

Alteraciones en genes del metabolismo lipídico y enfermedad cardiovascular

Nailet Arráiz Rodríguez
Doctor en Ciencias Biológicas

Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez"
Sección de Biología Molecular

Facultad de Medicina, Universidad del Zulia

Dirección: Av 3F, N°67-116, Edif. Bellas Artes, Piso 8, Apto 8ª

Recibido: 06/11/2006 Aceptado: 13/12/2006

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) ocupan el primer lugar entre las causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La observación bien documentada de la predisposición familiar a padecer ECV, junto al avance vertiginoso en técnicas de análisis de ADN y la disponibilidad de secuencias del genoma humano, han orientado la investigación de alteraciones genéticas relacionadas con el desarrollo de ECV. Debido a que la ECV está directamente relacionada con alteraciones en los niveles plasmáticos de lípidos, el principal esfuerzo en investigación genética de ECV está dirigido a la identificación de mutaciones o polimorfismos en genes involucrados en la síntesis, transporte y metabolismo de lipoproteínas. Las alteraciones en algunos genes candidatos, tales como LDLR, APOB-100, APOE, LPA, LPL, HL, CETP, APOA1, APOA2 y LCAT han sido bien caracterizadas, demostrándose su asociación a riesgo ECV en diversas poblaciones. Los estudios genéticos no solo permiten definir la contribución de alteraciones de genes en el desarrollo del fenotipo de ECV, sino también mejorar la comprensión de su fisiopatología y definir nuevas alternativas de tratamiento de la enfermedad cardiovascular a través de la identificación de nuevas moléculas y posibles blancos terapéuticos.

Palabras clave: enfermedad cardiovascular, gene, mutaciones, polimorfismo, hipercolesterolemia

Abstract

The cardiovascular diseases (CVD) is one of the main leading causes of death worldwide. The observation documented of familial predisposition to suffer CVD, combined with vertiginous advance in DNA analysis techniques and the availability of human genome sequences, has led to the investigation of genetic alterations related to development of ECV. Because the ECV directly is related to alterations in the plasma lipid levels, the main effort in genetic investigation of ECV is directed to the identification of mutations or polymorphisms in genes involved in lipoprotein synthesis, transport and metabolism. The alterations in some genes candidates, such as LDLR, APOB-100, APOE, LPA, LPL, HL, CETP, APOA1, APOA2 and LCAT have been well characterized, demonstrating its association to risk ECV in different populations. The genetic studies not only allow to define the contribution of genes alterations in the development of the ECV phenotype, but also to improve the understanding of their physiopathology and to define new alternatives of treatment of the cardiovascular disease through the identification of new molecules and possible therapeutic targets.

Keywords: cardiovascular disease, gene, mutations, polymorphisms, hypercholesterolaemia

Introducción

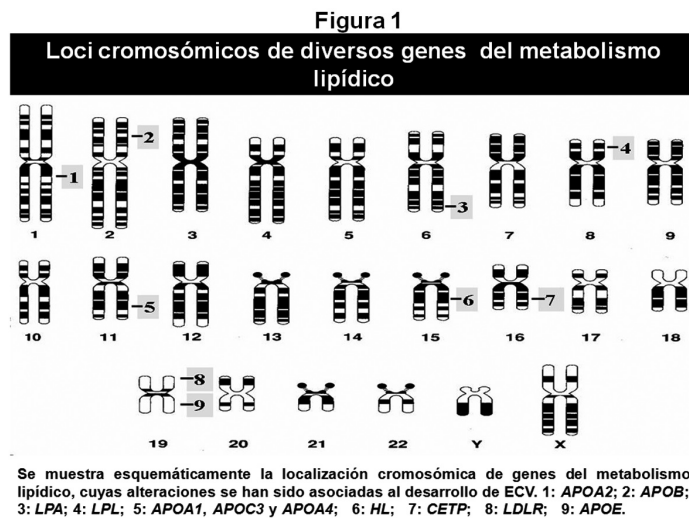
Las enfermedades cardiovasculares (ECV) siguen ocupando el primer lugar entre las causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, a pesar del progreso sustancial en el conocimiento de su etiopatogenia y tratamiento^{1,6}.

Entre los factores de riesgo cardiovascular mejor caracterizados se encuentran las alteraciones crónicas de la concentración de lípidos plasmáticos^{5,7}, la cual depende no solo de la ingesta alimentaria, sino también de la sín-

tesis y metabolismo de las lipoproteínas, que a su vez están condicionadas por la actividad de diversos productos génicos. Dada la importancia y la gran diversidad de proteínas que participan en el transporte y metabolismo de lípidos, es de esperar que cualquier defecto en los genes codificantes para estas proteínas, constituyan condicionantes genéticos que predisponen la aparición de dislipidemias bien definidas y en consecuencia, al desarrollo de ECV.

En virtud de la heterogeneidad genética de la ECV, en esta revisión se seleccionaron algunos loci genéticos bien caracterizados a nivel molecular (Figura 1), cuyos productos génicos cumplen un papel clave en la homeostasis lipídica y se han identificado diversas mutaciones en dichos loci que dan origen a alteraciones fenotípicas marcadas desde el punto de vista bioquímico y clínico⁸.

Se debe resaltar que el fenotipo de cualquier enfermedad compleja multifactorial, tal como la ECV, estará definido por las variaciones en los genes, el número de alelos por gen, su frecuencia relativa, las interacciones gen-gen y gen-ambiente que influirán de una manera interindividual en el mayor o menor riesgo cardiovascular. Aunque los marcadores genéticos no se han introducido como herramienta diagnóstica de rutina en el laboratorio clínico, en algunos países se están utilizando para la estimación de gradientes fenotípicos de riesgo individual y a nivel de poblaciones, con la esperanza de intervenir oportunamente el estilo de vida de las poblaciones de riesgo y alcanzar estrategias terapéuticas adecuadas para cada genotipo.



Alteraciones genéticas asociadas a hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia y riesgo de enfermedad cardiovascular

Gen *LDLR*: receptor de LDL-c e Hipercolesterolemia familiar (FH)

Las LDL o LDL-colesterol (LDL-c) es un complejo macromolecular que transporta colesterol y ésteres de colesterol desde el hígado hasta otros tejidos periféricos, donde el colesterol es introducido a las células a través de receptores de LDL (LDLR). La LDL se une a su receptor para ser internalizado en la célula por un proceso de endocitosis mediado por receptor⁹ (Figura 2). Este transporte representa el principal mecanismo que regula la concentración plasmática de colesterol, por lo cual el deterioro del transporte conduce a hipercolesterolemia, uno de los factores predisponentes del desarrollo prematuro de enfermedad cardíaca coronaria.

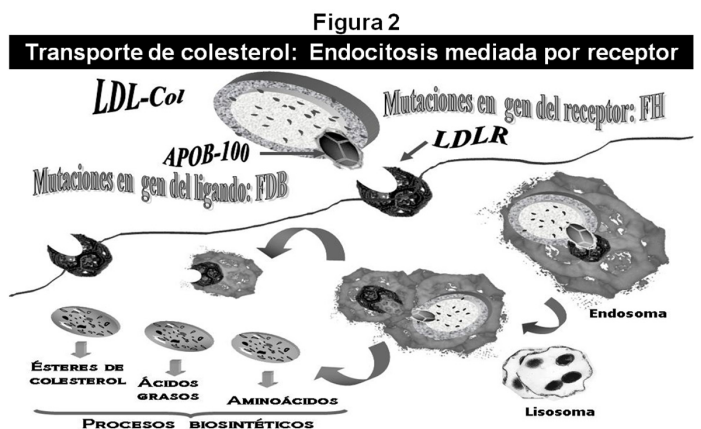
Uno de los defectos genéticos mejor caracterizados es la hipercolesterolemia familiar (FH), una condición autosómica dominante explicada por mutaciones en el gen *LDLR*, codifi-

cante del receptor de LDL-c^{10,12}. La FH se caracteriza por niveles elevados de colesterol y lipoproteínas de baja densidad LDL-c, como consecuencia de defectos en el transporte de colesterol, el déficit de receptores o una alteración funcional de receptores celulares.

