, gender and BMI and log transformed when the variables were not normally distributed. The Bonferroni corrected-t-test was used to adjust the acceptance level when multiple measurements were made. Comparisons using unadjusted data were with the Student's *t*-test. One way ANOVA was used to assess linearity between genotypes and lipid parameters. Deviation from Hardy Weinberg equilibrium was tested with the χ^2 goodness-of-fit test. Results are expressed as means and standard deviations. Statistical significance was accepted at the 0.05 level.

Results

Probands' lipid profile on selection together with the family-member composition is presented in Table 1. Five out of 16 FCHL probands showed, when recalled for the study, a clear normolipidemic phenotype in contrast to the hyperlipidemia noted in the extensive clinical history. Table 2 contains the data on the relatives of FCHL probands who were assigned hyperlipidemic (HL) or normolipidemic (NL) status according to their plasma cholesterol and triglyceride concentrations together with a further group containing the control family members. FCHL probands had a significantly increased BMI and proportion of male subjects compared to HL relatives, NL relatives and control subjects together with elevated diastolic and systolic blood pressure compared to NL relatives. FCHL probands were significantly older than their relatives but not different from the control subjects. NL relatives were significantly younger and had lower diastolic blood pressure than control subjects. The proportion of pre-menopausal women in the NL group (n=35, 47%) and in controls (n=26, 41%) was not significantly different. Fourteen of the 29 children below the age of 19 years in the FCHL families had concentrations of either plasma cholesterol, plasma triglycerides or LDL-chol \geq 95th percentile or HDL-chol \leq 5th percentile cut-off for age and gender for a Spanish population (32). Eight of them were below the age of 15 years.

Lipids, lipoproteins and apolipoproteins

Plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins measured in the FCHL Probands, HL, NL and control group are summarized in Table 3 and the differences were assessed on data adjusted for BMI, gender and age. Probands and HL relatives had significantly elevated concentrations of cholesterol and triglycerides (plasma, VLDL, IDL and LDL) as well as increased concentrations of apo B (plasma, VLDL, LDL) and plasma apo C-II and C-III compared to NL relatives and controls. FCHL Probands had significantly higher concentrations of plasma triglycerides and VLDL-chol than their HL relatives. Plasma apo B, VLDL-apo B and HDL2-chol were significantly increased and apo C-II significantly decreased in the control group compared to NL relatives. The apo A-I/total HDL-chol ratio was significantly higher ($p<0.0001$) in FCHL probands (125.7 ± 13.7) and HL relatives (112.3 ± 27.5) compared to NL relatives (97.9 ± 13.8) and control subjects (95.2 ± 14.0).

C₁₁₀₀-T polymorphism in the apo C-III gene

The distributions of genotypic and allelic frequencies in the different groups are displayed in Figure 1. The observed frequencies of the CC, CT and TT genotypes in FCHL and control families were not different from those predicted by the Hardy-Weinberg distribution .

Comparisons of allelic and genotype frequencies were made with a control group of 54 unrelated subjects (M/F 40/14) of mean age 32 ± 10 , BMI 23.8 ± 4.5 , plasma cholesterol 5.04 ± 1.06 and triglycerides 0.94 ± 0.62 . Frequencies of the T₁₁₀₀ genotypes were significantly higher among FCHL probands (0.64; $p<0.01$) and HL relatives (0.50; $p<0.001$) compared to control subjects (0.36). NL relatives did not show higher frequencies of the T₁₁₀₀ genotype compared with controls (0.43 and 0.36, respectively). The same, albeit non-significant, trend was observed with regard to the allelic frequencies (0.36, 0.31, 0.25 and 0.20; Probands, HL relatives, NL relatives and controls, respectively).

The association of the T₁₁₀₀ genotype with plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins was studied separately in FCHL and control families and the results are summarized in Table 4. Within the FCHL families, the T allele showed a clear association with an increased concentration of plasma triglycerides, apolipoproteins C-III and A-I as well as components (chol, trig and apo B) of VLDL and IDL. Conversely, none of these associations was observed within the control families. Assessed by multiple regression ANOVA after adjustment for age, BMI and gender, there was a strongly significant interaction ($p<0.001$) between the effect of the T allele and subject status (FCHL-family member or control-family

member) in the above mentioned parameters. The effect of the T₁₁₀₀ genotype on lipids and apolipoproteins, which was observed to be confined to FCHL families, was then assessed in the hyperlipidemic with respect to the normolipidemic family members. The results showed that the T allele was associated with elevated concentrations of all parameters only in HL subjects (Probands and HL relatives) while no differences were observed between genotypes in NL relatives. Even when FCHL probands were removed from the statistical analyses the T allele still showed an association with elevated concentrations of VLDL (chol, trig, apo B), IDL-trig and apolipoproteins A-I and C-III.

Since a significant association between the T allele and differences in lipid and apolipoprotein parameters was detected only among HL subjects, analysis of gene-dosage effect was performed in this group. The linear relationship between genotypes and those parameters which were affected by the T allele was assessed by one-way ANOVA. Significant gene-dosage effects were observed for plasma triglyceride ($p < 0.02$), VLDL-chol ($p < 0.01$), VLDL-trig ($p < 0.01$), VLDL-apo B ($p < 0.0003$), apo A-I ($p < 0.002$) and apo C-III ($p < 0.0005$) (Figure 2).

Discussion

FCHL has traditionally been considered a disorder with a late onset (1,2) where a hyperlipidemic profile is not observed before the age of 20 years. However, in agreement with the report of Cortner et al. (6) we have observed that almost 50% of FCHL children below the age of 19 express hyperlipidemia which was characterized by plasma cholesterol or triglyceride concentrations above the 95th percentile and often accompanied by high LDL-chol levels (32). This indicates that individuals affected by FCHL may already express hyperlipidemia at early stages in life and could partially explain the increased risk for CAD seen in adult FCHL patients. Parameters associated with CAD risk, such as male gender and increased age, were over-represented among FCHL probands and might be responsible for additional differences observed in BMI and blood pressure.

The hyperlipidemic phenotype can vary in FCHL patients over time. This was the case in 5 of the 16 well-characterized FCHL probands included in the study who, in contrast to the hyperlipidemia observed during a previous extensive follow-up, presented with a clear normolipidemic profile at the time of sampling for the present study. It confirms the variable

expression of hyperlipidemia in these patients and is reflected in the only moderately high mean plasma cholesterol and triglyceride concentrations in the group of FCHL probands who, incidentally, had been on a period of dietary restriction.

As expected for the phenotypic expression of FCHL, increased plasma lipid concentrations, lipid enriched lipoprotein fractions (VLDL, IDL, LDL) and elevated apo B concentrations were found in subjects expressing the FCHL phenotype. These are well-assessed metabolic features extensively reported in relation to FCHL (9-12).

Several studies have suggested associations between variations at the AI-CIII-AIV gene cluster and FCHL (25,33,34) and a more recent work by Dallinga-Thie et al. (28) reports a regulatory role of this gene cluster for the expression of FCHL. These variations are thought to be in linkage disequilibrium with a functional mutation (or mutations) in or around the gene cluster. The mechanism by which this putative *locus* might modulate lipoprotein metabolism in these patients is not known although it is likely to be via the regulation of triglyceride metabolism (27,33,35). To help in clarifying this point we studied the associations between the detailed lipid profile of subjects with FCHL and a C₁₁₀₀-T transition in exon 3 of the apo C-III gene. This mutation is reported to have a significantly elevated frequency among subjects with combined hyperlipidemia (36%) and with a clear effect in elevating the plasma triglyceride concentrations in these subjects, would appear to be, therefore, a useful marker to assess the potential effect of the apo C-III gene in FCHL. This variation does not result in an altered protein and is, presumably, acting as a marker for a functional mutation (or mutations) elsewhere in the gene cluster, for example, in the up-stream region controlling the synthesis of apo C-III (35), which has been shown to influence triglyceride metabolism. The CT and TT genotypes were more frequent among FCHL probands and HL relatives than in controls and allelic frequencies were in agreement with those reported by Xu et al. (27). Although, due to small numbers, statistical significance was not obtained in all cases, the T allele was consistently more frequent in those groups expressing hyperlipidemia (probands, HL relatives) than in normolipidemic or control subjects, suggesting a contributing role of this gene in the development of hyperlipidemia. The T allele was associated with higher plasma apo C-III and triglyceride concentrations and also to an enrichment in cholesterol and triglycerides in VLDL and IDL. Of particular interest is the observation that the T allele was associated with increased content of apo B in VLDL and IDL which can be interpreted, on the assumption that VLDL and IDL, like LDL, contain one molecule of apo B per particle, as

an increased number of these particles. Increased number of VLDL and IDL particles in FCHL may result from hepatic over-production of VLDL-apo B and/or decreased catabolism of these particles as demonstrated by Janus et al. (11). Also, a delayed clearance of post-prandial triglyceride -rich lipoproteins has been found to be related with changes in apo C-III concentrations in these patients (22). While the genetic bases of this accumulation of particles are not clear, our data suggest that the apo C-III gene is, indeed, involved in this process. The observed association between the T₁₁₀₀ genotype with increased concentrations of apo C-III and the accumulation of VLDL and IDL particles is consistent with the reported role of apo C-III in functionally displacing apo E and leading to an impaired clearance of these lipoprotein particles (19,20). This, together with the lack of association with total plasma apo B levels suggests that the apo C-III gene is most probably affecting the catabolism of triglyceride-rich particles rather than the overall hepatic synthesis of the lipoproteins. A further metabolic implication is suggested by the observation that the accumulation of particles results in denser and smaller VLDL particles which, together with IDL, rapidly enter the LDL compartment (5) and therefore may account for an elevation in LDL, also observed in FCHL.

The association between the rarer T allele and increased VLDL, IDL and apo C-III was observed in FCHL families but was not observed in the control group. More importantly, it was observed only among the hyperlipidemic members of the FCHL families. This is of considerable clinical relevance since this suggests that, in view of the elevated frequency of the T₁₁₀₀ genotype among FCHL subjects, the apo C-III gene might be predisposing these individuals to FCHL and that this gene might be displaying a modifying effect in being expressed only in the presence of other factors such as VLDL overproduction or decreased LPL activity. The identification of these factors and the molecular mechanism of this interaction will be of importance in understanding the development and variability of the FCHL phenotype.

Acknowledgments

We thank Dr. Chung-Fang Xu for invaluable help and advice in the setting-up of the molecular biology techniques; Mercedes Heras, Silvia Olivé, Josefa Girona and Joaquim Margalef for their excellent technical support; Drs. Núria Plana, Pilar Sardà, Rosa Solà and Carlos Alonso-Villaverde for their clinical assistance. This study has been supported, in part, by the Fundació Joan Abelló Pascual and the Ministerio de la Salud (DGICYT # PM 92-0209). S. E. Humphries is supported by the British Heart Foundation.

References

1. Rose, H.G., P. Kranz, M. Weinstock, J. Juliano, and J.I. Haft. 1973. Inheritance of combined hyperlipoproteinemia: Evidence for a new lipoprotein phenotype. *Am. J. Med.* **54**:148-160.
2. Goldstein, J.L., H.G. Schrott, W.R. Hazzard, E.L. Bierman, and A.G. Motulsky. 1973. Hyperlipidaemia in coronary heart disease II: Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidaemia. *J. Clin. Invest.* **52**:1544-1568.
3. Kwiterovich, P.O. Jr. 1993. Genetics and molecular biology of familial combined hyperlipidemia. *Curr. Opin. Lipidol.* **4**:133-143.
4. Castro Cabezas, M., T.W.A. de Bruin, and D.W. Erkelens. 1992. Familial Combined Hyperlipidemia: 1973-1991. *Neth. J. Med.* **40**:83-95.
5. Grundy, S.M., A. Chait, and J.D. Brunzell. 1987. Familial combined hyperlipidemia workshop. *Arteriosclerosis.* **7**:203-207.
6. Cortner, J.A., P.M. Coates, and P.R. Gallagher. 1990. Prevalence and expression of familial combined hyperlipidemia in childhood. *J. Pediatr.* **116**:514-519.
7. Brunzell, J.D., J.J. Albers, A. Chait, S.M. Grundy, E. Groszek, and G.B. Mc Donald. 1983. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* **24**:147-155.
8. Nikkilä, E.A., and A. Aro. 1973. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet.* **1**:954-959.
9. Chait, A., J.J. Albers, and J.D. Brunzell. 1980. Very low density lipoprotein overproduction in genetic forms of hypertriglyceridemia. *Eur. J. Clin. Invest.* **10**:17-22.
10. Cortner, J.A., P.M. Coates, M.J. Bennett, D.R. Cryer, and N.A. Le. 1991. Familial combined hyperlipidemia: use of stable isotopes to demonstrate overproduction of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B by the liver. *J. Inherited Dis.* **14**:915-922.
11. Janus, E.D., A.M. Nicoll, P.R. Turner, P. Magill, and B. Lewis. 1980. Kinetic bases of the primary hyperlipidemias: studies of apolipoprotein B turnover in genetically defined subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* **10**:161-172.

12. Venkatesan, S., P. Cullen, P. Pacy, D. Halliday, and J. Scott. 1993. Stable isotopes show a direct relation between VLDL apo B overproduction and serum triglyceride levels and indicate a metabolically and biochemically coherent basis for familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb.* **13**:1110-1118.
13. Raugh, G., H. Schuster, B. Müller, S. Schewe, C. Keller, G. Wolfram, and N. Zöllner. 1990. Genetic evidence from 7 families that the apo B gene is not involved in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* **83**:81-87.
14. Austin, M.A., E. Wijsman, S.W. Guo, R.M. Krauss, J.D. Brunzell, and S. Deeb. 1991. Lack of evidence for linkage between low-density lipoprotein subclass phenotypes and the apolipoprotein B locus in familial combined hyperlipidemia. *Genet. Epidemiol.* **8**:287-297.
15. Ginsberg, H.N., N.A. Le, I.J. Goldberg, J.C. Gibson, A. Rubinstein, P. Wang-Iverson, R. Norum, and V.W. Brown. 1986. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoprotein C-III and A-I: evidence that apolipoprotein C-III inhibits catabolism of triglyceride rich lipoproteins by lipoprotein lipase *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **8**:1287-1295.
16. Brown, W.V., and M.L. Baginsky. 1972. Inhibition of lipoprotein lipase by an apolipoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**:375-382.
17. Auwerx, J., P. Leroy, and K. Schoonjans. 1992. Lipoprotein lipase: Recent contributions from molecular biology. *Crit. Rev. Cl. Lab. Sci.* **(3,4)**:243-268.
18. Williams, K.J., K.A. Petrie, R.W. Brocia, and T.L. Swenson. 1991. Lipoprotein lipase regulates net secretory output of apolipoprotein B *in vitro*: a possible pathophysiologic explanation for familial combined hyperlipidemia. *J. Clin. Invest.* **88**:1300-1306.
19. De Silva, H.V., S.J. Lauer, J. Wang, W.S. Simonet, K.H. Weisgraber, R.W. Mahley, and J.M. Taylor. 1994. Overexpression of human apolipoprotein C-III in transgenic mice results in an accumulation of apolipoprotein B48 remnants that is corrected by excess apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* **269**: 2324-2335.
20. Aalto-Setälä, K., E.A. Fisher, X. Chen, T. Chajek-Shaul, T. Hayek, R. Zechner, A. Walsh, R. Ramakrishnan, H.N. Ginsberg, and J.L. Breslow. 1992. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) C-III transgenic mice. *J. Clin. Invest.* **90**: 1889-1900.

