

**Malaltia Ateroscleròtica Coronària
silent en pacients amb
Hipercolesterolèmia Familiar
Heterozigota**

Autor: David Viladés Medel

Director del Treball Recerca: Dr. Joan Cinca Cuscullola

Treball de recerca Doctorat Medicina Interna - Convocatòria

Setembre 2011

Departament de Medicina / Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICAT DEL DIRECTOR O CO-DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

El Dr. Joan Cinca Cuscullola, del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap del Servei de Cardiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

FA CONSTAR,

que el treball titulat **Malaltia Ateroscleròtica Coronària silent en pacients amb Hipercolesterolèmia Familiar Heterozigota** ha estat realitzat sota la meua direcció pel llicenciat **David Viladés Medel**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna/Diagnòstic per la Imatge (curs 2010-2011), a la convocatòria de Setembre de 2011.

Barcelona, 01 de Setembre de dos mil onze.

Índex

	Pàgina
Abreviatures	3
Resum	4
Introducció	5
Etiopatogènia del procés ateroscleròtic en la HFHe	5
Epidemiologia i expressió fenotípica de la HFHe	8
Diagnòstic i screening de malaltia ateroscleròtica silent en la HFHe	9
Hipòtesi de treball	11
Material i mètode	12
Resultats	14
Discussió	20
Conclusions	21
Agraïments	22
Bibliografia	23

Abreviatures

HFHe: Hipercolesterolèmia Familiar Heterozigota
IMC: Índex de Massa Corporal
IC: Intèrval de Confiança
CT: Colesterol Total
LDL: Lipoproteïna de baixa densitat
R-LDL: Receptor de Lipoproteïna de baixa densitat
HDL: Lipoproteïna d' alta densitat
VLDL: Lipoproteïna de molt baixa densitat
LpA: Lipoproteïna A
Apo-B100: Apolipoproteïna B-100
ApoE: Apolipoproteïna E
OMS: Organització Mundial de la Salut
CI: Cardiopatia Isquèmica
OR: OddsRatio
S: Sensibilitat
E: Especificitat
VPN: Valor Predictiu Negatiu
VPP: Valor Predictiu Positiu
MAC: Malaltia Ateroscleròtica Coronària
FRCV: Factors de Risc Cardiovascular
TCMD: Tomografia Axial Computeritzada Multidetectora
PE: Prova d'esforç
ITB: Índex Turmell-Braç
EcoTSA: Ecografia de Troncs Supraaòrtics
Eco-DBT: Ecocardiografia d'estrés amb Dobutamina
RMNc: Ressonància Magnètica Nuclear Cardíaca
CNI: Coronariografia no invasiva
HMG-CoA reductasa: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa
HTA: Hipertensió Arterial
DM: Diabetis Mellitus

Resum

L'Hipercolesterolèmia Familiar Heterozigota (HFHe) és una malaltia monogènica amb una prevalença a Europa al voltant d' 1/500 habitants. Menys del 10% dels malalts estan correctament diagnosticats i d'aquests, menys del 25%, correctament tractats amb hipolipemiants. Aquesta malaltia predispesa a una major i precoç morbimortalitat cardiovascular. Actualment, l'screening de malaltia ateroscleròtica coronària (MAC) silent es basa en estimacions indirectes, ja sigui a partir d'exploracions cardíaques funcionals (ergometria, SPECT, cRMN) o de l'estudi d'altres territoris arterials (Eco-TSA, etc...).

Aquest treball pretén avaluar la prevalença i extensió de MAC silent en malalts amb HFHe mitjançant la coronariografia no invasiva per TCMD i comparar les troballes amb una mostra de la població general. Tanmateix, també es vol avaluar la relació entre les troballes anatòmiques coronàries i diferents variables clíniques i analítiques.

Amb aquesta finalitat es va realitzar un estudi prospectiu de casos i controls. Als dos grups se'ls va practicar un TCMD i al grup de malalts amb HFHe, una analítica amb perfil lipídic en el moment del diagnòstic i una segona analítica amb perfil després de 12-24 mesos de rebre un tractament hipolipemiant òptim.

Les variables amb significació estadística per a predir la presència de lesions coronàries observables amb TCMD varen ser: sexe masculí, edat avançada i l'antecedent familiar de miocardiopatia isquèmica.

La prevalença observada de MAC silent en malalts amb HFHe va ser del 56% (28/50), en grau significatiu en el 28% (8/28). En el grup control la prevalença d'aterosclerosi va ser del 34% (25/70), significativa en un 16% (4/25) $p < 0,05$. La MAC silent va afectar primordialment els segments coronaris proximals amb la següent distribució coronària (de major a menor freqüència): DA>CD>CX>TC.

Introducció

L'Hipercolesterolèmia Familiar Heterozigota (HFHe) és una malaltia d'herència autosòmica dominant, monogènica, caracteritzada per nivells elevats de lipoproteïnes de baixa densitat, colesterol total i triglicèrids en sang.