El gen *LDLR* se localiza en el brazo pequeño del cromosoma 19 (19p13.1-13.3)⁸, (Figura 2) y contiene 18 exones codificando los seis dominios funcionales de la proteína madura: péptido señal, dominio de unión del ligando, factor tipo precursor de crecimiento epidermal (EGF), dominios transmembrana y citoplasmático⁸. Aunque las mutaciones detectadas en *LDLR* están distribuidas en toda la extensión del gen, éstas predominan en los exones 3, 4 y 9 que codifican para el dominio de unión del ligando^{10,14}. La correlación genotipo/fenotipo de la mayoría de las mutaciones no está completamente disponible, debido a insuficientes datos clínicos en varios reportes.

Para mantener niveles normales de LDL-c se requieren los dos alelos normales del gen de *LDLR*, de manera que cuando uno de los alelos es defectuoso, se manifiesta la FH heterocigota, una de las enfermedades hereditarias más frecuentes, con una prevalencia de 1:500 en la mayoría de poblaciones estudiadas^{10,12,13}. Si uno de los alelos es defectuoso, el individuo expresará solo la mitad de los receptores en la superficie celular, por lo cual se elevan los niveles de colesterol y LDL-c. La FH monocigota es muy rara, afectando 1:10⁶ de personas y como es de esperar, el cuadro es más severo. El fenotipo bioquímico de FH se caracteriza por niveles elevados de colesterol superiores a 450 mg/dl (>11,64nmol/L), alcanzando cifras alarmantes de 700-1000 mg/dl en individuos homocigotos y en el rango de 200 a 400 mg/dl (5,17-10,34 nmol/L) en heterocigotos^{10,13,15}.

Desde la infancia, los pacientes con FH homocigota, presentan manifestaciones cardiovasculares con cardiopatía isquémica grave en la adolescencia. La FH heterocigota también se manifiesta precozmente desarrollando aterosclerosis severa entre 30 y 50 años e infarto al miocardio antes de los 50 años, además desarrollan signos visibles de depósitos de colesterol: xantomas tendinosos, de piel, xantelasmas y arco corneal. Los valores de triglicéridos y VLDL son normales o solo ligeramente elevados y disminuye la concentración de HDL-c.



El colesterol es transportado al interior de la célula por endocitosis y es utilizado para la síntesis de membranas, sales biliares, esteroides. Cualquier alteración en los genes codificantes para ApoB-100 (ligando) o LDLR (receptor), deteriora el transporte y metabolismo de colesterol, causando su acumulación en vasos sanguíneos.

Gen *APO B-100*: ligando del receptor de LDL-c y Apolipoproteína B defectuosa familiar (FDB) (hipercolesterolemia tipo B)

De acuerdo a lo anterior, la elevada concentración de LDL-c puede ser explicada por alteraciones en el receptor de LDL-c, sin embargo, el inadecuado transporte de colesterol también ocurre por defectos genéticos en el ligando del receptor LDLR, es decir de la apolipoproteína B-100 (ApoB-100), la principal apolipoproteína en LDL (**Figura 2**). Este defecto autosómico dominante conocido como apolipoproteína B-100 defectuosa familiar (FDB), se debe a mutaciones en el gen *APOB-100* codificante de la apoproteína^{16,18}, localizado en el brazo corto del cromosoma 2 (2p24-p23)⁸.

Las mutaciones en *APOB-100* no afecta la remoción de VLDL circulante, la cual se une al receptor de LDL vía apolipoproteína E, de manera que el defecto en el ligando conduce a hiperlipidemia menos severa que la FH, debida a mutaciones en el receptor. La incidencia de mutaciones heterocigotas FDB en descendientes europeos, norteamericanos y la mayoría de las poblaciones estudiadas se ha estimado en 1:500 a 1:700^{16,20}, un valor equivalente al estimado para mutaciones asociadas a FH¹², incrementando así la incidencia de hipercolesterolemia de etiología genética y desarrollo de ECV a nivel mundial, razón por la cual es recomendable llevar a cabo estudios de poblaciones a gran escala para la detección de mutaciones FH y FDB.

La mayoría de las mutaciones en *APOB-100*, se localizan en una región del exón 26 que flanquea el codón 3500 del gen. Debido a que esta región codifica para el dominio de unión de ApoB-100 al receptor de LDL, las mutaciones afectan el transporte de LDL al interior celular, conduciendo al incremento de la concentración de LDL circulante.

La primera mutación descrita en el gen *APOB-100* y la más frecuente en la mayoría de poblaciones estudiadas es una transición G→A que resulta en una sustitución Arg3500→Gln en el dominio de unión de apoproteína B-100 al receptor de LDL-c^{17,20}. Otras mutaciones descritas para FDB son sustituciones Arg3500→Trp (CGG→TGG), el mismo codón señalado anteriormente²¹⁻²³ y Arg3531→Cys, ambas afectando el dominio de unión de ApoB-100 al receptor de LDL^{22,23}. Las mutaciones en *APOB-100* también se asocian a elevado riesgo de ECV y los niveles de colesterol están en el mismo rango de lo encontrado en FH, aunque pueden ser ligeramente menores.

Gen *APOE*: Apolipoproteína E e hiperlipoproteinemia o hiperlipidemia tipo III

La apoproteína E (ApoE) es una proteína de 299 aminoácidos que se sintetiza en el hígado e intestino y es un componente principal de los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y algunas lipoproteínas de alta densidad (HDL). Su función principal es el aclaramiento hepático de quilomicrones y VLDL, mediante su papel de ligando de los receptores hepáticos y la regulación de la producción de VLDL, así como la lipólisis de las mismas por la lipoproteín lipasa (LPL). En individuos normales, los quilomicrones y las VLDL son removidos rápidamente de la circulación por endocitosis mediada por receptor en el hígado. En la hiperlipoproteinemia o hiperlipidemia tipo III (HLP III), los niveles

plasmáticos de colesterol y triglicéridos incrementan como consecuencia del transporte defectuoso de quilomicrones y las VLDL, debido a un defecto en la apolipoproteína E, lo cual puede dar lugar a xantomatosis y a enfermedad vascular coronaria y/o periférica prematura^{24,26}. De los genes candidatos involucrados en el fenotipo ECV, Apo E es el más extensamente caracterizado.

El gen codificante, *APOE* se localiza en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.2)⁸, (Figura 1), siendo un gen polimórfico con tres alelos codominantes, a saber: E2, E3 y E4 (ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4), los cuales difieren por la sustitución de uno o dos codones para los residuos 112 y 158^{24,25,27}. La E2 tiene cisteína en ambas posiciones; E4 tiene Arg en ambas y la E3 tiene cisteína en posición 112 y arginina en posición 158. La combinación de los tres alelos da origen a seis genotipos posibles: E2/E2, E3/E2, E3/E3, E3/E4, E4/E4, E4/E2^{24,26,30}. El genotipo se determina mediante análisis de restricción de un fragmento de la ApoE que incluye la región polimórfica (**Figura 3**).