21. Ito, Y., N. Azrolan, A. O'Connell, A. Walsh, and J.L. Breslow. 1990. Hypertriglyceridemia as a result of human apo C-III gene expression in transgenic mice. *Science*. **249**:790-793.
22. Castro Cabezas, M., T.W.A. de Bruin, H. Jansen, A.W. Kock, W. Kortlandt, and D.W. Erkelens. 1993. Impaired chylomicron remnant clearance in Familial Combined Hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb.* **13**:804-814.
23. Wiseman, S., J.T. Powell, N. Barber, S.E. Humphries, and R.M. Greenhalgh. 1991. Influence of apolipoproteins on the anatomical distribution of arterial disease. *Atherosclerosis*. **89**:231-237.
24. Blankenhorn, D.H., P. Alaupovic, E. Wickmaam, H.P. Chin, and S.P. Azen. 1990. Prediction of angiographic change in native human coronary arteries and aortocoronary bypass grafts. *Circulation*. **81**:470-476.
25. Kessling, A.M., B. Horsthemke, and S.E. Humphries. 1985. A study of DNA polymorphisms around the human apolipoprotein A-I gene in hyperlipidemic and normal individuals. *Clin. Genet.* **28**:296-306.
26. Wojciechowski, A.P., M. Farrall, P. Cullen, T.M.E. Wilson, J.D. Bayliss, B. Farren, B.A. Griffin, M.J. Caslake, C.J. Packard, J. Shepherd, R. Thakker, and Scott J. Familial combined hyperlipidemia linked to the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature*. **249**:161-164.
27. Xu, C.F., P. Talmud, H. Schuster, R. Houlston, G. Miller, and S. Humphries. Association between genetic variation at the apo AI-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Clin. Genet.* **46**:385-397.
28. Dallinga-Thie, G.M., X-D. Bu, M. v L-S. Trip, J.I. Rotter, A. J. Lusi, and T.W.A. de Bruin. 1996. 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.* **37**:136-147.
29. Schumaker, V.R., and D.L. Puppione. 1986. Sequential flotation ultracentrifugation. *Method. enzymol.* **128**:155-170.
30. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out method procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**:1215.
31. Xu, C.F., P. Talmud, and S.E. Humphries. 1994. Three new polymorphisms of the apo AI-CIII-AIV gene cluster. *Molecular and cellular probes.* **8**:331-332.

32. Lopez, D., I. Plaza, M.T. Muñoz, R. Madero, J. Otero, I. Hidalgo, J. Baeza, M.J. Ceñal, A. Cobaleda, I. Parra, C. Ruiz, and J. Dominguez. 1989. Estudio de Fuenlabrada: Lípidos y lipoproteínas en niños y adolescentes. *An. Esp. Pediatr.* **31**:342-349.
34. Castro Cabezas, M., T.W.A. de Bruin, H.W. de Valk, C.C. Shoulders, H. Jansen, and D.W. Erkelens. 1993. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. *J. Clin. Invest.* **92**:160-168.
35. Hayden, M.R., H. Kirk, C. Clark, J. Frohlich, S. Rabkin, R. McLeod, and J. Hewitt. 1987. DNA polymorphisms in and around the apo AI-CIII-AIV genes and genetic hyperlipidemias. *Am. J. Hum. Genet.* **40** : 421-430.
36. Dammerman, M., L.A. Sandkuijl, J.L. Halaas, and J.L. Breslow. 1993. An apolipoprotein C-III haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90** : 4562-4566.

Table 1. Plasma lipid concentrations, in mmol/L, of the 16 FCHL probands.

Family	Relatives		Proband	Age	Sex	Chol	Trig	HDLc	ApoE
	All	<19 yrs							
1	9	2	1	51	M	7.1 / 6.5	3.1 / 2.9	1.2	3/4
2	6	0	2	29	M	8.1 / 6.8	3.0 / 2.0	1.1	3/3
3	9	0	3	54	F	8.7 / 6.0	4.8 / 2.6	1.7	3/3
4	3	1	4	48	M	8.7 / 8.2	3.3 / 3.3	1.4	3/4
5	17	4	5	42	M	6.9 / 6.5	6.5 / 2.1	1.0	3/3
6	7	3	6	44	M	6.4 / 5.8	5.0 / 2.4	0.9	3/3
7	10	1	7	54	M	7.8 / 6.5	6.6 / 2.0	1.1	3/3
8	5	0	8	59	F	7.0 / 6.1	4.4 / 2.8	1.5	3/3
9	7	1	9	62	M	8.3 / 6.7	3.3 / 3.1	1.1	3/3
10	6	1	10	47	M	7.3 / 6.3	4.5 / 3.2	0.7	3/4
11	5	2	11	46	M	6.9 / 6.7	6.8 / 2.2	0.7	3/4
12	9	3	12	57	F	9.4 / 7.6	3.2 / 2.9	1.3	3/3
13	7	2	13	51	M	7.8 / 8.2	3.6 / 3.5	2.1	3/4
14	6	1	14	53	M	6.3 / 5.2	9.1 / 1.5	1.7	3/3
15	5	3	15	36	M	6.6 / 6.3	3.9 / 1.9	0.9	3/3
16	11	5	16	32	M	9.8 / 7.6	5.9 / 2.1	0.9	3/3
16	122	29		48(9)		7.7(1.0)	4.8(1.7)	1.2(0.4)	

Plasma concentrations of cholesterol (chol), triglyceride (trig) and HDL cholesterol (HDLc) and apo E genotype (apo E). Allelic frequencies of apo E are 0.84 for E3 and 0.15 for E4 among probands. Cholesterol and triglyceride mean values correspond to column A and are expressed as mean (SD).

Column A - Maximum values for plasma lipid concentrations obtained from patients' files during long-term follow-up (minimum of 1 year in all cases).

Column B - Values obtained on entry into the study.

Mean values expressed as mean (SD).

Table 2. Biometric characteristics of the groups studied.

Variable	Probands	HL-rel	NL-rel	Controls
Number	16	32	74	63
Age	48(9) ^{a,b}	37(24)	33(20) ^c	42(19)
Gender (M/F)	13/3 ^{a,b,c}	13/19	31/43	30/33
BMI (Kg/m ²)	29.3(3.7) ^{a,b,c}	25.4(5.8)	24.5(5.9)	2.9(3.3)
Diastolic BP	81(9) ^b	76(19)	71(15) ^c	76(11)
Systolic BP	128(13) ^b	129(27) ^b	119(23)	125(18)

Values expressed as mean (SD).

Gender Male/Female. Hyperlipidemic (HL-rel) and normolipidemic (NL-rel) relatives.

^a Significantly different from HL -rel.

^b Significantly different from NL-rel.

^c Significantly different from controls.

Table 3. Lipid, lipoprotein and apolipoprotein concentrations in the study groups.

Variable	Probands n=16	HL-rel n=32	NL-rel n=74	Controls n=63
Plasma Chol	6.41(1.07) ^{b,c}	6.12(1.02) ^{b,c}	4.42(0.82)	5.08(0.93)
Plasma Trig	2.32(0.70) ^{a,b,c}	1.36(0.82) ^{b,c}	0.88(0.42)	1.06(0.61)
VLDL				
Chol	0.90(0.31) ^{a,b,c}	0.41(0.47) ^{b,c}	0.21(0.22)	0.23(0.20)
Trig	1.56(0.50) ^{b,c}	0.77(0.73) ^{b,c}	0.42(0.33)	0.49(0.47)
Apo B	24.39(11.78) ^{b,c}	14.77(20.92) ^b	5.67(7.36) ^c	10.16(11.00)
IDL				
Chol	0.46(0.19) ^{b,c}	0.25(0.27) ^{b,c}	0.14(0.10)	0.17(0.12)
Trig	0.31(0.09) ^{b,c}	0.17(0.12) ^{b,c}	0.12(0.06)	0.12(0.06)
Apo B	8.72(5.35)	6.83(6.52)	4.59(1.68)	5.07(3.20)
LDL				
Chol	4.21(0.85) ^{b,c}	4.02(0.91) ^{b,c}	2.89(0.70)	3.36(0.76)
Trig	0.43(0.13) ^{b,c}	0.28(0.10) ^{b,c}	0.22(0.08)	0.25(0.09)
Apo B	95.63(16.34) ^{b,c}	90.07(18.76) ^{b,c}	64.59(17.12)	72.95(16.90)
HDL2	0.13(0.06)	0.21(0.10)	0.20(0.15) ^c	0.29(0.20)
HDL3	0.78(0.19)	1.07(0.28)	0.98(0.28)	1.06(0.22)
Total HDL	0.92(0.21) ^c	1.27(0.34)	1.20(0.30)	1.35(0.33)
Plasma apo A-I	113.25(20.52)	128.63(24.16)	114.85(18.57)	123.89(18.79)
Plasma apo B	130.31(19.74) ^{b,c}	107.44(27.17) ^{b,c}	71.70(18.72) ^c	87.53(23.24)
Plasma apo C-II	6.85(1.24) ^{b,c}	6.26(1.40) ^{b,c}	5.23(0.82) ^c	4.59(0.42)
Plasma apo C-III	15.17(2.97) ^{b,c}	13.99(5.05) ^{b,c}	10.77(2.45)	11.04(1.62)
Lp(a)	20.83(19.50)	19.65(16.25)	19.20(17.95)	24.03(14.72)

Hyperlipidemic (HL-rel) and normolipidemic (NL-rel) relatives. Cholesterol and triglycerides in plasma and all fractions are expressed as mmol/L. Apolipoproteins in plasma and all fractions and Lp(a) are expressed in mg/dL.

^a Significantly different compared to HL relatives.

^b Significantly different compared to NL relatives.

^c Significantly different compared to controls.

Statistical differences assessed by ANOVA with data adjusted for age, gender and BMI.

All values expressed as means (SD).

Table 4. Lipid, lipoprotein and apolipoprotein parameters in subjects from FCHL families and control families based on genotype.

Variable	FCHL families		Control families	
	CC n=62	CT/TT n=58	CC n=39	CT/TT n=24
Plasma Chol	4.98 (1.14)	5.28(1.28)	4.89(0.96)	5.27(0.81)
Plasma Trig	1.06(1.23)	1.45(1.00) ^a	0.95(0.38)	0.97(0.45)
VLDL				
Chol	0.27(0.49)	0.45(0.50) ^c	0.20(0.15)	0.19(0.17)
Trig	0.55(0.97)	0.79(0.81) ^b	0.42(0.31)	0.41(0.32)
Apo B	6.99(10.03)	14.68(17.08) ^b	8.37(8.33)	8.63(5.01)
IDL				
Chol	0.17(0.12)	0.25(0.25) ^a	0.15(0.08)	0.16(0.16)
Trig	0.14(0.11)	0.17(0.13) ^b	0.11(0.05)	0.11(0.07)
Apo B	4.96(2.36)	6.51(5.36) ^a	4.77(3.31)	5.29(3.38)
LDL				
Chol	3.38(0.98)	3.37(1.03)	3.23(0.78)	3.65(0.67)
Trig	0.25(0.12)	0.27(0.11)	0.23(0.08)	0.26(0.11)
Apo B	76.54(21.09)	71.90(22.35)	70.33(17.85)	77.84(13.77)
HDL2	0.18(0.15)	0.20(0.11)	0.30(0.25)	0.27(0.12)
HDL3	0.93(0.27)	1.02(0.29)	1.05(0.20)	1.09(0.25)
Total HDL	1.13(0.30)	1.23(0.35)	1.35(0.37)	1.36(0.27)
Plasma apo A-I	113.52(18.14)	122.96(23.20) ^b	122.15(18.56)	121.49(18.96)
Plasma apo B	86.72(31.96)	90.12(33.16)	84.29(20.99)	89.67(19.91)
Plasma apo C-II	5.59(1.63)	5.77(1.30)	4.52(0.40)	4.30(0.36)
Plasma apo C-III	11.51(4.71)	12.75(4.64) ^a	10.78(1.26)	11.34(2.07)

Cholesterol and triglycerides in plasma and all fractions are expressed as mmol/L.

Apolipoproteins in plasma and all fractions are expressed in mg/dL.

All values expressed as means (SD).

Statistical differences assessed by ANOVA with data adjusted for age, gender and BMI.

^a p<0.05; ^b p<0.01; ^c p<0.001 compared to the CC genotype in FCHL families.

Figure 1

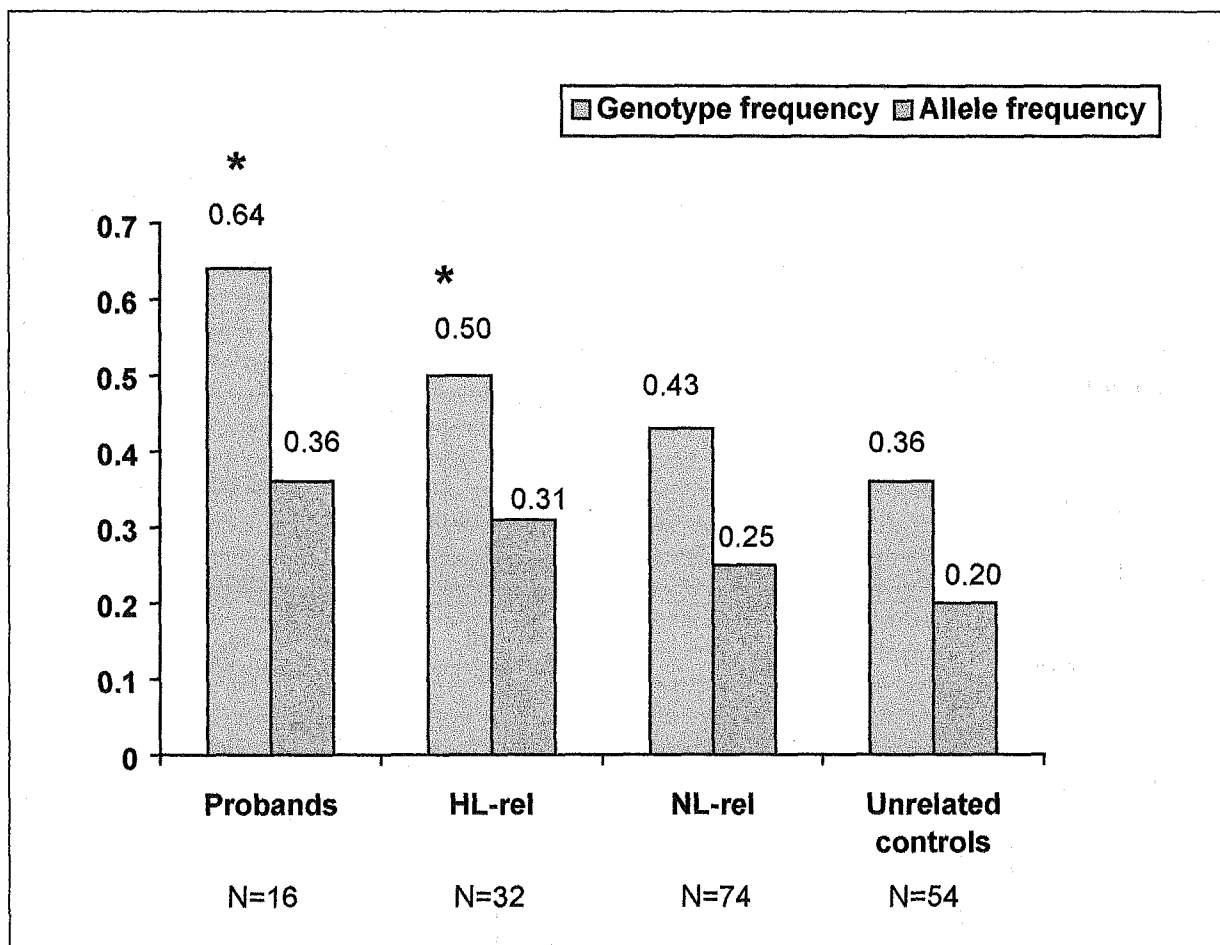


Figure 1.