Figura 3



Separación de fragmentos restricción HhaI de un segmento del exón 4 del gen ApoE. Se muestran diferentes genotipos de varios individuos. Líneas: 1,2,3,6 y 10: isoformas E3/E3 (homocigoto); 4,5,7 y 9: isoformas E3/E4 (heterocigoto); 8: E2/E3 (heterocigoto). Fuente: Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Endocrinológicas "Dr. Félix Gómez". Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.

En poblaciones caucásicas, la frecuencia de alelos ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 son: 0,08, 0,77 y 0,15 respectivamente^{24,26,30}, mientras que la frecuencia de estos alelos varía en otras poblaciones, pero siempre predominando el alelo ϵ_3 ^{26,28,30}. Los polimorfismos en *APOE* se asocian con variaciones en los niveles plasmáticos de colesterol^{30,31}, donde los individuos con el alelo ϵ_2 tienen niveles de colesterol un 10% menores que el valor promedio, mientras que los que expresan el alelo ϵ_4 exhiben valores de colesterol un 10% por encima del promedio de individuos homocigotos para ϵ_3 ^{30,33}.

La frecuencia del alelo E4 es alta en los países del norte de Europa y Estados Unidos y baja en Japón y al sur de Europa, de hecho, esta frecuencia se corresponde con la prevalencia de cardiopatía isquémica en dichas regiones^{29,33,34}. La asociación entre el alelo E4 y la presencia de cardiopatía isquémica ha sido reforzada en diversos estudios tanto en hombre como en mujeres^{35,37}, lo cual parece estar relacionado con un predominio en estos pacientes de LDL pequeñas y densas (LDL pd), las cuales son más propensas a oxidación^{34,38,39}. Se ha reportado que los portadores del fenotipo E3/E4 tienen el doble de riesgo de sufrir infarto al miocardio que los sujetos E3/E3 y en estudios necróticos se ha reportado lesiones arterioescleróticas en aorta torácica, abdominal y coronaria derecha muy avanzadas y extensas³⁴.

El genotipo de la *ApoE* puede explicar un elevado porcentaje de la variabilidad en los niveles plasmáticos de colesterol total y LDL, sin embargo su influencia varía en diferentes poblaciones en función del contenido de grasas saturadas y colesterol en la dieta. En diferentes estudios en los cuales se toma como referencia el alelo E3, si en el genotipo está presente el alelo E2, se observan niveles más bajos de colesterol total y LDL-c, mientras que la presencia del alelo E4 se asocia con niveles más elevados de colesterol y LDL-c^{31,35,38}.

La asociación de polimorfismos de *APOE* e hipercolesterolemia resulta de más difícil interpretación en pacientes con hiperlipidemia familiar tipo III (HLP III). La mayoría de los pacientes con HLP III son homocigotos para la isoforma E2, afectando aproximadamente 1:1000 a 1:5000 de la población general^{26,29}. Raramente el desorden ocurre con los fenotipos heterocigotos EE2 y se requieren factores genéticos y/o ambientales adicionales para el desarrollo del desorden, debido a que solamente 1-4% de los homocigotos EE2 desarrolla HLP III familiar^{29,31}. Los estudios funcionales de la unión de ApoE al receptor LDLR, han demostrado que la isoforma ApoE2 posee solamente un 1% de la afinidad de unión comparada con las isoformas Apo E3 y Apo E4 y esta disminución en la afinidad de Apo E2 parece explicar la menor tasa de remoción de las lipoproteínas que contienen dicha isoforma^{36,37}.

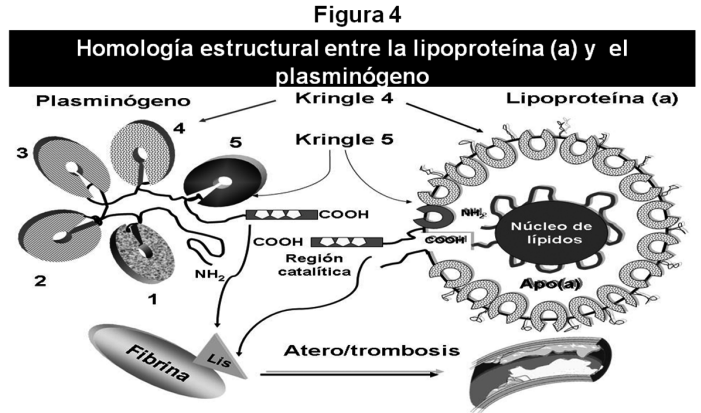
El desarrollo del fenotipo HLP III es dependiente de la edad, siendo raramente evidente antes de la tercera década. Las manifestaciones clínicas incluyen una pigmentación naranja característica en los pliegues palmares, xantomas estriados, tuberoeruptivos de codos y rodillas, xantomas tendinosos, arco corneal, intolerancia a la glucosa y aterosclerosis precoz. La hiperlipoproteinemia III puede ser debido a otros defectos hereditarios primarios en el metabolismo de la apolipoproteína o secundario a otras condiciones tales como hipotiroidismo, lupus eritematoso sistémico o acidosis diabética. Puesto que el defecto en este desorden implica el sistema exógeno del transporte del colesterol, el grado de hipercolesterolemia es sensible al nivel del colesterol en la dieta.

Gen LPA: lipoproteína A y enfermedad cardíaca coronaria

La Lp(a), al igual que la LDL, está constituida por un núcleo rico en ésteres del colesterol y fosfolípidos y de una apoproteína B-100 que contiene un sitio de unión para los receptores de LDL, pero contiene además una molécula de apoproteína A (Apoa) unida por un puente disulfuro a la apoproteína B-100 de la lipoproteína (**Figura 4**). La apo(a) por una parte, neutraliza la capacidad de unión de la ApoB-100 al receptor de la LDL y por la otra, confiere a la Lp(a) propiedades nuevas basadas en su homología estructural con el plasminógeno.

La apo(a) y el plasminógeno derivan de un gen ancestral común y presentan importantes homología estructural, caracterizadas por la presencia de dominios rígidos en triple bucle ("kringle"), estabilizados por puentes disulfuro^{40,41}. El plasminógeno está constituido por 5 módulos o dominios y una región catalítica (**Figura 4**), de los cuales, los módulos 1 y 4, poseen un sitio de unión con los residuos de lisina de la fibrina y de las proteínas de las membranas celulares. La transformación del plasminógeno en plasmina se debe a la activación de un puente peptídico situado dentro de la región

catalítica y esta activación permite la organización del sitio activo y el inicio de la actividad de la plasmina. La apo(a) está constituida por un número variable de copias del módulo 4 del plasminógeno y de una copia del módulo 5 y de la región catalítica^{41,42} (**Figura 4**). El número variable de copias de este módulo determina la existencia de múltiples isoformas de apo(a), por lo que su peso molecular puede variar de 300 a 800 kD^{43,44}.



Se observa la presencia de una copia del "kringle" o módulo 5, sitio catalítico y un número variable del "kringle" 4 que determina las diferentes isoformas de Lp (a). Lp (a) compete con el plasminógeno por el sitio de unión a la fibrina y promueve la formación de trombos en células endoteliales de vasos sanguíneos. Las isoformas más cortas de Lp(a) se consideran de mayor potencial aterotrombótico.

La homología estructural entre la apo(a) y el plasminógeno condiciona un efecto competitivo que conduce a la unión preferencial de la Lp(a) con los residuos lisina de la fibrina (**Figura 4**) y a la inhibición de la unión del plasminógeno y de la cantidad de plasmina generada en la superficie de la fibrina en células endoteliales, monocitos y plaquetas^{45,46}. La hipofibrinólisis y la acumulación de colesterol son las consecuencias directas de la presencia de Lp(a) en la superficie de la fibrina: la apo(a) inhibe la generación de plasmina, promoviendo la trombosis y la fracción lipoproteína de baja densidad favorece el aporte de colesterol⁴⁷. Además, a través de estudios inmunohistológicos, se ha demostrado que Lp(a) también promueve la oxidación de LDL y proliferación de células musculares lisas. Lp(a) y apolipoproteína A se localizan en las placas ateroscleróticas, consistente con su rol directo en la genesis de ECV⁴⁸.

Lp(a) constituye uno de los marcadores de riesgo cardiovascular más importantes y cobra mayor significado si se correlaciona con niveles elevados de LDL-c. Aunque el patrón de herencia es variable en diferentes grupos raciales, la elevación en Lp(a) es comúnmente encontrada en pacientes menores de 60 años con enfermedad cardíaca coronaria y se considera que niveles de Lp(a) superiores a 0,3 g/L se asocian a alto riesgo de ECV^{49,50}.

En el gen *APOA*, localizado en el cromosoma 6 (6q26-q27)⁸, (**Figura 1**) se han identificado polimorfismos que consiste en números variables de unidades repetidas del módulo 4 y el número de repeticiones se relaciona inversamente con los niveles plasmáticos de Lp(a)^{44,51,52}. El tamaño de cada alelo varía en función del número de secuencias repetitivas correspondientes al módulo 4 y se han identificado en total 34 isoformas de apo(a). Si el tamaño de la región hipervariable es pequeño y la molécula es corta, en general la concentración

plasmática de la Lp(a) está elevada; si la molécula de apo(a) es larga, la concentración plasmática de ésta es baja. A pesar de que esta relación inversa entre tamaño de los alelos de apo(a) y concentración de Lp(a) no siempre se observa, lo importante es saber si el riesgo atribuido a la Lp(a) está ligado o no con las isoformas de apo(a) de bajo peso molecular. Recientes trabajos han encontrado diferencias en la distribución de los diversos alelos de apo(a) entre los pacientes con aterosclerosis y las isoformas de bajo peso molecular B, S1 y S2 se encuentran más frecuentemente en los sujetos portadores de insuficiencia coronaria^{44,47,49,51} que muestran igualmente niveles elevados de Lp(a), lo que sugiere que los alelos cortos de apo(a) contribuyen a la aterogénesis aumentando la concentración plasmática de Lp(a).

Gen *LPL*: Lipoprotein lipasa, ApoCII y dislipidemia familiar tipo I o quilomicronemia familiar

La enzima lipoprotein lipasa (LPL) juega un papel clave en el metabolismo lipídico, al hidrolizar partículas ricas en triglicéridos, quilomicrones y VLDL en músculo, tejido adiposo y macrófagos, generando ácidos grasos libres y glicerol para utilizar en gasto y almacén de energía. Así mismo cumple un papel importante en la interacción de ligandos de lipoproteínas y receptores⁵³. El gen *LPL* se localiza en el brazo corto del cromosoma 8 (8p22)⁸ (**Figura 1**), con 10 exones extendidos en una región de 30 Kb codificando una proteína de 475 aminoácidos, la cual es procesada a proteína madura de 448 aminoácidos⁸. Cualquier mutación en el gen *LPL*, que resulte en una deficiencia parcial de la enzima causará un incremento en la concentración de triglicéridos y es responsable de los fenotipos conocidos como quilomicronemia familiar, dislipidemia familiar tipo I o hipertrigliceridemia familiar, enfermedades monogénicas con herencia autosómica recesiva, que cursan con hipertrigliceridemia pura, con valores de triglicéridos de 300 a 800 mg/dl, colesterol menor de 240 mg/dl, aumento de VLDL y quilomicrones y disminución en LDL-c y HDL-c^{53,54}. Los síntomas se presentan en la edad adulta, con xantomas eruptivos, dolor abdominal, hepatosplenomegalia y pancreatitis aguda y riesgo de enfermedad cardiovascular^{54,55}. La hipertrigliceridemia familiar se presenta en la mitad de los familiares de primer grado.

Hasta ahora se han caracterizado algunas variantes de LPL, debido a sustituciones de aminoácidos en diferentes posiciones. En la variante de LPL D9N ocurre una sustitución del aminoácido ácido aspártico por asparagina en el codón 9⁵⁶, mientras que la variante N291S, la sustitución es de una asparagina por un residuo de serina en el codón 291^{53,57}, las cuales se asocian con incrementos de 9% y 14% en niveles plasmáticos de triglicéridos, respectivamente. Se han reportado altas frecuencias de estas variantes en pacientes con ECV o con hiperlipidemias, comparadas con individuos saludables^{55,57}. Otras mutaciones frecuentes son las sustituciones de glicina por glutamina en codón 188 y serina por un codón de terminación en el codón 447⁵⁸. Otras mutaciones responsables de deficiencia en LPL asociadas a quilomicronemia incluyen: A176T, G188E, S244T, P207L, I194T, R243H, R243C, G142E, además de algunas deleciones e inserciones⁸.

La actividad enzimática de LPL también disminuye como consecuencia de mutaciones en el gen *APOC2*, localizado

en el cromosoma 19q⁽⁸⁾ (**Figura 1**) y codificante de la apo-proteína CII, un activador esencial de LPL, sin embargo, la hipertrigliceridemia familiar debido a mutaciones en este gen son menos frecuentes que las variantes del gen *LPL*⁵⁹.

La herencia de mutaciones en ambos genes es autosómica recesiva y la severidad de la quilomicronemia dependerá de otras mutaciones en otros genes y factores ambientales. Los pacientes afectados por deficiencia enzimática de LPL exhiben niveles de triglicéridos superiores a 1000 mg/dl (11,29 nmol/L) y entre las características clínicas resaltantes se destacan xantomas, dolor abdominal difuso y pancreatitis^{57,59}.

Gen *HL*: Lipasa hepática y fenotipo de hiperlipidemia familiar combinada

La hiperlipidemia familiar combinada (FCH) es un desorden lipídico de etiología genética con una frecuencia de 1-2% en la población y explica el 10 al 20% de enfermedad arterial coronaria prematura^{60,61}. Los individuos afectados exhiben hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia y elevadas concentraciones de ApoB, con valores de HDL-c disminuidos. Además de este fenotipo primario, en algunos casos FCH se asocia a un incremento en partículas de LDL pequeñas y densas (LDLpd) y una disminución de HDL-colesterol, un patrón lipídico asociado a un incremento en riesgo cardiovascular, llamado colectivamente fenotipo de lipoproteinemia aterogénica (ALP)^{60,62}. Debido a este patrón lipídico tanto en FCH como ALP, se ha propuesto que son desórdenes relacionados, aunque su relación no está bien establecida. Se han demostrado alteraciones en loci genéticos comunes entre familias tanto FCH como ALP, asociados a la presencia de LDLpd y elevado riesgo de enfermedad coronaria⁶⁰. Entre los loci caracterizados se incluyen genes de manganeso superóxido dismutasa, proteína transportadora de ésteres de colesterol/lecitina:colesterol acil transferasa y AI-CIII-AIV^{60,63}.