Genotype (CT/TT) and allelic frequencies of the minor allele (T) in FCHL families: Probands, Hyperlipidemic relatives (HL-rel), Normolipidemic relatives (NL-rel), and unrelated Controls.

* Statistically different from controls. Probands ($p < 0.01$), HL-rel ($p < 0.001$).

Figure 2.

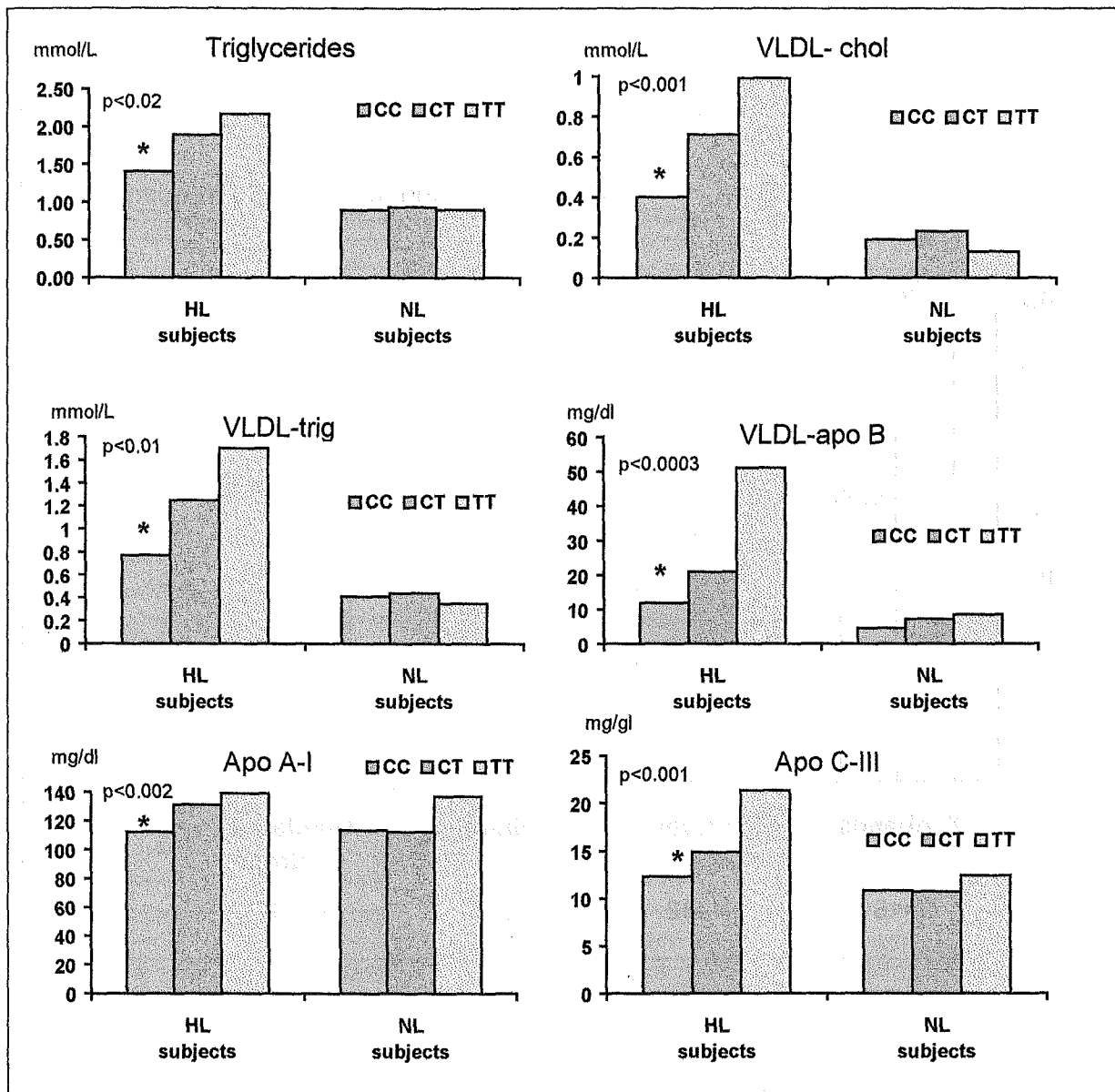


Figure 2. Genotype-status interaction in relation to concentrations of plasma triglycerides, VLDL-chol, VLDL-trig, VLDL-apoB, apo C-III and apo A-I. Note : Gene dosage observed only among the hyperlipidemic members of FCHL families. * Statistically significant linear correlation.

4.4. ESTUDI 3

Estudi de les concentracions plasmàtiques de retinol en individus afectes d'hiperlipèmia familiar combinada.

Ribalta J, La Ville AE, Girona J, Vallvé JC, Masana L. *Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia. Arch Intern Med. (En revisió).*

Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia.

Abstract

Background : Up to 20% of the survivors of acute myocardial infarction present with the heritable form of hyperlipidaemia termed familial combined hyperlipidemia (FCHL). Some of the genes reported to be involved in this disorder, such as that of lipoprotein lipase (LPL) and apolipoprotein (apo) C-III, are controlled by a peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) / retinoic acid receptor X (RXR) regulatory system which is retinoic acid dependant. We hypothesised that the availability of retinoic acid or its precursor retinol (vitamin A) could be altered in FCHL and could help explain some aspects of the phenotypic expression of the disease.

Methods : Plasma lipids, lipoproteins, apolipoproteins and retinol concentrations were measured in 30 FCHL subjects (from 16 families) and 56 control subjects from 12 families. Since vitamin A circulates in close association with the plasma lipoproteins, all statistical analyses were performed on data adjusted for plasma cholesterol and triglyceride concentrations.

Findings : Plasma retinol concentrations in FCHL subjects were significantly lower than that of control subjects (418.9 ± 229.5 vs. 888.9 ± 352.2 $\mu\text{g/L}$, respectively; $p < 0.0001$). Interestingly, plasma retinol concentration correlated significantly with plasma cholesterol ($R = 0.38$; $p < 0.003$), triglycerides ($R = 0.23$; $p < 0.05$), LDL cholesterol ($R = 0.32$; $p < 0.01$) and apolipoprotein B ($R = 0.42$; $p < 0.001$) in controls whereas, in the FCHL subjects, it correlated significantly only with parameters of reverse cholesterol transport; HDL cholesterol ($R = 0.44$; $p < 0.01$) and apolipoprotein A-I ($R = 0.53$; $p < 0.002$).

Interpretation : This novel finding of highly significant decreased concentrations of plasma retinol in FCHL relative to control subjects gives support to the hypothesis that vitamin A might be involved in the expression of this disorder.

Introduction

Familial combined hyperlipidemia (FCHL)¹ is the commonest genetic form of hyperlipidaemia and is present in about 20% of myocardial infarction survivors.² FCHL patients may present with hypercholesterolaemia, hypertriglyceridaemia or both. Moreover, the FCHL phenotype may vary among family members and even in the individual patient over time.³ Although the aetiology of this highly heterogeneous disorder is not well understood,⁴ several metabolic features such as very low density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein (apo) B overproduction,⁵ small dense low density lipoprotein (LDL) particles,⁶ decreased lipoprotein lipase (LPL) activity^{7,8} and elevated plasma apo C-III concentrations⁹ have been described. Mutations in the LPL^{10,11} and apo C-III^{12,13} genes associated with decreased LPL activity or elevated apo C-III concentrations have been reported to be more frequent among FCHL subjects. The interaction between these genetic variants and environmental factors such as diet and obesity contribute to the individual expression of the FCHL phenotype. Hence, it is of considerable importance to identify the mechanisms by which these factors regulate gene expression. For example, the LPL and apo C-III genes are stimulated and repressed, respectively, by fibrate therapy and dietary fatty acids.¹⁴⁻¹⁶ More precisely, the metabolic perturbation induced by environmental stimuli leads to the activation of a class of proteins belonging to the nuclear receptor superfamily termed Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs)¹⁷ which, by heterodimerising with the 9-*cis*-retinoic acid receptor X (RXR), recognise response elements (RE) of the promoter region of the above-mentioned target genes and, hence, control their expression. Both elements of this signalling pathway, PPAR and RXR, need to be physiologically activated to promote a regulatory effect on the target genes. PPARs are activated by multiple stimuli directly resulting from the action of hypolipidaemic agents (such as the fibrates), diet and lipid or glucose metabolism whereas RXR is activated by retinoic acid,^{16,17} which is an intracellular active form of dietary retinol (vitamin A). This is, therefore, a regulatory system in which the physiological response to drug or diet-induced changes would be directly dependent on the availability of vitamin A. In view of the role that this signalling pathway has on the regulation of genes known to be involved in FCHL, we hypothesised that the availability (i.e. concentrations in plasma) of vitamin A could be playing a role in the

expression of FCHL phenotype.

Subjects and methods

FCHL subjects

As part of a larger investigation into the inheritance of FCHL, sixteen families diagnosed as having the disease were identified from the Lipid Clinic of the Hospital Universitari de Sant Joan in Reus (Spain). Diagnosis was based on the index patient having plasma concentrations of cholesterol (chol) and triglycerides (tg) ≥ 6.4 mmol/L and/or ≥ 2.8 mmol/L, respectively, detected at any time in the clinical history and at least one first-degree relative with a hyperlipidaemic phenotype different from that of the proband. Among these families all those with plasma cholesterol or triglycerides ≥ 6.4 mmol/L and ≥ 2.8 mmol/L were assigned the FCHL phenotype (n = 30).

Biochemical analyses were conducted to rule out secondary causes of hyperlipidaemia and apo E genotyping was performed to exclude type III hyperlipidemia. Sixteen were on lipid-lowering diets and had been taken off lipid-lowering medication for a period of at least two months when recalled for the study. The rest (n = 14) were identified and recruited before any therapeutic intervention was initiated.

Normolipidaemic control subjects

Fifty six clinically-healthy individuals belonging to 12 normolipidaemic families volunteered to participate and were included as controls in this study. These individuals were recruited from among the clinical and laboratory staff. Subjects undergoing lipid lowering therapy or with secondary causes of hyperlipidaemia were excluded. None of the families met the criteria to be classified as FCHL.

All patients and control subjects recruited into the study gave fully-informed written consent and the protocol was approved by the Scientific and Ethical Committee of the Hospital Universitari de Sant Joan.

Analytical methods

A 10 ml venous blood sample was withdrawn after an overnight fast of 12 hours. One aliquot of the plasma samples was immediately frozen at -70°C in opaque containers for

plasma retinol and HDL cholesterol or apo A-I concentrations was detected in this group. Conversely, in the FCHL group, positive significant correlation between plasma retinol and HDL cholesterol ($R = 0.44$; $p=0.01$) and apo A-I ($R = 0.53$; $p = 0.002$) was observed.

Discussion

The present report forms part of a wider investigation into the genotypic and phenotypic expression of FCHL. The hypothesis that vitamin A could be involved in the expression of familial combined hyperlipidemia was based on observations which indicated that the increased synthesis and decreased catabolism of VLDL, which is characteristic of FCHL patients, is reverted by the action of fibrate therapy^{20,21} the mode of action being the stimulation of the expression of the triglyceride lipase enzyme and repression of the synthesis of its inhibitor, apo C-III.¹⁴⁻¹⁶ Further, this regulatory effect occurs via the PPAR / RXR system which depends on retinoic acid, the intracellular form of plasma vitamin A, being physiologically active.^{16,17} Since vitamin A is largely of dietary origin, this aspect could have some significance in the observed variation in the patterns of FCHL expression.

Our results indicating that plasma retinol concentrations were significantly lower in FCHL relative to control subjects are intriguing in that several phenomena associated with FCHL would, now, need to be explored.

Firstly, dietary intake of vitamin A could account for the 50% reduction in the circulating levels of retinol observed in FCHL subjects compared with controls^{22,23}. This possibility, however, cannot be the case in the present study since plasma retinol concentrations were no different between those FCHL subjects who were on lipid lowering diet (regularly monitored in the Lipid Clinic) and those who were not. Moreover, preliminary results indicated that vitamin A concentrations were also decreased in normolipidaemic members of FCHL families compared to control subjects (data not shown). These two aspects suggest that low plasma vitamin A concentrations could be more a feature of FCHL rather than a consequence of dietary restriction. Alterations of vitamin A absorption and its binding to RBP²⁴ could affect the assembly, transport and subsequent hepatic clearance of chylomicrons, the lipoprotein which delivers dietary vitamin A to the liver and which is reported to have a delayed post-prandial clearance in FCHL.⁹ *In vivo* lipoprotein kinetics using stable isotopes may help elucidate these aspects.

Secondly, the proposed hypothesis that vitamin A modulates the effect of the PPAR/RXR system on lipoprotein metabolism in response to fibrate or dietary therapy relies on the assumption that intracellular retinoic acid availability is dependent on the plasma concentration of its precursor, vitamin A. In the present study, vitamin A values in the FCHL subjects were not in the range that could be considered as a state of vitamin A deficiency (none of the subjects had plasma vitamin A concentrations below the mean minus two standard deviations of the control values) and, therefore, the extent to which the observed reductions could affect the intracellular availability of retinoic acid needs to be investigated since there is evidence indicating that vitamin A regulates the expression of apo A-I and C-III genes in a tissue specific manner in rats.²⁵

Thirdly, controversy exists regarding the closeness of the relationship between retinoids and lipids since, on one hand, hypertriglyceridaemia has been reported to develop as a result of the therapeutic use of retinoids²⁶ and, on the other hand, epidemiological studies have demonstrated that long-term vitamin A intake does not produce clinically-significant hypertriglyceridemia.²⁷ Again, *in vivo* lipoprotein kinetics using the recently-developed non-radioactive tracer methodologies in conjunction with *in vitro* testing of this signalling pathway by means of gene expression assays would resolve these questions; studies that are currently under way in our metabolic ward.

In conclusion, the novel observation of low vitamin A concentrations in subjects with FCHL is consistent with our hypothesis that vitamin A could be involved in the pathogenesis of this disorder. The cause of these low vitamin A concentrations requires prompt investigation also because of its reported anti-oxidant and, hence, anti-atherogenic characteristics.

- lipoprotein lipase gene (Asp9-Asn) contributes to the expression of familial combined hyperlipidemia. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 1543-1549.
- 12 Xu CF, Talmud P, Schuster H, Houlston R, Miller G, Humphries S. Association between genetic variation in the AI-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Clin Genet* 1994; **46**: 385-397.
- 13 Dallinga-Thie G, Bu X-D, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, Lusic AJ, de Bruin TWA. 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.
- 14 Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, et al. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. *J Clin Invest* 1995; **95**: 705-712.
- 15 Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, et al. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 1996; **15**: 5336-5348.
- 16 Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B. Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Atherosclerosis* 1996; **124**: S29-S37.
- 17 Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1302**: 93-109.
- 18 Schumaker VR, Puppione DL. Sequential flotation ultracentrifugation. *Method Enzymol* 1986; **128**: 155-170.
- 19 Bieri JC, Tolliver TJ, Catignani GL. Simultaneous determination of alpha-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. *Am J Clin Nutr* 1979; **10**: 2143-2149.
- 20 Kosykh VA, Podrez EA, Novikov DK, et al. Effect of bezafibrate on lipoprotein secretion by cultured human hepatocytes. *Atherosclerosis* 1987; **68**: 67-76.
- 21 Goldberg AP, Applebaum-Bowden DM, Bierman EL, et al. Increase in lipoprotein lipase during clofibrate treatment of hypertriglyceridemia in patients on hemodialysis. *N Eng J Med* 1979; **301**: 1073-1076.
- 22 Goodman DW. Vitamin A and retinoids in health and disease. *N Eng J Med* 1984; **310**: 1023-1030.

References

- 1 Rose HG, Kranz P, Weinstock M, Juliano J, Haft JI. Inheritance of combined hyperlipidemia: Evidence for a new lipoprotein phenotype. *J Lipid Res* 1973; **54**: 148-160.
- 2 Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidaemia in coronary heart disease II: Genetic analyses of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973; **52**: 1544-1568.
- 3 Brunzell JD, Albers JJ, Chait A, Grundy SM, Groszek E, Mc Donald GB. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 1983; **24**: 147-155.
- 4 Kwiterovich PO. Genetics and molecular biology of familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol* 1993; **4**: 133-143.
- 5 Janus ED, Nicoll AM, Turner PR, Magill P, Lewis B. Kinetic bases of the primary hyperlipidemias: Studies of apolipoprotein B turnover in genetically defined subjects. *Eur J Clin Invest* 1980; **10**: 161-172.
- 6 Austin MA, Horowitz H, Wijsman E, Krauss RM, Brunzell J. Bimodality of plasma apolipoprotein B levels in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1992; **92**: 67-77.
- 7 Babirak SP, Iverius P-H, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterisation of the heterozigote state of lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1989; **9**: 326-334.
- 8 Babirak SP, Brown BG, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arterioscl Thromb* 1992; **12**: 1176-1183.
- 9 Castro-Cabezas M, de Bruin TWA, Jansen H, Kock AW, Kortland W, Erkelens DW. Impaired chylomicron remnant clearance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 1993; **13**: 804-814.
- 10 Mailly F, Tugrul Y, Reymer PW, et al. A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9-Asn). Functional implications and prevalence in normal and hyperlipidemic subjects. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1995; **15** : 468-478.
- 11 Reymer PW, Groenemeyer BE, Gagne E, et al. A frequently occurring mutation in the

- 23 Blomhoff R, Green M, Morum K. Vitamin A: Physiological and biochemical processing. *Ann Rev Nutr* 1990; **49**: 1-12.
- 24 Kanai M, Raz A, Goodman DS. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 1968; **47**: 2025-2044.
- 25 Nagasaki A, Kikuchi T, Kurata K, Masushige S, Hasegawa T, Kato S. Vitamin A regulates the expression of apolipoprotein AI and CIII genes in the rat. *Biochem Bioph Res Co* 1994; **205**: 1510-1517.
- 26 Cohen PR. The use of gemfibrozil in a patient with chronic myelogenous leukemia to successfully manage retinoid-induced hypertriglyceridemia. *Clin Investig* 1993; **71**: 74-77.
- 27 Omenn GS, Goodman GE, Thornquist M, Brunzell JD. Long-term vitamin A does not produce clinically significant hypertriglyceridemia: results from CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; **3**: 711-713.

Table 1. Biometric characteristics of the FCHL and control group of subjects.

	FCHL (n=30)	CONTROL (n=56)
Age	44.1 ± 19.5	40.0 ± 17.2
BMI (Kg/m ²)	26.9 ± 5.6	24.4 ± 3.8
Gender (M/F)	16/14	26/30

Body mass index (BMI). Gender (Male/Female).

Table 2. Lipid, lipoprotein and apolipoprotein values in the FCHL and Control group of subjects.

	FCHL (n=30)	CONTROL (n=56)
Chol	6.47 ± 0.93#	4.92 ± 0.91
Tg	1.82 ± 0.83#	0.99 ± 0.53
VLDL		
Chol	0.65 ± 0.47#	0.20 ± 0.17
Tg	1.11 ± 0.67#	0.46 ± 0.42
IDL		
Chol	0.38 ± 0.27#	0.15 ± 0.09
Tg	0.24 ± 0.12#	0.12 ± 0.05
LDL		
Chol	4.34 ± 0.87#	3.27 ± 0.76
Tg	0.36 ± 0.13#	0.25 ± 0.08
Total HDL	1.09 ± 0.33	1.32 ± 0.35
HDL ₂	0.17 ± 0.09	0.27 ± 0.15
HDL ₃	0.92 ± 0.28	1.05 ± 0.26
Lp(a)	20.8 ± 17.9	23.0 ± 14.0
Apo A-I	122.3 ± 26.3	121.9 ± 20.4
Apo B	122.1 ± 22.6#	83.7 ± 21.3
Apo C-II	6.6 ± 1.3#	4.7 ± 0.5
Apo C-III	14.5 ± 3.0#	10.9 ± 2.0

Cholesterol and triglycerides in plasma and lipoprotein fractions are expressed as mmol/L.

Lp (a) and apolipoproteins are expressed as mg/dL.

Significantly different from control.

Table 3. Plasma retinol correlations with lipid and apolipoprotein concentrations.

Group	Chol	Tg	LDLc	HDLc	Apo B	Apo A-I
FCHL	0.15 (NS)	0.12 (NS)	0.05 (NS)	0.44 (p<0.01)	0.20 (NS)	0.53 (p<0.002)
CONTROL	0.38 (P<0.003)	0.23 (P<0.05)	0.32 (P<0.01)	0.004 (NS)	0.42 (p<0.001)	0.22 (NS)

Correlation (R) values adjusted for age, gender and BMI. Statistical significance in brackets.

Figure 1.

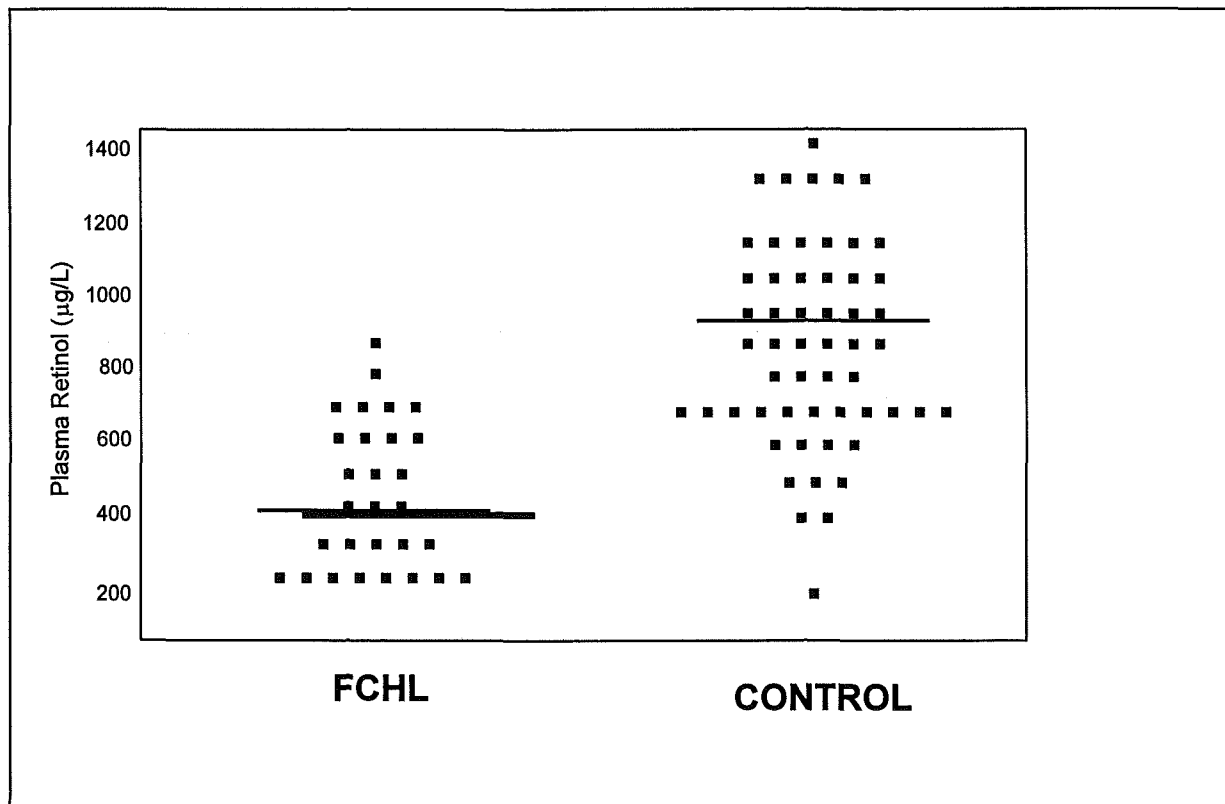


Figure 1

Plasma retinol concentrations in the individual FCHL (n=30) and control subjects (n=56). Horizontal line indicates mean plasma retinol concentrations of each group.

4.5. ESTUDI 4

Estudi de les lipoproteïnes d'alta densitat i la seva relació amb l'activitat de l'enzim LCAT en pacients amb hiperlipèmia familiar combinada.

Ribalta J, La Ville AE, Vallvé JC, Girona J, Masana L.
Lecithin :cholesterol acyltransferase activity is not altered in familial combined hyperlipidemia. Atherosclerosis. (En revisió).

Lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) activity is not altered in Familial combined hyperlipidemia.

Abstract

Elevated concentrations of plasma cholesterol and triglycerides are characteristic of Familial Combined Hyperlipidemia (FCHL) which may also present reduced high density lipoprotein (HDL) cholesterol concentrations. Lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) plays a key role in the reverse cholesterol transport by converting unesterified cholesterol to cholesterol ester in the process of maturation of HDL and, therefore, could influence HDL metabolism in these patients.

We aimed to study high density lipoproteins and LCAT activity in 25 FCHL subjects and 48 controls. Total HDL ($p=0.018$) and HDL₂ ($p=0.008$) were significantly decreased in the FCHL group compared with controls. After analyses with adjusted data only HDL₂ remained significantly decreased in the FCHL group ($p=0.050$). The LDLc/HDLc and A-I/HDLc ratios were significantly elevated in the FCHL group, the latter suggesting the existence of compositional differences in the HDL particles of the FCHL individuals.

LCAT activity assessed in the FCHL (19.94 ± 3.95 nmol/ml/h) and control (20.13 ± 6.86 nmol/ml/h) groups showed no statistically significant differences. A significant positive correlation of LCAT activity with total HDL ($r=0.42$), HDL₃ cholesterol ($r=0.46$) and apolipoprotein A-I ($r=0.47$) was observed in affected subjects but not in controls.

An association between a G₋₇₆-A variation in the promoter region of the apo A-I gene and elevated concentrations of total HDL cholesterol ($p=0.052$) and apo A-I ($p=0.009$) was observed. This association was strongly influenced by the status of the subject (FCHL or control) providing further evidence for a regulatory role of this genetic region in the expression of FCHL.

Our data suggests that LCAT activity is normal in FCHL and, therefore, does not account for the abnormalities observed in these patients essentially with regard to the HDL₂ subfraction.

Introduction

Familial combined hyperlipidemia (FCHL) is the commonest genetic form of hyperlipidemia among survivors of premature myocardial infarction (10-20%) with an estimated prevalence of 0.5-2% in the general population [1,2]. Family studies are necessary to diagnose FCHL in an individual patient since the FCHL phenotype may vary among family members and, over a temporal sequence, even in the individual patient, with hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, or both, being expressed [3,4]. Increased flux of apolipoprotein (apo) B of very low density lipoprotein (VLDL) and decreased catabolism of VLDL and intermediate density lipoproteins (IDL) have been reported in these patients [5-8]. Increase of small dense low density lipoproteins (LDL) [9,10] and impaired lipoprotein lipase (LPL) activity [11,12] are also features associated with the FCHL phenotype in a subset of patients.

Low concentrations of high density lipoprotein (HDL) have been reported in relation to FCHL [4,13,14] and could account for the increased risk of coronary artery disease (CAD) associated with this disorder [15,16]. If these reductions can be considered a specific characteristic of these patients remains to be elucidated since factors of a either metabolic (hypertriglyceridemia, insulin resistance, menopause) [17-19], environmental (smoking, physical exercise) [20,21] or genetic (apo E genotype) [22] nature may partially explain these reductions. Conversely, several reports suggest that key proteins involved in reverse cholesterol transport, such as, Lecithin :cholesterol acyltransferase (LCAT) and cholesterol ester transfer protein (CETP) might be altered in these patients [23,24]. LCAT converts unesterified cholesterol to cholesterol ester in the process of maturation of HDL [25,26] whereas CETP exchanges neutral lipids between triglyceride-rich lipoproteins and HDL [27]. While CETP has been reported to have increased activity in patients with combined hyperlipidemia [24], the potential role of LCAT in FCHL has been pointed out in animal studies [23] but remains to be clarified in humans. More precisely, familial hypercholesterolemic swine, which resemble FCHL, present elevations in HDL cholesterol in response to drug treatment which are accompanied of increased LCAT activity.