Debido a la naturaleza poligénica de FCH/ALP, en los últimos años se investigan activamente otros defectos genéticos relacionados y entre los nuevos genes candidatos se ha confirmado la asociación de polimorfismos en el gen de la lipasa hepática con el patrón lipídico aterogénico descrito. El gen *HL* se localiza en la banda cromosómica 15q15-q22 (**Figura 1**) y contiene 9 exones que se extienden hasta 60 Kpb con capacidad codificante para una proteína de 476 aminoácidos⁸. Diversos estudios han reportado una relación inversa entre la actividad de LH y niveles de HDL-colesterol⁶³⁻⁶⁶, de hecho, los ratones transgénicos que sobreexpresan LH exhiben una disminución marcada de HDL-colesterol y este efecto se ha relacionado con la actividad fosfolipasa de LH⁶⁷. Los humanos y roedores deficientes en LH exhiben partículas LDL de mayor tamaño comparados con individuos con niveles normales de LH, lo cual se explica por la actividad triglicérido hidrolasa de LH, involucrada en la captura hepática de lipoproteínas ricas en triglicéridos, consistente con el papel de LH en la conversión de VLDL a LDL⁶⁸. El papel dual de LH como fosfolipasa y triglicérido hidrolasa podría explicar la disminución de HDL-c y la sobreproducción de partículas LDL pequeñas y densas en pacientes con FCH.

Una gran variedad de estudios relacionan polimorfismos en la región promotora del gen *LH* (polimorfismos C-480T y C-514T) con disminución en los niveles plasmáticos de HDL-c^{62,63,65,66}, sin embargo, llama la atención que la asociación

del alelo -514T no se observa en pacientes del sexo femenino. Hasta ahora se desconoce este efecto sexo-específico, para el cual se ha sugerido otras modificaciones funcionales en el gen no identificadas hasta el presente. Otras variantes alélicas descritas asociadas a deficiencia en LH son sustituciones T383M y S267F⁸.

La edad de inicio de las manifestaciones clínicas en FCH es tardía, con elevaciones de los niveles plasmáticos de lípidos y apoB en la tercera década de la vida, mientras que las manifestaciones de cardiopatía isquémica ocurren habitualmente alrededor de los 50 años, aunque se han descrito casos en edad infantil. La expresión clínica externa de la hiperlipidemia es escasa y raramente se observa arco corneal, xantelasmas y xantomias.

Alteraciones genéticas asociadas a bajos niveles de hdl-colesterol y riesgo de enfermedad cardiovascular

Gen CETP: proteína transferasa de ésteres de colesterilo

La proteína transferasa de ésteres de colesterilo (CETP) media el intercambio de lípidos entre lipoproteínas. Estimula la transferencia de triglicéridos (TG) desde VLDL hasta HDL y LDL, intercambiando ésteres de colesterilo, resultando en una transferencia neta de ésteres de colesterilo desde HDL a otras lipoproteínas y la captura de colesterol en el hígado. Cuando hay altos niveles de CETP, las HDL son enriquecidas en TG, convirtiéndose en sustrato para la lipasa hepática, de manera que los TG son hidrolizados y ApoA-I es degradada en células tubulares renales, con la consecuente disminución de HDL e incrementando el potencial aterogénico. Pues bien, esto ocurre cuando CETP alcanza altos niveles de expresión en individuos que presentan algunos polimorfismos en el gen codificante *CETP* (16q21)⁸, (**Figura 1**), siendo el más frecuente y mejor caracterizado el polimorfismo TaqIB en el intrón 1, el cual se asocia con el desarrollo temprano de aterosclerosis^{69,70}. La presencia del polimorfismo se conoce como variante B1 y su ausencia como variante B2. A través del estudio del polimorfismo en 807 pacientes japoneses con aterosclerosis coronaria documentada por angiografía, se demostró que la variante B1 se asocia a elevados niveles plasmáticos de CETP y muy bajas concentraciones de HDL-c con progresión a aterosclerosis, pero con buena respuesta al tratamiento con pravastatina⁷⁰.

La deficiencia en CETP se ha descrito exclusivamente en familias japonesas, con una incidencia de 5,1% para la mutación D442G, debido a una transición G→A en el exón 15 y 0,5% de una transición G→A en el sitio donador de splicing del intrón 14, ambas asociadas a elevados niveles de HDL₂ ricas en colesterol esterificado^{71,73}, debido a la ausencia de intercambio de triglicéridos con otras lipoproteínas⁷⁴. El efecto de esta deficiencia sobre el desarrollo de ECV ha sido ampliamente debatido, proponiéndose desde un efecto protector antiaterogénico que incrementa la longevidad en los individuos deficientes en CETP, hasta una importante incidencia de accidentes cerebrovasculares y coronarios⁷⁵.

Hipoalfalipoproteinemia familiar y deficiencia en HDL-colesterol

En humanos se considera que aproximadamente el 50% de las alteraciones de HDL-c se explica por defectos genéticos de carácter poligénico en varios loci cromosomales (**Figura**

1) que controlan la expresión de apolipoproteínas (A-I, A-II, C-II, C-III y Apo A-IV)^{76,81} y de la enzima lecitin: colesterol acil transferasa (LCAT). La hipoalfalipoproteinemia se hereda en forma autosómica dominante y cursa con niveles de HDL-c menores de 35 mg/dl con valores en el rango de 20 y 29 mg/dl con un elevado potencial aterogénico. Se han reportado múltiples variantes genéticas en genes de apolipoproteína tipo deleciones^{76,77,81}, inversiones⁷⁸ sustituciones^{79,80} en genes codificantes de apolipoproteínas, todos asociados a cuadros severos de enfermedad arterial prematura.

LCAT: lecitin:colesterol acil transferasa: el gen se localiza en el cromosoma 16 (16q22.1)⁸ (**Figura 1**), con 6 exones extendidos en 4.200 pb, con capacidad codificante para una proteína de 416 aminoácidos. La enzima se sintetiza en hígado y circula en plasma formando un complejo con las HDL, participando en el transporte inverso de colesterol y es de esperar, que su deficiencia conduzca a la acumulación de colesterol libre en los tejidos. La deficiencia de LCAT es una enfermedad hereditaria con una prevalencia estimada de 1/1.000.000, en la mayoría de poblaciones estudiadas⁸². La deficiencia absoluta de LCAT impide la esterificación de colesterol en todas las lipoproteínas, sin embargo, cuando hay déficit parcial de la enzima LCAT, condición conocida como “enfermedad del ojo de pez”, no hay actividad esterificante de colesterol exclusivamente en las HDL, preservándose la actividad en las lipoproteínas que contienen ApoB.

Las alteraciones del gen *LCAT* que determinan la deficiencia absoluta, incluyen inserciones y sustituciones que causan inactivación de la proteína, entre las cuales se han reportado transiciones C T en codón 147 del exón 4, (W147R)⁸³, G→A en el codón 293 en el exón 6 (M293I), una inserción de 3 pares de bases en el exón 4, introduciendo una glicina en una región helicoidal de la proteína y la sustitución N228K⁸⁴. En la deficiencia parcial de LCAT, la mutación mejor caracterizada es una transición C→T que resulta en una sustitución de treonina por isoleucina en el codón 123 (T123I) de la proteína⁸⁵, sin embargo se ha incrementado el número de mutaciones asociadas al fenotipo “ojo de pez”, entre ellas, T347M⁸⁵, N131D⁸⁶, deleción de del codón 300 (L) y otras menos frecuentes^{85,86,88}.