The fact that the gene encoding for apo A-I, the activator of LCAT, is located in the AI-CIII-AIV gene cluster to which extensive data links to the aetiology of FCHL [28-30], further supports a potential role of LCAT in the expression of FCHL.

We aimed to study high density lipoproteins and LCAT activity in subjects with familial combined hyperlipidemia and also its relation with a polymorphism in the promoter region of the apo A-I gene in order to investigate a potential genetic component underlying the reverse

transport of cholesterol in FCHL.

Subjects and methods

All subjects recruited into the study gave fully-informed written consent and the protocol was approved by the Scientific and Ethical Committee of the Hospital Universitari de Sant Joan.

FCHL families

Nine index patients diagnosed as having FCHL were recruited from the Lipid Clinic of the Hospital Universitari de Sant Joan in Reus (Spain). Diagnosis was based on the subject having plasma concentrations of cholesterol (chol) and triglycerides (trig) ≥ 6.4 mmol/L and ≥ 2.8 mmol/L, respectively, detected at any time in the clinical history and at least one first degree relative with a hyperlipidemic phenotype different from that of the proband. Mean plasma cholesterol and triglyceride values of index subjects during selection were 7.5 ± 0.9 and 4.5 ± 1.5 mmol/l, respectively.

Biochemical analyses were conducted to rule out secondary causes of hyperlipidemia and apo E genotyping was performed to exclude type III hyperlipidemia. All index subjects were on a lipid lowering diet and had been taken off lipid lowering medication for a period of at least two months when recalled for the study. All available family members of index patients with plasma cholesterol concentrations ≥ 6.4 mmol/L and/or plasma triglycerides ≥ 2.8 mmol/L or elevated above the 95th percentile for age and gender were assigned the FCHL phenotype (n=16). The FCHL group totalled with the index subjects 25 individuals .

Normolipidemic control families

Forty eight individuals belonging to 12 normolipidemic families volunteered to participate and were included as controls in this study. The families were from among the clinical and laboratory staff. Subjects undergoing lipid lowering therapy or with secondary causes of hyperlipidemia were excluded. None of the families met the criteria to be classified as FCHL.

Analytical methods

A 10 ml venous blood sample was withdrawn after an overnight fast of 12 hours. Triglycerides and cholesterol in plasma and lipoprotein fractions were measured using enzymatic kits (Boehringer Mannheim, Germany) adapted for a Cobas Mira analyzer (Roche Pharmaceuticals, Switzerland) with Precilip EL[®] and Precinorm[®] (Boehringer Mannheim, Germany) as quality controls. Immuno-turbidometry was employed for the measurement of the apolipoproteins using specific antiserum purchased from Boehringer Mannheim, Germany (for apo A-I and apo B), Daiichi Chemicals, Japan (for apo C-II and apo C-III) and Incstar Corporation, U.S.A (for Lp(a)).

Sequential preparative ultracentrifugation

Lipoproteins were separated by sequential preparative ultracentrifugation [31], using a Kontron 45.6 fixed-angle rotor in a Centrikon 1075 (Kontron Instruments, Italy). The lipoprotein fractions isolated were VLDL ($d < 1.006$ g/ml), IDL ($d = 1.006-1.019$ g/ml) and LDL ($d = 1.019-1.063$ g/ml). Total HDL and HDL3 cholesterol were measured subsequent to the precipitation of the apo B-containing lipoproteins with polyethylene glycol (Immuno AG, Austria). HDL2 cholesterol was calculated from the difference between total HDL and HDL3 cholesterol.

LCAT activity assay

LCAT activity was assessed using the liposome substrate prepared according to Albers et al [32]. The reaction was initiated by mixing 15 μ L of plasma and 100 μ L of the substrate. Samples were incubated for 30 minutes at 37°C and the reaction stopped by addition of 2 ml of ethanol. LCAT was extracted into hexane and the hexane phase was evaporated under nitrogen, and the free and esterified cholesterol fractions were separated by thin layer chromatography. The cholesterol ester bands were visualized with rhodamine scraped from the plates and put into liquid scintillation fluid for beta counting. LCAT activity is expressed as nmol cholesterol esterified/ml/hour.

DNA analyses

DNA was extracted from an aliquot of frozen white cells by the salting out method [33]. PCR [34] was carried out to amplify the region containing the G₋₇₅-A substitution. The

reaction mixture (50 μ L) for amplification contained 250 ng of each of the two primers (Boehringer Mannheim, Germany), 5' primer, 5'-AGGGACAGAGCTGATCCTTGAACCTCTTAAG-3' and 3' primer, 5'-TTAGGGGACACCTAGCCCTCAGGAAGAGCA-3', 200 ng of genomic DNA and 1 U of Taq polymerase (Boehringer Mannheim, Germany). Magnesium concentration in the reaction buffer was 1.5 mM. The reactions were performed on a Hybaid Omnigene thermocycler at 95°C for 5 min, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72°C for 2 min. Twenty microliters of PCR product were digested overnight with 9 U of the restriction enzyme *MspI* (Boehringer Mannheim) in a total volume of 30 μ L using the buffer recommended by the manufacturer. The DNA fragments were separated by electrophoresis on 2% agarose gels.

Digestion with *MspI* results in four fragments of 48, 67, 110 and 207 bp. In the absence of the *MspI* cutting site three fragments of 48, 177 and 207 bp are produced [35].

Statistical Analyses

The χ^2 test was used to compare the frequency of the $A_{.75}$ genotypes (GA/AA) among groups. The Z test for comparison of proportions was used to compare allele frequencies. ANOVA was performed to compare the means of the lipid and LCAT activity adjusted data and \log_{10} transformed when the variables were not normally distributed. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was tested with the χ^2 goodness-of-fit test. Results are expressed as means \pm standard deviations. Statistical significance was accepted at the 0.05 level.

Results

According to the criteria mentioned above, the population of study was divided in two groups. Those subjects belonging to FCHL families expressing the FCHL phenotype (*FCHL*; n=25) and a group of healthy controls (*controls*; n=48). Biometric data of the two groups is summarised in table 1. The two groups were comparable with relation to age and gender distribution. The percentage of cigarette smokers (26% and 33%, respectively) and premenopausal women (71% and 83%, respectively) in FCHL subjects and controls was not

significantly different. The BMI was elevated in the FCHL group relative to controls ($p=0.035$)

Lipoproteins and apolipoproteins

In the affected group 13 subjects with hypercholesterolemia alone, 4 subjects with hypertriglyceridemia alone and 8 subjects presenting both, were identified. Plasma concentrations of lipoproteins related to peripheral lipid transport (VLDL, IDL and LDL) (Table 2) and to reverse cholesterol transport (total HDL, HDL2 and HDL3) (table 3) were studied in the two groups. Cholesterol and triglycerides in plasma, VLDL, IDL and LDL together with apolipoproteins B, C-II and C-III were significantly elevated among FCHL subjects compared with control individuals.

In relation to HDL metabolism, total HDL ($p=0.018$) and HDL2 ($p=0.008$) cholesterol concentrations were decreased among FCHL subjects. After ANOVA analyses on data adjusted for age, gender, BMI and fasting plasma triglycerides only differences regarding the HDL2 fraction remained significant ($p=0.050$). Significantly elevated values for the apo A-I/HDLc ($p<0.0001$) and LDLc/HDLc ($p<0.0001$) ratios were observed in the FCHL group compared with controls.

LCAT activity

LCAT activity was determined in FCHL and control subjects. ANOVA analyses on adjusted data did not show any difference between groups regarding LCAT activity (table 4). Significant differences between groups were observed with the correlation of LCAT activity with apo A-I and HDL cholesterol concentrations. Statistically significant correlation (r) values of 0.47, 0.42 and 0.46 were obtained with LCAT activity and apo A-I, total HDL and HDL3, respectively, in the FCHL group. LCAT activity significantly correlated only with HDL2 ($r=0.27$) in controls.

G₋₇₅-A polymorphism in the promoter of the apo A-I gene

The observed frequencies of the GG, GA and AA genotypes in the two groups were not different from those predicted by the Hardy-Weinberg distribution. The genotype (GA+AA) (0.37 vs 0.27) and allele frequencies (0.21 vs 0.13) in the FCHL and control groups were not significantly different.

The effect of the A₋₇₅ allele on lipids, lipoproteins and apolipoproteins was studied.

IDL cholesterol ($p=0.032$), apo C-III ($p=0.041$) and apo A-I ($p=0.009$) were significantly elevated in subjects carrying the A_{75} allele. Total HDL showed elevations in the A_{75} which almost reached statistical significance ($p=0.052$). Genotype-status interaction was investigated by means of an ANOVA model showing that the relationship between this polymorphism and triglyceride-rich lipoproteins was significantly modified by the status of the subject (FCHL or controls). This interaction was also found to affect total HDL and apo A-I.

LCAT activity was also studied in relation with the G-A substitution of the apo A-I gene. LCAT activity in subjects with the GG genotype (19.83 ± 6.97 nmol/ml/hour) was almost identical to that of the A allele carriers (19.51 ± 3.90 nmol/ml/hour). No significant genotype-status interaction was detected with regard to the activity of the enzyme.

Discussion

The population studied had unusually normal mean plasma triglyceride concentrations for a FCHL group when recruited for the study and this is for two reasons. First, the presence of several FCHL subjects with plasma triglyceride concentrations above the 95th percentile for age and gender although not necessarily meaning above 2.8 mmol/l, the cut-off point value for an adult FCHL patient. Second, a clear over-representation of isolated hypercholesterolemia ($n=13$) versus isolated hypertriglyceridemia ($n=4$). Given the well known effect that hypertriglyceridemia has on HDL metabolism, this group of subjects seemed to be an appropriate sample to explore any possible alteration of HDL related to FCHL, minimising the effect of hypertriglyceridemia.

Concentrations of HDL cholesterol might be reduced in FCHL [4,13,14]. However, before this can be considered a specific characteristic of FCHL, several aspects should be taken into account. The diversity of lipoprotein phenotypes present among FCHL subjects, as well as, a number of factors such as high fasting plasma triglycerides, cigarette smoking, alcohol intake or physical exercise [17-22] can account for the low levels of HDL observed in these subjects. Our results confirm this point by showing that the reductions in total HDL and HDL3 among FCHL subjects are essentially explained by their age, gender, BMI and plasma triglycerides. However, HDL2 cholesterol concentrations are significantly reduced in this group and this is consistent with the data of Brunzell and co-workers [4] indicating that reductions in HDL mostly affect the HDL2 fraction in FCHL.

The increased LDLc/HDLc and A-I/HDLc ratios observed in the FCHL group compared with controls remained significant in all the cases. While the former is most likely a consequence of the reported hepatic overproduction of VLDL and, to a lesser extent, of LDL [7], the understanding of the latter might be of importance. Assuming that apo A-I is almost completely contained in the HDL fraction, an elevated A-I/HDLc ratio suggests the existence of some alterations in the composition of the HDL particles. Whether these alterations might result in less efficient reverse cholesterol transport which could, subsequently, contribute to the increased risk of CAD associated with FCHL, remains to be elucidated. Should it be so, those proteins involved in the modelling of HDL particles, LCAT and CETP, could play a role in this process. While CETP has recently been reported to have an increased activity in patients with combined hyperlipidemia [24], LCAT has not been studied in much detail in relation to FCHL.

To clarify whether LCAT could play a role in the regulation of HDL cholesterol in these patients, its activity was assessed *in vitro* in the both groups of study. Our results showed that LCAT activity was the same in FCHL or control subjects, indicating that a defective form of the enzyme associated with FCHL ought to be discarded. However, since the ability of LCAT to esterify cholesterol is assessed, *in vitro*, using an artificial substrate [32], a defective function of the enzyme, *in vivo*, due to the specific composition of the HDL particles of these patients should not be ruled out. This possibility is strengthened by several studies which indicate that the phospholipid or apolipoprotein composition of HDL might have an important effect on LCAT activity [37,38]. Further studies of LCAT activity *in vivo* in these patients should be made in order to clarify this point.

Of interest is also the markedly different correlation between LCAT activity and HDL parameters in FCHL and control subjects. A positive significant correlation of LCAT with apo A-I, total HDL and HDL₃ was observed in FCHL subjects but not in controls. This could suggest that HDL cholesterol concentrations are more importantly influenced by LCAT in those subjects with a hyperlipidemic profile.

A potential genetic component underlying the observed differences was assessed by studying a G₇₅A substitution in the promoter region of the apo A-I gene [35]. Apo A-I, the major protein component of HDL and the activator of LCAT, is encoded in the AI-CIII-AIV gene cluster to which extensive data link to FCHL [28-30]. This variation showed to be associated with elevations in IDL cholesterol and apolipoproteins A-I and C-III. Interestingly, the associations between this polymorphism and parameters related to triglyceride-rich

metabolism were found to be significantly different in FCHL and control subjects. This genotype-status interaction confirms previous observations by our group [39] and supports the reported regulatory role of the AI-CIII-AIV gene cluster in FCHL [30].

We conclude that LCAT enzyme is normal in FCHL and, therefore, does not account for the abnormalities observed in these patients essentially with regard to the HDL2 subfraction.

Acknowledgments

The authors wish to thank Prof. Steve Humphries and Dr. Chung-Fang Xu for invaluable help and advice in the setting-up of the molecular biology techniques; Mercedes Heras and Silvia Olivé, for their excellent technical support; Drs. Núria Plana, Pilar Sardà, Rosa Solà and Carlos Alonso-Villaverde for their clinical assistance. This study has been supported, in part, by the Fundació Joan Abelló Pascual and the Ministerio de la Salud (DGICYT # PM 92-0209).