Tanto la deficiencia total como parcial son desórdenes autosómicos recesivos y están acompañados de un gran incremento en las concentraciones plasmáticas de colesterol no esterificado, que van desde un 40% en la enfermedad del ojo del pez, hasta un 70% en la deficiencia total de LCAT^{85,87,88}. Otra mutación responsable de deficiencia parcial de LCAT, reportada recientemente, es una transición C a T que produce una sustitución de arginina por triptofano en el codón 147^{85,88}.

Las manifestaciones clínicas incluyen opacidad corneal, anemia y problemas renales en la deficiencia absoluta de LCAT, mientras que en la deficiencia parcial, el rasgo distintivo es el arco corneal, sin alteraciones hemáticas ni renales, con cifras plasmáticas disminuidas de HDL-colesterol que podrían ser menores de 10 mg/dL, con lo que se produce un mayor riesgo de aterosclerosis, con manifestaciones de cardiopatía coronaria precoz.

Utilidad de los marcadores genéticos en la prevención de la enfermedad cardiovascular

En ausencia de predisposición genética, todos los individuos de una población podrían responder de la misma manera a una agresión ambiental, de manera que el desarrollo de una enfermedad, como el caso particular de la ECV, debería ser proporcional al nivel de exposición al estímulo ambiental, sin embargo, una simple observación de la realidad nos demuestra que individuos expuestos a factores de riesgo, tales como dieta, hábito tabáquico y otros, no exhiben el mismo fenotipo de enfermedad cardiovascular. Por esta razón, para el estudio de una enfermedad multifactorial como ECV se deben explorar alteraciones en varios loci de genes candidatos e incluir en el análisis de riesgo, los factores ambientales que pueden modular el fenotipo y de esta manera, integrar todos los factores clínicos, bioquímicos y genéticos para estimar el nivel de riesgo de ECV mas cercano a la realidad.

El uso de marcadores genéticos cobra cada vez mayor relevancia para el diagnóstico precoz y estimación de riesgo de ECV, siendo de indiscutible valor en poblaciones de niños y adolescentes, debido a que permite la correcta identificación del producto génico alterado y la integración de los resultados de la interacción entre los condicionantes genéticos y los factores ambientales que inciden sobre el fenotipo, con la posibilidad de adoptar medidas nutricionales y terapéuticas adecuadas y oportunas, de acuerdo a los mecanismos moleculares que estén alterados. Para la incorporación de marcadores genéticos de ECV en el laboratorio clínico, debemos plantearnos el tipo de marcadores que deben ser analizados, seleccionando solo aquellos que estén bien caracterizados a nivel molecular y que determinen realmente un riesgo significativo de padecer enfermedad cardiovascular.

Agradecimiento

Al Fondo nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por el financiamiento del proyecto de investigación S1-2002000445, para el estudio de hipercolesterolemia de etiología genética.

Referencias

- Rosamond WD, Chaambeless LE, Folsom AR, Trends in the incidence of myocardial infarction and mortality due to coronary heart disease, 1987-1994. *N Engl J Med* 1998; 339: 861-867.
- Guthrie RM. Rising to the challenge of treating high-risk patients. *Am J Manag Care* 2006; 12 (11 Suppl): S318-24.
- Wood D, DeBaker G, Faergemann O, Graham I, Mancía G, Pyorala K. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the second joint task force of European and other societies on coronary prevention. *Eur Heart J* 1998; 19: 1434-1503.
- Karter AJ, Gazzaniga JM, Cohen RD, Casper ML, Davis BD, Kaplan GA. Ischemic heart disease and stroke mortality in African-American, Hispanic and non-Hispanic white men and women, 1985 to 1991. *West J Med* 1998; 169: 139-145.
- Dobson A, Evans A, Ferrario M. Changes in estimated coronary risk in the 1980: data from 38 population in the WHO MONICA Project. *Annals of Medicine* 1998; 30: 199-205.
- Marenberg ME, Rish N, Berkman LF, Floderus B, de Flaire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1994; 330: 1041-1046.
- Boer JM, Fesken EJ, Verschuren WM, Seidell JC, Kromhout D. The joint impact of family history of myocardial infarction and others risk factors on 12-year coronary heart disease mortality. *Epidemiology* 1999; 10: 767-770.
- OMIM™: Online Mendelian Inheritance in Man, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.
- Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992; 1:445-466.
- Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1987; 84:6919-6923.
- Varret M, Rabés JP, Thiart, R, Kotxe, M, Baron, H, Cenarro, A, Descamps Olivier, Ebhardt, M, Hondelijn J, Kostner, GM, Miyake, Y, Pocovi, M, Schmidt, H, Schmidt, H, Schuster, H., Stuhmann, M, Yamamura, T, Junien, C, Bérout, C and Boileau, C. LDLR Database (second edition): new additions to the database and the software, and results of the first molecular analysis. *Nucleic Acid Res.* 1998, 26: 248-252.
- Yuan G, Wang J, Hegele RA. Heterozygous familial hypercholesterolemia: an underrecognized cause of early cardiovascular disease. *CMAJ* 2006; 174(8):1124-9.
- Tai ES, Koay ESC, Chan E, Seng TJ, Loh LM, Sethi SK, Tan CE. Compound heterozygous familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein B-100 produce exaggerated hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2001; 47:438-443.
- Fouchier SW, Kastelein JJ, Defesche JC. Update of the molecular basis of familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Mutat* 2005; 26:550-558.
- Soria LF, Ludwig EH, Clarke HRG, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:587-591.
- Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1990; 31:1337-1349.
- Viola S, Benlian P, Morali A, Dobbelaere D, Lacailla F, Rieu D, Ginies JL, Maurage C, Meyer M, Lachaux A, Larchet M, Lenearts C, Goulet O, Sarles J, Mouterde O, Girardet JP, The French-Speaking Group for Pediatric Hepatogastroenterology and Nutrition. Apolipoprotein B Arg3500Gln mutation prevalence in children with hypercholesterolemia: a French multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 122-126.
- Myant NB, Forbes SA, Day IN and Gallagher J. Estimation of the age of the ancestral arginine 3500→glutamine mutation in human apoB-100. *Genomics* 1997; 45: 78-87.
- Fouchier SW, Defesche JC, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. Familial defective apolipoprotein B versus familial hypercholesterolemia: an assessment of risk. *Semin Vasc Med* 2004; 43:259-264.
- Tai D-Y, Pan J-P, Lee-Chen G-J. Identification and haplotype analysis of apolipoprotein B-100 Arg3500Trp mutation in hyperlipidemic Chinese. *Clin Chem* 1998; 44:1659-1665.
- Fisher E, Scharnagl H, Hoffmann MM, Kusterer K, Wittmann D, Wieland H, Gross W, März W. Mutations in the apolipoprotein (apo) B-100 receptor-binding region: detection of apo B-100 (Arg3500→Trp) associated with two new haplotypes and evidence that apo B-100 (Glu3405→Gln) diminishes receptor-mediated uptake of LDL. *Clin Chem* 1999; 1026-1038.
- Choong M-L, Koay ESC, Khoo K-L, Khaw M-C, Sethi SK. Denaturing gradient-gel electrophoresis screening of familial defective apolipoprotein B-100 in a mixed Asian cohort: two cases of arginine3500tryptophan mutation associated with a unique haplotype. *Clin Chem* 1997; 43:916-923.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.
- Wilson PW, Scchefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1250-1255.
- Cumming A M, Robertson F W. Polymorphism at the apoprotein-E locus in relation to risk of coronary disease. *Clin Genet* 1984; 25: 310-313.