References

- [1] Rose HG, Kranz P, Weinstock M, Juliano J, Haft JI. Inheritance of combined hyperlipidemia: Evidence for a new lipoprotein phenotype. *J Lipid Res* 1973 ; 54: 148.
- [2] Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidaemia in coronary heart disease II: Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidaemia. *J Clin Invest* 1973 ; 52: 1544.
- [3] Nikkilä EA, Aro A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet* 1973 ; 1: 954.
- [4] Brunzell JD, Albers JJ, Chait A, Grundy SM, Groszek E, Mc Donald GB. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 1983 ; 24: 147.
- [5] Chait A, Albers JJ, Brunzell JD. Very low density lipoprotein overproduction in genetic forms of hypertriglyceridemia. *Eur J Clin Invest* 1980 ; 10: 17.
- [6] Cortner JA, Coates PM, Bennett MJ, Cryer DR, Le NA. Familial combined hyperlipidemia: use of stable isotopes to demonstrate overproduction of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B by the liver. *J Inherited Dis* 1991 ; 14: 915.
- [7] Janus ED, Nicoll AM, Turner PR, Magill P, Lewis B. Kinetic bases of the primary hyperlipidemias: studies of apolipoprotein B turnover in genetically defined subjects. *Eur J Clin Invest* 1980 ; 10: 161.
- [8] Venkatesan S, Cullen P, Pacy P, Halliday D, Scott J. Stable isotopes show a direct relation between VLDL apo B overproduction and serum triglyceride levels and indicate a metabolically and biochemically coherent basis for familial combined hyperlipidemia. *Arterioscl Thromb* 1993 ; 13: 1110.
- [9] Austin MA, Brunzell JD, Fitch WL, Krauss RM. Inheritance of low density lipoprotein subclass patterns in familial combined hyperlipidemia. *Arteriosclerosis* 1990 ; 10: 520.
- [10] Austin MA, Horowitz H, Wijsman E, Krauss RM, Brunzell J. Bimodality of plasma apolipoprotein B levels in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1992 ; 92: 67.

- [11] Babirak SP, Iverius P-H, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1989 ; 9: 326.
- [12] Babirak SP, Brown BG, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arterioscl Thromb* 1992 ; 12: 1176.
- [13] Castro Cabezas M, de Bruin TWA, de Valk HA, Shoulders CC, Jansen H, Erkelens DW. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1993 ; 92: 160.
- [14] Brunzell J, Mazzone T, Motulsky A, Albers JJ. Abnormalities in high density lipoprotein composition in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 1982 ; 2: 416a.
- [15] Castro Cabezas M, de Bruin TWA, Erkelens DW. Familial combined hyperlipidemia: 1973-1991. *Neth J Med* 1992 ; 40: 83.
- [16] Kwiterovich PO. Genetics and molecular biology of familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol* 1993 ; 4: 133.
- [17] Frayn KN. Insulin resistance and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1993 ; 4: 197.
- [18] Kauma H, Savolainen MJ, Heikkila R, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, Kesaniemi YA. Sex difference in the regulation of plasma high density lipoprotein cholesterol by genetic and environmental factors. *Hum Genet* 1996 ; 97: 156.
- [19] Murakami T, Michelagnoli S, Longhi R, Gianfranceschi G, Pazzuconi F, Calabresi L, Sirtori CR, Franceschini G. Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodelling in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 ; 15: 1819.
- [20] Wilson PW, Evans JC. Coronary artery disease prediction. *Am J Hypertens* 1993 ; 6: 309S.
- [21] Angotti CM, Levine MS. Review of 5 years of a combined dietary and physical fitness intervention for control of serum cholesterol. *J Am Diet Assoc* 1994 ; 94: 634.
- [22] Sijbrands EJ, Westendorp RG, Hoffer MJ, Havekes LM, Frants RR, Meinders AE, Frolich M, Smelt AH. Effect of insulin resistance, apo E2 allele, and smoking on combined hyperlipidemia. *Arterioscl Thromb* 1994 ; 14: 1576.
- [23] Hasler-Rapacz J, Kempen HJ, Princen HM, Kudchodkar BJ, Lacko A, Rapacz J. Effects of simvastatin on plasma lipids and apolipoproteins in familial

- hypercholesterolemic swine. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1996 ; 16: 137.
- [24] Tato F, Vega GL, Tall AR, Grundy SM. Relation between cholesterol ester transfer protein and lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1995 ; 15: 112.
- [25] Applebaum-Bowden D. 1995. Lipases and lecithin :cholesterol acyltransferase in the control of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1995 ; 6: 130.
- [26] Leroy A, Dallongeville J, Fruchart JC. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1995 ; 6: 281.
- [27] Lagrost L. Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vivo and in vitro studies. *Biochim Biophys Acta* 1994 ; 1215: 209.
- [28] Wojciechowski AP, Farrall M, Cullen P, Wilson TME, Bayliss JD, Griffin BA, Caslake MD, Packard CJ, Shepherd J, Thakker R, Scott J. Familial combined hyperlipidemia linked to the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature* 1991 ; 349: 161.
- [29] Xu CF, Talmud P, Schuster H, Houlston R, Miller G, Humphries S. Association between genetic variation at the apo A-I-CIII-AIV gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Clin Genet* 1994 ; 46: 385.
- [30] Dallinga-Thie GM, Bu X-D, v L-S. Trip M, Rotter JI, de Bruin TWA. 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.
- [31] Schumaker VR, Puppione DL. Sequential flotation ultracentrifugation. *Method Enzymol* 1986 ; 128: 155.
- [32] Albers JJ, Chen C-H, Lacko AG. Isolation, characterization and assay of lecithin-cholesterol acyltransferase. *Method Enzymol* 1986 ; 129: 776.
- [33] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out method procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16: 1215.
- [34] Saiki RK, Ferrell RE, Stoffel S, Scharff SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 ; 239: 487.
- [35] Xu CF, Angelico F, Del Ben M, Humphries S. Role of genetic variation at the apo A-I-CIII-AIV gene cluster in determining plasma apo A-I levels in boys and girls. *Genet Epidemiol* 1993 ; 10: 113.

- [36] Castro cabezas M, de Bruin TWA, Jansen H, Kock AW, Kortland W, Erkelens DW. Impaired chylomicron remnant clearance in Familial Combined Hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb* 1993 ; 13: 804.
- [37] Bolin DJ, Jonas A. Binding of lecithin :cholesterol acyltransferase to reconstituted high density lipoproteins is affected by their lipid but not apolipoprotein composition. *J Biol Chem* 1994 ; 269: 20156.
- [38] Duverger N, Ghalim N, Theret N, Fruchart JC, Castro G. Lipoproteins containing apo A-IV : composition and relation to cholesterol esterification. *Biochim Biophys Acta* 1994 ; 1211: 23.
- [39] Ribalta J, La Ville AE, Vallvé JC, Humphries SE, 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 ; (In press).

Table 1. Biometric characteristics

	FCHL	CONTROL
Number	25	48
Age	41.3 ± 21.1	40.9 ± 18.1
Gender (M/F)	14/11	23/25
BMI (Kg/m ²)	26.1 ± 5.4 ^a	24.4 ± 3.7
Diastolic BP	77 ± 16	78 ± 14
Systolic BP	128 ± 24	125 ± 20

^a Significantly different from controls ; p=0.035. Gender Male/Female.

Table 2. Lipids and apolipoproteins related to VLDL, IDL and LDL.

Variable	FCHL (n=25)	CONTROLS (n=48)
Plasma Chol	6.30 ± 1.01 ^a	5.04 ± 1.04
Plasma Trig	1.79 ± 0.65 ^a	1.07 ± 0.65
VLDL		
Chol	0.63 ± 0.47 ^a	0.23 ± 0.21
Trig	1.11 ± 0.70 ^a	0.50 ± 0.50
IDL		
Chol	0.36 ± 0.27 ^a	0.17 ± 0.13
Trig	0.23 ± 0.12 ^a	0.12 ± 0.06
LDL		
Chol	4.24 ± 0.89 ^a	3.39 ± 0.84
Trig	0.35 ± 0.13 ^a	0.26 ± 0.10
Lp(a)	20.6 ± 17.4	20.9 ± 13.4
Plasma apo B	118.0 ± 25.7 ^a	88.3 ± 25.2
Plasma apo C-II	6.54 ± 1.28 ^a	4.65 ± 0.48
Plasma apo C-III	14.7 ± 4.52 ^a	10.8 ± 1.90

^a Significantly different from controls p<0.0001

Statistical differences assessed by ANOVA with data adjusted for BMI, gender and age.

Cholesterol and triglycerides are expressed in mmol/L. Apolipoproteins and Lp(a) are expressed in mg/dl.

Table 3. Lipids and apolipoproteins related to HDL metabolism.

Variable	FCHL (n=25)	CONTROL (n=48)	p ^a =	p ^b =
Total HDL	1.12 ± 0.35	1.28 ± 0.30	0.018	NS
HDL ₂	0.17 ± 0.10	0.24 ± 0.15	0.008	0.050
HDL ₃	0.95 ± 0.30	1.03 ± 0.23	NS	NS
Plasma apo A-I	123.6 ± 25.8	120.6 ± 19.2	NS	NS
A-I / HDLc	115.5 ± 20.0	97.2 ± 13.6	0.0001	0.014
LDLc / HDLc	4.15 ± 1.47	2.78 ± 0.88	0.0001	0.001

p^a= statistical significance with unadjusted data.

P^b= statistical significance for ANOVA with data adjusted for age, BMI, gender and fasting plasma triglycerides.

HDLc = HDL cholesterol ; LDLc = LDL cholesterol

Table 4. LCAT activity and correlation with apo A-I and HDL parameters in FCHL and control subjects.

	FCHL (n=25)	CONTROL (n=48)
LCAT activity	19.94 ± 3.95	20.13 ± 6.86
Correlation		
Apo A-I	r=0.47 (p=0.027)	r=0.01 (NS)
Total HDL	r=0.42 (p=0.047)	r=-0.01 (NS)
HDL2	r=0.12 (NS)	r=0.27 (p=0.040)
HDL3	r=0.46 (p=0.030)	r=-0.19 (NS)
A-I/HDLc	r=-0.16 (NS)	r=-0.02 (NS)
LDLc/HDLc	r=-0.21 (NS)	r=-0.23 (NS)

LCAT activity is expressed in nmol cholesterol esterified/ml/hour.

Values of LCAT activity and correlation with HDL parameters obtained from data adjusted for age, gender and BMI.

Table 5. Lipids and apolipoproteins related to VLDL, IDL and LDL based on genotype.

	GG	GA/AA	p=	Status interaction
Number	49	24		
Plasma Chol	5.40 ± 1.10	6.02 ± 1.28	NS	NS
Plasma Trig	1.29 ± 0.78	1.59 ± 0.90	NS	0.007
VLDL				
Chol	0.34 ± 0.30	0.54 ± 0.53	NS	0.0001
Trig	0.69 ± 0.80	0.93 ± 0.76	NS	0.002
IDL				
Chol	0.20 ± 0.14	0.35 ± 0.31	0.032	0.007
Trig	0.15 ± 0.08	0.21 ± 0.13	NS	0.009
LDL				
Chol	3.69 ± 0.99	3.95 ± 0.89	NS	NS
Trig	0.28 ± 0.12	0.33 ± 0.11	NS	NS
Lp(a)	20.21 ± 15.24	21.32 ± 15.56	NS	NS
Plasma apo B	97.4 ± 28.0	110.5 ± 29.7	NS	0.033
Plasma apo C-II	5.28 ± 1.11	5.87 ± 1.60	NS	0.006
Plasma apo C-III	11.9 ± 2.4	14.1 ± 5.5	0.041	0.0001

Statistical differences assessed by ANOVA with data adjusted for BMI, gender and age. Cholesterol and triglycerides are expressed in mmol/L. Apolipoproteins and Lp(a) are expressed in mg/dl. Status interaction indicates a significant effect of being a FCHL subject on the association between the polymorphism and lipid parameters.

Table 6. Lipids and apolipoproteins related to HDL based on genotype.

	GG	GA/AA	p=	Status interaction
Number	49	24		
Total HDL	1.19 ± 0.35	1.24 ± 0.29	0.052	0.029
HDL ₂	0.21 ± 0.15	0.23 ± 0.09	NS	NS
HDL ₃	0.99 ± 0.27	1.01 ± 0.25	0.083	NS
Plasma apo A-I	118.1 ± 18.3	129 ± 27.2	0.009	0.001
A-I / HDLc	104.0 ± 19.4	107.4 ± 18.4	NS	NS
LDLc / HDLc	3.41 ± 1.45	3.35 ± 1.10	NS	NS

HDL cholesterol expressed as mmol/l. Apo A-I expressed as mg/dl. Statistical differences assessed by ANOVA with data adjusted for age, BMI, gender and fasting plasma triglycerides.. Status interaction indicates a significant effect of being a FCHL subject on the association between the polymorphism and lipid parameters.

HDLc = HDL cholesterol ; LDLc = LDL cholesterol

4.6. Resum dels resultats

- La freqüència d'individus portadors del polimorfisme C₁₁₀₀-T del gen de l'apolipoproteïna C-III és més elevada en pacients HLFC (64%) que en controls (36%).
- Els portadors del polimorfisme C₁₁₀₀-T tenen concentracions més elevades de triglicèrids plasmàtics, de colesterol, triglicèrids i apo B en VLDL i IDL, i d'apo C-III.
- L' associació entre el polimorfisme C₁₁₀₀-T i els esmentats paràmetres lipídics només es detecta en els individus HLFC.
- Les concentracions plasmàtiques de retinol són més baixes en individus HLFC que en controls (418.9 vs 888.9 µg/L). Aquestes diferències no són degudes a factors dietètics.
- L'activitat *in vitro* de l'enzim LCAT no és diferent entre pacients HLFC i controls.
- La concentració de colesterol en la fracció HDL2 és més baixa en els pacients HLFC tot i que aquesta diferència està al límit de la significació estadística.
- El polimorfisme G₋₇₅-A del gen de l'apolipoproteïna A-I està associat a concentracions més elevades d'apo A-I, apo C-III i colesterol de la fracció IDL.
- La prevalença d'hiperlipèmia entre descendents menors de 19 anys de pacients HLFC és del 43%. Aquests, a diferència dels individus adults, no presenten alteracions en la fracció IDL.
- La determinació de la isoforma de l'apolipoproteïna E a partir del fenotip suposa un 6% d'error respecte del genotip.

5. CONCLUSIONS GLOBALS

5. Conclusions globals

- Les associacions dels polimorfismes C₁₁₀₀-T (apo C-III) i G₋₇₅-A (apo A-I) amb els triglicèrids plasmàtics, les fraccions VLDL i IDL i l'apolipoproteïna C-III, suggereixen la presència en la regió de l'agregat AI-CIII-AIV d'una **mutació funcional** amb un efecte clar sobre el metabolisme dels triglicèrids. L'elevada prevalença del polimorfisme C₁₁₀₀-T entre els pacients HLFC també suggereix que aquesta **mutació funcional** pot estar implicada en l'etiopatogènia d'aquesta alteració.
- Les associacions entre aquests polimorfismes i els paràmetres lipídics són diferents entre pacients i controls. Això fa pensar que aquesta hipotètica **mutació funcional** estaria altament modulada per factors metabòlics o ambientals i que actuaria com un **factor de predisposició** en aquests pacients.
- L'associació del polimorfisme C₁₁₀₀-T amb un major número de partícules VLDL i IDL, però no amb un augment dels nivells plasmàtics totals d'apo B, fa pensar que aquests pacients podrien tenir un catabolisme deficient d'aquestes partícules amb una base genètica, possiblement lligada a un augment en la síntesi d'apo C-III.
- La hipòtesi que els mecanismes de regulació gènica depenents d'àcid retinoic poden estar involucrats en la HLFC es veu recolzada per les baixes concentracions plasmàtiques de vitamina A que aquests pacients presenten respecte dels controls. Aquests baixos nivells de vitamina A no són deguts a factors dietètics i podrien tractar-se d'una característica específica d'aquests pacients.
- En pacients HLFC no es pot parlar d'una clara disminució de les concentracions de colesterol en les lipoproteïnes d'alta densitat tot i que aquestes tendeixen a estar disminuïdes.
- Els pacients HLFC tenen una activitat LCAT *in vitro* normal. Això descarta la presència d'una forma defectuosa de l'enzim associada a aquesta patologia, però no descarta un

funcionament anormal *in vivo* degut a les característiques específiques de les lipoproteïnes d'aquests individus.