27. Emi M, Wu L.L, Robertson MA, Myers, RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM. Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics* 1988; 3: 373-379.
28. Glickman ME, Kao MF. Apo-E genotypes and cardiovascular diseases: a sensitivity study using cross-validators criteria. *Biom J*. 2005; 47:541-543.
29. Eto M.; Watanabe, K.; Ishii, K. A racial difference in apolipoprotein E allele frequencies between the Japanese and Caucasian populations. *Clin Genet* 1986; 30: 422-427.
30. Walden CC, Hegele RA. Apolipoprotein E in hiperlipidemia. *Ann Intern Med* 1994; 120: 1026-1036.
31. De Knijff, P.; van den Maagdenberg, A. M. J. M.; Frants, R. R.; Havekes, L. M. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum Mutat* 1994; 4: 178-194.
32. Humphries SE, Talmud PJ, Hawe E, Bolla M, Day IN, Miller GJ. ApoE4 increases the risk of coronary heart disease in middle age who smoke: second Northwick Park Heart study. *Lancet* 2001; 358: 115-119.
33. Lucotte G, Loirat F, Hazout S. Patteem of gradient of apolipoprotein E allele 4 frequencies in western Europe. *Hum Biol* 1997; 69:253-262.
34. Corbo, R. M.; Scacchi, R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world: is APOE*4 a 'thrifty' allele? *Ann Hum Genet* 1999; 63: 301-310.
35. de Knijff, P, Jansen, H, Lie K I, Havekes L M. Apolipoprotein E4 and coronary artery disease. (Letter) *Lancet* 340: 1350-1351, 1992.
36. Eto, M.; Watanabe, K.; Makino, I. Increased frequencies of apolipoprotein E2 and E4 alleles in patients with ischemic heart disease. *Clin. Genet.* 1989; 36: 183-188,.
37. Luc G, Bard JM, Arvelier D, Evans A, Cambou JP, Bingham A. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscl Thromb* 1994; 14:1412-1419.
38. Kamboh MI, Aston CE, Ferrell RE, Hamman RF. Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanic and non-Hispanic whites. *Atherosclerosis* 1993; 98:201-211.
39. Cullen P, Cingarella A, Breenhausen B, Mohr S, Assmann G, von Eckardstein A. Phenotype-dependent differences in apolipoprotein E metabolism and in cholesterol homeostasis in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 2000; 101: 1607-1677.
40. Calabresi L, Pisciotto L, Costantin A, Frigerio I, Eberini I, Alessandrini P, Arca M, Bon GB, Boscutti G, Busnach G, Frasca G, Gesualdo L, Gigante M, Lupattelli G, Montali A, Pizzolitto S, Rabbone I, Roller M, Ruotolo G, Sampietro T, Sessa A, Vaudou G, Cantafora A, Veglia F, Calandra S, Bertolini S, Franceschini G. The molecular basis of lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency syndromes: a comprehensive study of molecular and biochemical findings in 13 unrelated Italian families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; ;25:1972-1978.
41. Guevara J, Knapp RD, Honda S, Northup Sr, Morrisset JD. A structural assessment of the apo(a) protein of human lipoprotein(a). *Proteins* 1992; 12:188-99.
42. Mc Lean J, Tomlinson J, Kuang W, Rader DL. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987; 330:132-7.
43. Lackner G, Boerwinkle E, Leffert CC, Rahming T, Hobbs HIH. Molecular basis of apolipoprotein(a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest* 1991; 87:2153-61.
44. Lackner C, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a). *Human Mol Gen* 1993; 2: 933-940
45. Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein(a) modulates endothelial cell surface fibrinolysis: potential role in atherosclerosis. *Nature* 1989; 339:303-5.
46. Ezaratty A, Simon DI, Loscanzo J. Lipoprotein(a) binds to human platelets and attenuates plasminogen bindings and activation. *Biochemistry* 1993; 32:4628-33.
47. Miles LA, Fless GM, Levin EG, Scanu AM, Plow EF. A potential basis for the thrombotic risk associated with lipoprotein(a). *Nature* 1989; 339:301-3.
48. Rath M, Niendorf A, Reblin T, Dintel M, Krebber HJ, Beisigel U. Detection and quantification of lipoprotein (a) in the arterial wall of 107 coronary bypass patients. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 579-592.
49. Genest JJ, Martin-Munley SS, McNamara JR, Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992; 85: 2025-2033.
50. Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HIH. Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90 % of variation in plasma lipoprotein(a) concentration. *J Clin Invest* 1992; 90:52-60.
51. Paultre F, Pearson TA, Weil HFC, Rubin J, Francis CK, Marx HF, Philbin EF, Reed RG, Berglund, L. High levels of Lp(a) with a small apo(a) isoform are associated with coronary artery disease in African American and White men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2619-24.
52. Craig W, Poulin S, Bostom A, Eaton C, Laurino J, Leduce T. Further characterization of the plasma lipoprotein(a) distribution. *J Clin Lab Anal* 1995; 9:392-6.
53. Beisigel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88: 8342-8346.
54. Olivecrona G, Olivecrona T, Trigliceride, lipasa y atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1995; 6: 291-305.
55. Fisher RM, Humphries SE, Talmud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene effects of plasma lipids and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1997; 13: 145-159.
56. Talmud PJ, Bujac SR, Hall S, Mileer GJ, Humphries SE. Substitution of asparagina for aspartic acid (D9N) of lipoprotein lipase markedly augments risk of ischaemic heart disease in male smokers. *Atherosclerosis* 2000; 149: 75-81.
57. Hu Y, Liu W, Huang R, Zhang X. A systematic review and meta-analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn291Ser variant and diseases. *J Lipid Res* 2006; 47:1908-1914.
58. Monsalve MV, Henderson H, Roederer G. A missense mutation at codon 188 of the human lipoprotein lipase gene is a frequent cause of lipoprotein lipase deficiency in persons of different ancestries. *J Clin Invest* 1990; 86: 728-734.
59. Santamarina-Fojo S. The familial chylomicronemia syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27: 551-567.
60. Allayee H, Aouizerat BE, Cantor RM, Dalinga-Thie GM, Krauss RM, Lanning CD, Rotter JI, Lusic AJ, de Bruin TW. Families with familial combined hiperlipidemia and families enriched for coronary artery disease share genetic determinants for the atherogenic lipoprotein phenotype. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 577-585.
61. Eller P, Schgoer W, Mueller T, Tancevski I, Wehinger A, Ulmer H, Foeger B, Haltmayer M, Ritsch A, Patsch JR. Hepatic lipase polymorphism and increased risk of peripheral arterial disease. *J Intern Med* 2005; 258:344-348.
62. Rotter JI, Bu X, Cantor RM, Warden CH, Brown J, Gray RJ, Blanche PJ, Krauss RM, Lusic AJ. Multilocus genetics determinants of LDL particle size in coronary artery disease families. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 585-594.
63. Jansen HA, Verhoeven AJ, Weeks L, Kastelein JJ, Halley DJ, van den Ouweland, A, Jukema JW, Seidell JC, Birken JC. Common C-to-T substitution at position -480 of the hepatic lipase promoter associated with a lowered lipase activity in coronary artery disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2837-2842.
64. Vega GL, Clark LT, Tang, A, Marcovina S, Grundy SM, Cohen JC. Hepatic lipase activity is lower in African American men than in white American men: effect of 5' flanking polymorphism in the hepatic lipase gene (LIPC). *J Lipid Res* 1998; 39: 228-232.
65. Zambon AS, Deeb SS, Hokanson JE, Brown BJ, Brunzel JD. Common variants in the promoter of the hepatic lipase gene are associated with lower levels of hepatic lipase activity, buoyant LDL, and higher HDL² cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18: 1723-1729.