- En les famílies HLFC, la prevalença d'hiperlipèmia entre descendents menors de 19 anys és de prop del 50%, tal com caldria esperar en una alteració de transmissió autosòmica dominant. A més, aquests resultats confirmen la possibilitat de detectar de manera precoç aquests individus per a fer-ne un seguiment preventiu. L'absència d'alteracions en la fracció IDL suggereix que aquestes poden estar involucrades en l'evolució d'aquesta malaltia.
- D'entre els diferents mètodes de determinar la isoforma de l'apolipoproteïna E és més fiable i senzill determinar el genotip que el fenotip.

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 271 : 518-520.

Aguilar Salinas CA, Barrett PHR, Pulai J, Zhu XL, 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.

Albers JJ, Chen CH, Adolphson JL. 1981. Lecithin :cholesterol acyltransferase (LCAT) mass : Its relationship to LCAT activity and cholesterol esterification rate. *J Lipid Res*. 22 : 1206-1213.

Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Burning JE, Willett WC, Krauss RM. 1987. Low density lipoprotein subclass pattern and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 260 : 1917-1921.

Austin MA, Horowitz H, Wijsman E, Krauss RM, Brunzell J. 1992. Bimodality of plasma apolipoprotein B levels in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 92 : 67-77.

Austin MA, King M-A, Vranizan KM, Krauss RM. 1990. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. 82 : 495-506.

Austin MA, King M-C, Vranizan KM, Newman B, Krauss RM. 1988. Inheritance of low density lipoprotein subclass patterns : Results of complex segregation analysis. *Am J Hum Genet*. 43 : 838-846.

Austin MA, Krauss RM. 1986. Genetic control of low density lipoprotein subclasses. *Lancet*. ii : 592-595.

Austin MA, Wijsman E, Guo S, Krauss RM, Brunzell JD, Deeb S. 1991. Lack of evidence for linkage between low-density lipoprotein subclass phenotypes and the apolipoprotein B locus in familial combined hyperlipidemia. *Genet Epidemiol*. 8 : 287-297.

Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. 1992. Lipoprotein lipase : recent contributions from molecular biology. *Crit Rev Cl Lab Sci*. 29 : 243-268.

Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B. 1996. The transcriptional control of triglyceride metabolism : fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR. *Atherosclerosis*. 124 : S29-S37.

Babirak SP, Iverius P-H, Fujimoto WY, Brunzell JD. 1989. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis*. 9 : 326-334.

Bansal BC, Sood AK, Bansal CB. 1986. Familial hyperlipidemia in stroke in the young. *Stroke*. 17 : 1142-1145.

Beaumont JL, Carlson LA, Cooper GR, Fejfar Z, Fredrickson DS, Strasser T. 1970. Classification of hyperlipidaemias and hyperlipoproteinaemias. *Bull. WHO.* 43 :891-908.

Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. 1989. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature.* 1989. 341 : 162-164.

Berg K. 1963. A new serum type system in man - the Lp system -. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 59 (suppl) : 166-167, 369-382.

Bielicki JK, Johnson WJ, Glick JM, Rothblat GH. 1991. Efflux of phospholipids from fibroblasts with normal and elevated levels of cholesterol. *Biochem Biophys Acta.* 1084 : 7-14.

Brown MS, Goldstein JL. 1983. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest.* 72 : 743-747.

Brown MS, Goldstein JL. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232 : 34-47.

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

Brunzell JD, Austin MA. 1989. Plasma triglyceride levels and coronary disease. *New Engl J Med.* 320 : 1273-1275.

Brunzell JD, Hazzard WR, Motulsky AG, Bierman EL. 1974. Role of obesity in phenotypic expression of familial combined hyperlipidemia. *Clin Res.* 22 : 462 A.

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

Bu G, Maksymovitch EA, Nerbonne JM, Schwartz AL. 1994. Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J Biol Chem.* 269 : 18521-18528.

Caladaras C, Hadzopoulou-Caladaras M, Nolte RT, Atkinson D, Zannis VI. 1986. The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100 : relationship between apo B-100 and apo B-48. *EMBO J.* 5 : 3495-3507.

- Cardin AD, Jackson RL, Johnson JD. 1982. 5-Dimethylaminonaphtalene-1-sulfonyl 3-amino tyrosil apolipoprotein C-III. Preparation, characterization and interaction with phospholipid vesicles. *J Biol Chem.* 257 : 4987-4992.
- Castro cabezas M, de Bruin TWA, de Valk HW, Shoulders CC, Jansen H, Erkelens DW. 1993. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. *J Clin Invest.* 92 : 160-168.
- Castro cabezas M, de Bruin TWA, Erkelens DW. 1992. Familial combined hyperlipidemia : 1973-1991. *Neth J Med.* 40 : 83-95.
- Castro cabezas M, de Bruin TWA, Jansen H, Kock LAW, Kortlandt W, Erkelens DW. 1993a. Impaired chylomicron remnant clearance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb.* 13 : 804-814.
- Chait A, Albers JJ, Brunzell JD. 1980. Very low density lipoprotein overproduction in genetic forms of hypertriglyceridemia. *Eur J Clin Invest.* 10 : 17-20.
- Chen GC, Zhu S, Hardman DA, Schilling JW, Lau K, Kane JP. 1989. Structural domains of human apolipoprotein B-100. Differential accessibility to limited proteolysis of B-100 in low density and very low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 264 : 14369-14375.
- Chen S-H, Habib G, Yang C, Gu Z, Lee BR, Weng S-A, Silberman SR, Cai S-J, Deslypere JP, Rosseneu M, Gotto AM Jr, Li W-H, Chan L. 1987. Apolipoprotein B-48 is a product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science.* 238 : 363-366.
- Cheung MC, Albers JJ. 1984. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography ; particles containing A-I but not A-II. *J Biol Chem.* 259 : 12201-12209.
- Coresh J, Beaty TH, Kwiterovich PO, Antronarakis S. 1992. Pedigree and sib-pair linkage analysis suggest the apolipoproteinB gene is not the major gene influencing plasma apolipoproteinB levels. *Am J um Genet.* 50 : 1038-1045.
- Cortner JA, Coates PM, Bennett MJ, Cryer DR, Le N-A. 1991. Familial combined hyperlipidemia : use of stable to demonstrate overproduction of very low-density lipoprotein apolipoprotein B by the liver. *J Inher Metab Dis.* 14 : 915-922.
- Cortner JA, Coates PM, Gallagher PR. 1990. Prevalence and expression of familial combined hyperlipidemia in childhood. *J Pediatr.* 116 : 514-519.
- Cullen P, Farren B, Scott J, Farral 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 : 1233-1249.

Dallinga-Thie G, Bu X-D, van Linde-Sibenius Trip M, Rotter JI, Lusis AJ, de Bruin TWA. 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.* 37 : 136-147.

Davis CG, Driel IR, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. 1987. The low density lipoprotein receptor. Identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis. *J Biol Chem.* 262 : 4075-4082.

Diard P, Malewiak M-I, Lagrange D, Griglio S. 1994. Hepatic lipase may act as a ligand in the uptake of artificial chylomicron remnant-like particles by isolated rat hepatocytes. *Biochem J.* 299 : 889-894.

Dolphin PJ. 1985. Lipoprotein metabolism and the role of apolipoproteins as metabolic programmers. *Can J Biochem.* 63 : 850-869.

Drayna D, Jarnagin AS, McLean J, Henzel W, Kohr W, Fielding C, Lawn R. 1987. Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature.* 327 : 632-634.

Drayna DT, McLean J, Wion KL, Trent JM, Drabkin HA, Lawn RM . 1987. Human apolipoprotein D gene : gene sequence, chromosome localization and homology to the α_{2u} -globulin superfamily. *DNA.* 6 : 199-204.

Ehnholm C, Garoff H, Renkonen O, Simons K. 1972. Protein and carbohydrate composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. *Biochemistry.* 11 : 3229-3232.

Eisenberg S, Sehayek E, Olivecrona T, Vlodavsky I. 1992. Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J Clin Invest.* 90 : 2013-2021.

Fan J, Wang J, Bensadoun A, Lauer SJ, Dang Q, Mahley RW, Taylor JM. 1994. Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91 : 8724-8728.

Fless GM, Rolih CA, Scanu AM. 1984. Heterogeneity of human plasma lipoprotein (a). Isolation and characterization of the lipoprotein subspecies and their apoproteins. *J Biol Chem.* 259 : 11470-11478.

Francone OL, Gong EL, Ng EL, Fielding CJ, Rubin EM. 1995. Expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase in transgenic mice. Effect of human apolipoprotein A-I and human apolipoprotein A-II of plasma lipoprotein cholesterol metabolism. *J Clin Invest.* 96 : 1440-1448.

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

Genest J, Sniderman AD, Cianflone K, Teng B, Wacholder S, Marcel Y, Kwiterovich PO Jr. 1986. Hyperapobeta-lipoproteinemia. Plasma lipoprotein responses to oral fat load. *Arteriosclerosis*. 6 : 297-304.

Glueck CJ, Fallat R, Buncher CR, Tsang R, Steiner P. 1973. Familial combined hyperlipoproteinaemia : studies in 91 adults and 95 children from 33 kindreds. *Metabolism*. 22 : 1403-1428.

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76 : 333-337.

Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. 1973. Hyperlipidemia in coronary heart disease II. Genetic analyses of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest*. 52 : 1544-1568.

Gómez-Coronado D, Lasunción MA, Herrera E. 1989. Lipoproteínas transportadoras de triglicéridos (II). *Clin Invest Arterios*. 1 : 116-129.

Gordon JI, Sims HF, Eldstein C, Scanu AM, Strauss AW. 1986. Extracellular processing of proapolipoprotein AII in HepG2 cell cultures is mediated by a 54-kDa protease immunologically related to cathepsin B. *J Biol Chem*. 260 : 14824-14831.

Gotto AM Jr, Pownall HJ, Havel RJ. 1986. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol*. 128 : 3-41.

Granot E, Tabas I, Tall AR. 1987. Human plasma cholesteryl ester transfer protein enhances the transfer of cholesteryl ester from high density lipoproteins into cultured HepG2 cells. *J Biol Chem*. 262 : 3182-3187.

Gregg RE, Brewer HB Jr. 1988. The role of apolipoprotein E and lipoprotein receptors in modulating the in vivo metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in human. *Clin Chem*. 34 : B28-B32.

Grundy SM, Chait A, Brunzell JD. 1987. Familial combined hyperlipidemia workshop. *Arteriosclerosis*. 7 : 203-207.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 34 : 1345-1350.

Havel RJ, Shore VG, Shore B, Bier DM. 1970. Role of specific glycopeptides of human serum lipoproteins in the activation of lipoprotein lipase. *Circ Res*. 27 : 595-600.

Havel RJ. 1988. Regulation of lipoprotein metabolism by lipoprotein receptors. *Atherosclerosis Rev.* 17 : 1-18.

Havel RJ. 1994. Postprandial hyperlipidemia and remnant lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 5 : 102-109.

Hesler C, Swenson T, Tall AR. 1987. Purification and characterization of the human plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Biol Chem.* 262 : 2275-2282.

Hoffmann SL, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL, Hammer RE. 1988. Overexpression of low density lipoprotein (LDL) receptor eliminates LDL from plasma in transgenic mice. *Science.* 239 : 1277-1281.

Hunt SC, Wu LL, Hopkins PN, Stults BM, Kuida H, Ramirez ME, Laouel J-M, Williams RR. 1989. Apolipoprotein, low density lipoprotein subfraction, and insulin associations with familial combined hyperlipidemia (Study of Utah patients with familial dyslipemic hypertension). *Arteriosclerosis.* 9 : 335-344.

Imaizumi K, Havel RJ, Fainaru M, Vigne JL. 1978. Origin and transport of the A-I and arginine-rich apolipoproteins in mesenteric lymph of rats. *J Lipid Res.* 19 : 1038-1046.

Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, Maruhama Y, Mabuchi H, Tall AR. 1990. Increased high density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.* 323 : 1234-1238.

Innerarity TL, Mahley RW. 1978. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoprotein. *Biochemistry.* 17 : 1440-1447.

Ishida BY, Albee D, Paigen B. 1991. Interconversion of prebeta-migrating lipoproteins containing apolipoprotein A-I and HDL. *J Lipid Res.* 31 : 227-236.

Jackson RJ, Morrisett JD, Gotto AM Jr. 1976. Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol Rev.* 56 : 256-270.

Janus ED, Nicoll AM, Turner PR, Magill P, Lewis B. 1980. Kinetic bases of the primary hyperlipidaemias: studies of apolipoprotein B turnover in genetically defined subjects. *Eur J Clin Invest.* 10 : 161-172.

Jarvik GP, Beaty TH, Gallagher PR, Coates PM, Cortner JA. 1993. Genotype at a major locus with large effects on apolipoprotein B levels predicts familial combined hyperlipidemia. *Genet Epidemiol.* 10 : 257-270.

Jarvik GP, Brunzell JD, Austin MA, Krauss RM, Motulsky AG, Wijsman E. 1994. Genetic predictors of FCHL in four large pedigrees. *Arterioscler Thromb.* 14 : 1687-1694.

Jiang X, Moulin P, Quinet E, Goldberg IJ, Yacoub LK, Agellon LB, Compton D, Polokoff R, Tall AR. 1991. Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer protein mRNA. *J Biol Chem.* 266 : 4631-4639.

Kane JP, Hardman DA, Paulus HE. 1980. Heterogeneity of apolipoprotein B : Isolation of new species from human chylomicrons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77 : 2465-2469.

Kane JP, Havel RJ. 1994. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B-apolipoproteins. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS *et al*, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York. : McGraw-Hill.

Kayden HJ, Traber MG. 1993. Absorption, lipoprotein transport and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res.* 34 : 343-358.

Kishimoto A, Goldstein JL, Brown MS. 1987. Purification of a catalytic subunit of low density lipoprotein receptor kinase and identification of heat-stable activator protein. *J Biol Chem.* 262 : 9367-9373.

Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS. 1989. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86 : 5810-5814.

Krauss RM, Lindgren FT, Williams PT, Kelsey SF, Brensike J, Vranizan K, Detre KM, Levy RI. 1987. Intermediate-density lipoproteins and progression of coronary artery disease in hypercholesterolemic men. *Lancet.* 2 : 62-66.