66. Allayee H, Dominguez KM, Aouizerat BE, Krauss RM, Rotter JI, Lu J, Cantor RM, de Bruin TW, Lusis AJ. Contribution of the hepatic lipase gene to the atherogenic lipoprotein phenotype in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res* 2000; 41: 245-252.
67. Santamarina-Fojo S., Haudenschild C, Mara M. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 211-219.
68. Qiu S, Bergeron N, Kotite L, Krauss RM, Bensadoun A, Havel RJ. Metabolism of lipoprotein containing apolipoprotein B in hepatic lipase-deficient mice. *J Lipid Res* 1998; 39: 1661-1668.
69. Boekholdt SM, Sacks FM, Jukema JW, Shepherd J, Freeman DJ, McMahan AD, Cambien F, Nicaud V, de Groot GJ, Talmud PJ, Humphries SE, Miller GJ, Eiriksdottir G, Gudnason V, Kauma H, Kakko S, Savolainen MJ, Arca M, Montali A, Liu S, Lanz HJ, Zwinderman AH, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation* 2005; 111:278-287.
70. Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, de Knijff P, McPherson R, Bruschke AVG, Lie KI, Kastelein JJP. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. *New Eng J Med* 1998; 338: 86-93.
71. Koizumi J, Mabuchi H, Yoshimura A, Michishita I, Takeda M, Itoh H, Sakai Y, Sakai T, Ueda K, Takeda R. Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1985; 58: 175-186.
72. Inazu A, Jiang XC, Haraki T, Yagi K, Kamon N, Koizumi J, Mabuchi H, Takeda R, Takata K, Moriyama Y, Doi M, Tall A. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Invest* 1994; 94: 1872-1882.
73. Akita H, Chiba H, Tsuchihashi K, Tsuji M, Kumagai M, Matsuno K, Kobayashi K. Cholesteryl ester transfer protein gene: two common mutations and their effect on plasma high-density lipoprotein cholesterol content. *J Clin Endocr Metab* 1994; 79: 1615-1618.
74. Kurasawa T, Yokoyama S, Miyake Y, Yamamura T, Yamamoto A. Rate of cholesteryl ester transfer between high and low density lipoproteins in human serum and a case with decreased transfer rate in association with hyperalphalipoproteinemia. *J Biochem.* 1985; 98:1499-1508.
75. Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, Tall AR. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996; 97: 2917-2923.
76. Karathanasis SK, Ferris E, Haddad IA. DNA inversion within the apolipoproteins AI/CIII/AIV-encoding gene cluster of certain patients with premature atherosclerosis. *Proc Nat Acad Sci* 1987; 84: 7198-7202.
77. Schaefer EJ, Heaton WH, Wetzel MG, Brewer HB Jr. Plasma apolipoprotein A-I, absence associated with a marked reduction of high density lipoproteins and premature coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 1982; 2: 16-26.
78. Ordovas JM, Cassidy DK, Civeira F, Bisgaier CL, Schaefer EJ. Familial apolipoprotein A-I, C-III and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11. *J Bio Chem* 1989; 264: 16339-16342.
79. Weisgraber KH, Bersot TP, Mahley RW, Franceschini G, Sirtori CR. A-I (Milano) apoprotein: isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. *J Clin Invest* 1980; 66: 901-907.
80. Takada D, Emi M, Ezura Y, Nobe Y, Kawamura K, Iino Y, Katayama Y, Xin Y, Wu LL, Larringa-Shum S, Stephenson SH, Hunt SC, Hopkins PN. Interaction between the LDL-receptor gene bearing a novel mutation and a variant in the apolipoprotein A-II promoter: molecular study in a 1135-member familial hypercholesterolemia kindred. *J Hum Genet* 2002; 47: 656-664.
81. Ikewaki K, Matsunaga A, Han H, Watanabe H, Endo A, Tohyama J, Kuno M, Mogi J, Sugimoto K, Tada N, Sasaki J, Mochizuki S. A novel two nucleotide deletion in the apolipoprotein A-I gene, apoA-I Shinbashi, associated with high density lipoprotein deficiency, corneal opacities, planar xanthomas, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2004;172: 39-45.
82. Kinoshita M, Teramoto T. LCAT (lecithin:cholesterol acyltransferase). *Rinsho Byori Suppl* 2001; 116: 125-130.
83. Taramelli R, Pontoglio M, Candiani G, Ottolenghi S, Dieplinger H, Catapano A, Albers J, Vergani C, McLean J. Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency: molecular analysis of a mutated allele. *Hum. Genet* 1990; 85: 195-199.
84. Gotota T, Yamada N, Murase T, Sakuma M, Murayama N, Shimano H, Kozaki K, Albers JJ, Yazaki Y, Akanuma Y. Differential phenotypic expression by three mutant alleles in familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *Lancet* 1991; 338: 778-781.
85. Funke H, von Eckardstein A, Pritchard PH, Hornby AE, Wiebusch H, Motti C, Hayden MR, Dachet C, Jacotot B, Verdes U, Faergeman O, Albers JJ, Colleoni N, Catapano A, Frohlich J, Assmann G. Genetic and phenotypic heterogeneity in familial lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency: six newly identified defective alleles further contribute to the structural heterogeneity in this disease. *J. Clin. Invest* 1993; 91: 677-683.
86. Klein HG, Lohse P, Pritchard PH, Bojanovski D, Schmidt H, Brewer HB Jr. Two different allelic mutations in the lecithin-cholesterol acyltransferase gene associated with the fish eye syndrome: lecithin-cholesterol acyltransferase (thr123-to-ile) and lecithin-cholesterol acyltransferase (thr347-to-met). *J. Clin. Invest* 1992; 89: 499-506.
87. Calabresi L, Pisciotta L, Costantin A, Frigerio I, Eberini I, Alessandrini P, Arca M, Bon GB, Boscutti G, Busnach G, Frasca G, Gesualdo L, Gigante M, Lupattelli G, Montali A, Pizzolitto S, Rabbone I, Rollerli M, Ruotolo G, Sampietro T, Sessa A, Vaudo G, Cantafora A, Veglia F, Calandra S, Bertolini S, Franceschini G. The molecular basis of lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency syndromes: a comprehensive study of molecular and biochemical findings in 13 unrelated Italian families. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1972-1978.
88. Zhang K, Zhang S, Zheng K, Hou Y, Liao L, He Y, Zhang L, Nebert DW, Shi J, Su Z, Xiao C. Novel P143L polymorphism of the LCAT gene is associated with dyslipidemia in Chinese patients who have coronary atherosclerotic heart disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318:4-10.