Krieger M. 1992. Molecular flypaper and atherosclerosis : structure of the macrophage scavenger receptor. *Trends Biochem Sci.* 17 : 141-146.

Kristensen T, Moestrup SK, Gliemann J, Bendtsen L, Sand O, Sottrup-Jensen L. 1990. Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha-2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett.* 276 : 151-155.

Kunitake ST, Mendel CM, Hennessy LK. 1992. Interconversion between apolipoprotein A-I-containing lipoproteins of pre-beta and alpha electrophoretic mobilities. *J Lipid Res.* 33 : 1807-1816.

Kwiterovich PO Jr, Coresh J, Bachorik PS. 1993. Prevalence of hyperapobetalipoproteinemia and other lipoprotein phenotypes in men (< 50 years) and women (< 60 years) with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 71 : 631-639.

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

LaBelle M, Austin MA, Rubin E, Krauss RM. 1991. Linkage analysis of low density lipoprotein subclass phenotypes and the apolipoprotein B gene. *Genet Epidemiol*. 8 : 269-275.

LaBelle M, Krauss RM. 1990. Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns. *J Lipid Res*. 31: 1577-1588.

LaRosa JC, Levy RI, Herbert P, Lux SE, Fredrickson DS. 1970. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Res Commun*. 41 : 57-68.

Levy RI, Frederickson DS. 1965. Heterogeneity of plasma high density lipoproteins. *J Clin Invest*. 44 : 426-441.

Liu M-S, Jirik F-R, Le Boeuf RC, Henderson H, Castellani LW, Lusis AJ, Ma Y, Forsythe IJ, Zhang H, Kirk E, Brunzell JD, Hayden MR. 1994. Alteration of lipid profiles in plasma of transgenic mice expressing human lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 269 : 11417-11424.

Luo C-C, Li W-H, Moore MN, Chan L. 1986. Structure and evolution of the apolipoprotein multigene family. *J Mol Biol*. 187 : 325-340.

Lutton C. 1991. Dietary cholesterol, membrane cholesterol and cholesterol synthesis. *Biochemie*. 73 : 1327-1334.

Mahley RW, Hui DY, Innerarity TL. 1981. Two independent lipoprotein receptors on hepatic membranes of dog, swine and man. *J Clin Invest*. 68 : 1197-1206.

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 25 : 1277-1294.

Marcel YL, Hogue M, Theolis R Jr, Milne RW. 1982. Mapping of antigenic determinants of human apo B using monoclonal antibodies against low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 257 : 13165-13168.

Marotti KR, Castle CK, Murray RW, Rehberg EF, Polites HG, Melchior GW. 1992. The role of cholesteryl ester transfer protein in primate apolipoprotein A-I metabolism. Insights from studies with transgenic mice. *Arterioscler Thromb*. 12 : 736-744.

McLean JW, Tomlinson JE, Kuang W-J, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM. 1987. cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature*. 330 : 132-137.

Merrill AH Jr. 1993. Apo A-IV : a new satiety signal. *Nutr Rev.* 51 : 273-275.

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

Nichols AV, Blanche PJ, Gong EL, Shore VG, Forte TM. 1985. Molecular pathways in the transformation of model discoidal lipoprotein complexes induced by lecithin:cholesterol acyl transferase. *Biochim Biophys Acta.* 834 : 285-300.

Nikkilä EA, Aro A. 1973. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet.* 1 : 954-959.

Nozaki S, Kubo M, Sudo H, Matsuzawa Y, Tarui S. 1986. The role of hepatic triglyceride lipase in the metabolism of intermediate-density lipoprotein-postheparin lipolytic activities determined by sensitive, nonradioisotopic method in hyperlipidemic patients and normals. *Metabolism.* 35 : 53-58.

Nykjaer A, Bengtsson-Olivecrona G, Lookene A, Moestrup SK, Petersen CM, Weber W, Beisiegel U, Glieman J. 1993. The alpha₂-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with the lipase. *J Biol Chem.* 268 : 15048-15055.

Nykjaer A, Nielsen M, Lookene A, Meyer N, Roigaard H, Etzerodt M, Beisiegel U, Olivecrona G, Gliemann J. 1994. A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein and inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein to cells. *J Biol Chem.* 269 : 31747-31755.

O'Brien R. 1994. Biological importance of low-density-lipoprotein subfractions. *J Cardiovasc Risk.* 1 : 207-211.

Ohta T, Fidge NH, Nestel PJ. 1984. Characterization of apolipoprotein AIV complexes and IV isoforms in human lymph and plasma lipoproteins. *J Biol Chem.* 259 : 14888-14893.

Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. 1993. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Curr Opin Lipidol.* 4 : 187-196.

Olofsson S-O, Bjursell G, Bostrom K, Carlsson P, Elovson J, Protter AA, Reuben MA, Bondjers G. 1987. Apolipoprotein B: structure, biosynthesis and role in lipoprotein assembly process. *Atherosclerosis.* 68 : 1-17.

Oram JF, Brinton EA, Bierman EL. 1983. Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1611-1621.

Ordovas JM, Civeira F, Genest J Jr, Craig S, Robbins AH, Meade T, Pocovi M, Frossard PM, Masharani U, Wilson PWF, Salem DN, Ward RH, Schaefer EJ. 1991. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. *Atherosclerosis*. 87 : 75-86.

Osborne JC, Bengtsson-Olivecrona G, Lee N, Olivecrona T. 1985. Studies on inactivation of lipoprotein lipase : role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry*. 24 : 5606-5611.

Patsch W, Franz S, Schonfeld G. 1983. Role of insulin in lipoprotein secretion in cultured hepatocytes. *J Clin Invest*. 71 : 1161-1174.

Phillips NR, Havel RJ, Kane JP. Levels and interrelationship of serum and lipoprotein cholesterol and triglycerides. Association with adiposity and the consumption of ethanol, tobacco, and beverages containing caffeine. *Arteriosclerosis*. 1 : 13-24.

Pittman RC, Knecht TP, Rosenbaum MS, Taylor CA. 1987. A nonendocytotic mechanism for the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesterol esters. *J Biol Chem*. 262 : 2443-2450.

Radding CHM, Steinberg D. 1960. Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices. *J Clin Invest*. 39 : 1560-1569.

Rader DJ, Cain W, Ikewaki K, Talley G, Zech LA, Usher D, Brewer HB Jr. 1994. The inverse association of plasma lipoprotein (a) concentrations with apolipoprotein (a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate. *J Clin Invest*. 93 : 2758-2763.

Rader DJ, Ikewaki K, Duverger N, Schmidt H, Pritchard H, Frohlich J, Clerc M, Dumon M-F, Fairwell T, Zech L, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. 1994. Markedly accelerated catabolism of apolipoprotein A-II (apo A-II) and high density lipoproteins containing apo A-II in classic lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and fish-eye disease. *J Clin Invest*. 93 : 321-330.

Raugh G, Schuster H, Müller B, Schewe S, Keller C, Wolfram G, Zöllner. 1990. Genetic evidence from 7 families that the apo B gene is not involved in familial combined hyperlipidemia. *Genet Epidemiol*. 8 : 287-297.

Reichl D, Miller NE. 1989. Pathophysiology of reverse cholesterol transport. Insights from inherited disorders of lipoprotein metabolism. *Arteriosclerosis*. 9 : 785-797.

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

Runquist EA, Havel RJ. 1992. Acid hydrolases in early and late endosome fractions from rat liver. *J Biol Chem*. 266 : 22557-22563.

Sakai J, Hishino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayasi Y, Yamamoto T. 1994. Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein gene. *J Biol Chem.* 269 : 2173-2181.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre A-M, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. 1996. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15 : 5336-5348.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. 1996. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1302 : 93-109.

Schultz JR, Gong EL, McCall MR, Nichols AV, Clift SM, Rubin EM. 1992. *J Biol Chem.* 267 : 21630-21636.

Schumaker VN, Phillips ML, Chatterton JE. 1994. Apolipoprotein B and low density lipoprotein structure : Implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins. *Ad Protein Chem.* 45 : 205-248.

Seed M, Mailly F, Vallance D, Doherty E, Winder A, Talmud P, Humphries SE. 1994. Lipoprotein lipase activity in patients with familial combined hiperperlipidemia. *Clin Investig.* 72 : 100-106.

Shachter NS, Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Breslow JL, Ginsberg HN, Smith JD. 1996. Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C-I. *J Clin Invest.* 98 : 846-855.

Shafi S, Brady SE, Bensadoun A, Havel RJ. 1994. Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in the liver. *J Lipid Res.* 35 : 709-720.

Shelburne F, Hanks J, Meyers W, Quarfordt S. 1980. Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J Clin Invest.* 65 : 652-658.

Shimano H, Namba Y, Ohsuga J, Kawamura M, Yamamoto K, Shimada M, Gotoda T, Harada K, Yazaki Y, Yamada N. 1994. Secretion-recapture process of apolipoprotein E in hepatic uptake of chylomicron remnants in transgenic mice. *J Clin Invest.* 93 : 2215-2223.

Shoulders CC, Harry PJ, Lagrost L, White SE, Shah NF, North JD, Gilligan M, Gambert P, Ball MJ. 1991. Variation at the apo AI/CIII/AIV gene complex is associated with elevated plasma levels of apo C-III. *Atherosclerosis.* 87 : 239-247.

Sigurdsson G Jr, Gudnason V, Sigurdsson G, Humphries SE. 1992. Interaction between a polymorphism of the apo A-I promoter region and smoking determines plasma levels of HDL and apo A-I. *Arterioscler Thromb.* 12 : 1017-1022.

Sniderman A, Kwiterovich PO Jr. 1987. Hyperapobetalipoproteinemia and LDL and HDL₂ heterogeneity. *Proceedings from a workshop on lipoprotein heterogeneity. NIH publication N° 87-2646. US department of health and human services : Washington DC.* 293-304.

Sniderman A, Shapiro S, Marpole D, Malcolm I, Skinner B, Kwiterovich PO Jr. 1980. The association of coronary atherosclerosis and hyperapobetalipoproteinemia (Increased protein content but normal cholesterol content in human plasma low density lipoprotein). *Proc Natl Acad Sci USA.* 97 : 604-608.

Sniderman A, Teng B, Genest J, Cianflone K, Wacholder S, Kwiterovich P. 1985. Familial aggregation and early expression of hyperapobetalipoproteinemia. *Am J Cardiol.* 55 : 291-295.

Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, Auwerx J. 1995. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. *J Clin Invest.* 95 : 705-712.

Stalenhoef AFH, Malloy MJ, Kane JP, Havel RJ. 1984. Metabolism of apolipoprotein B-48 and B-100 of triglyceride-rich lipoproteins in normal and lipoprotein lipase-deficient humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81 : 1839-1843.

Sultan F, Lagrange D, Jansen H, Griglio S. 1990. Inhibition of hepatic lipase activity impairs chylomicron remnant-removal in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1042 : 150-152.

Tam S-P, Archer TK, Deeley RG. 1986. Biphasic effects of estrogen on apolipoprotein synthesis in human hepatoma cells : Mechanisms of antagonism by testosterone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83 : 3111-3115.

Teng B, Sniderman AD, Soutar AK, Thompson GR. 1986. Metabolic basis of hyperapobetalipoproteinemia. Turnover of apolipoprotein B in low density lipoprotein and its precursors and subfractions compared with normal and familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 77 : 663-672.

Teng B, Thompson GR, Sniderman AD, Forte TM, Krauss RM, Kwiterovich PO Jr. 1983. Composition and distribution of low density lipoprotein fractions in hyperapobetalipoproteinaemia, normolipidemia and familial hypercholesterolaemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80 : 6662-6666.

Teng BB, Burant CF, Davidson NO. 1993. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science.* 264 : 1816-1819.

Thrift RN, Drisko J, Dueland S, Trawick JD, Davis RA. 1992. Translocation of apolipoprotein B across the endoplasmic reticulum is blocked in a nonhepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 : 9161-9165.

Tollefson JH, Ravnik S, Albers JJ. 1988. Isolation and characterization of a phospholipid transfer protein (LTP-II) from human plasma. *J Lipid Res.* 15 : 1593-1602.

Utermann G, Hardewig A, Zimmer F. 1984b. Apolipoprotein E phenotypes in patients with myocardial infarction. *Hum Genet.* 65 : 237-241.

Utermann G, Kindermann I, Kaffarink H, Steinmetz A. 1984a. Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum Genet.* 65 : 232-236.

Venkatesan S, Cullen P, Pacy P, Halliday D, Scott J. 1993. 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.* 13 : 1110-1118.

Warnick GR, Mayfield C, Albers JJ, Hazzard WR. 1979. Gel isoelectric focusing method for specific diagnosis of familial hyperlipoproteinemia type 3. *Clin Chem.* 25 : 279-284.

Webb JC, Patel DD, Jones MD, Knight BL, Soutar AK. 1994. Characterization and tissue-specific expression of the human very low density lipoprotein (VLDL) receptor mRNA. *Hum Mol Genet.* 3 : 531-537.

Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW. 1982. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem.* 257 : 2818-2821.

Weng W, Breslow JL. 1996. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93 : 14788-14794.

Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. 1992. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science.* 258 : 999-1001.

Wijsman EM, Motulsky AG, Guo SW, Yang M, Austin MA, Brunzell JD, Deeb S. 1992. Evidence against linkage of familial combined hyperlipidemia to the apoA1-CIII-AIV gene complex. *Circulation.* 86, suppl. 1 : 1420.

Williams KJ, Petrie KA, Brocia RW, Swenson TL. 1991. Lipoprotein lipase modulates net secretory output of apolipoprotein B *in vitro*. *J Clin Invest.* 88 : 1300-1306.

Williams RR, Hunt SC, Hopkins PN, Stults BM, Wu LL, Hasstedt SJ, Barlow GK, Stephenson SH, Lalouel J-M, Kuider H. 1988. Familial dyslipemic hypertension : Evidence from 58 Utah families for a syndrome present in approximately 15% of patients with essential hypertension. *JAMA.* 259 : 3579-3586.

Willnow E, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J. 1994. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science*. 264 : 1471-1474.

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

Xu CF, Angelico F, Del Ben M, Humphries S. 1993. Role of genetic variation at the apo AI-CIII-IAV gene cluster in determining plasma apo AI levels in boys and girls. *Genet Epidemiol*. 10 : 113-122.

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

Yen FY, Deckelbaum RJ, Mann CJ, Marcel YL, Milne RW, Tall AR. 1989. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by monoclonal antibody : Effects on cholesteryl ester formation and neutral lipids mass transfer in human plasma. *J Clin Invest*. 83 : 2018-2024.

Zannis VI, Breslow JL. 1980. Characterization of a unique human apolipoprotein E variant associated with type III hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem*. 255 : 1759-1762.