L'expressió fenotípica la poden originar diverses mutacions; principalment les que afecten el gen que codifica pel receptor de les LDL (cromosoma 19 locis *19p13.1-p13.3*). Mutacions dominants en altres proteïnes poden tenir expressions fenotípiques semblants com la de l'apolipoproteïna B-100 (cromosoma *2p23-24*) o la lipoproteïn-convertasa tipus 9 (PCSK9, cromosoma *1p32* que codifica un enzim que controla el nombre de R-LDL a la membrana plasmàtica dels hepatòcits). S'ha descrit també una variant autosòmica recessiva d'HFHe causada per una mutació que inactiva la funció del gen LDLRAP1 (que codifica una proteïna necessària per a la internalització mitjançada per clatrina del receptor d'LDL dins l'hepatòcit)³⁸⁻⁴⁴. Fins a Agost de 2011 s'han identificat 1741 variants al·lèliques per al R-LDL, 21 variants per a l'apoB-100, 39 variants per al LDLRAP1 i 163 variants per al PCSK9; totes elles indexades a la base de dades de la British Heart Foundation (www.ucl.ac.uk/fh) i a la LSBD-UMD-LDLR Mutations Database (<http://www.umd.be/LDLR/>).

Durant molts anys, es va pensar que el defecte causant de la malaltia era la hiperproducció de colesterol. Malgrat tot, diversos estudis realitzats per J.L. *Golstein* i M. *Brown*¹⁻⁶ varen demostrar que la causa de la malaltia és un defecte en el catabolisme-captació hepàtica de les LDL més que una alteració en la producció o de la pròpia lipoproteïna.

Etiopatogènia del procés ateroscleròtic en la HFHe

En aquests pacients, la malaltia ateroscleròtica es desenvolupa pels mateixos processos metabòlics-histològics que a la resta de la població general. Aquest procés està accelerat pels nivells permanentment elevats de lipoproteïnes de poder aterogènica com les LDL i es pot accentuar per la concomitància d'altres factors de risc CV (tabaquisme, HTA, DM, etc).

Les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) tenen un tamany de 20-25 nanòmetres (nm) i estan formades principalment per èsters de colesterol (46%), triglicèrids (11%), fosfolípids (22%) i apolipoproteïna B-100 (21%) (***veure figura 1***). Aquestes es formen en el plasma com a producte de la degradació de lipoproteïnes de densitat intermitja (IDL) per l'acció de les lipoproteïnolipases (LPL) extracel·lulars.

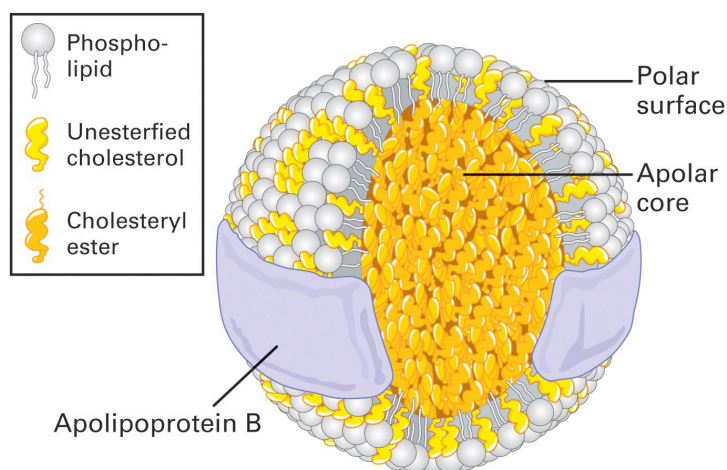


Figura 1.- Composició d'una lipoproteïna de baixa densitat
Imatge cedida per la Universidad de Alcalá

Diversos estudis “in vitro” realitzats per J.L Goldstein i M. Brown¹⁻⁶ amb fibroblasts humans aïllats de pacients amb HFHe varen permetre descobrir que l'alteració fonamental en la Hipercolesterolèmia Familiar és un defecte en el catabolisme hepàtic de les LDL. Aquesta via, descrita pels autors anteriorment nombrats, és mediada per receptors extracel·lulars sensibles a ApoB i ApoE ancorats a la membrana cel·lular dels hepatòcits. Les LDL, riques en ApoB, s'uneixen al receptor i, mitjançant un procés d'endocitosi, s'internalitzen dins l'hepatòcit. Posteriorment, aquesta vesícula endocítica s'uneix a lisosomes que aporten diversos enzims hidrolítics (colesterol-èster-hidrolasa, catepsines, etc...). El component proteic d'aquestes lipoproteïnes es degrada a aminoàcids i els èsters de colesterol són hidrolitzats per la colesterol-èster-hidrolasa generant colesterol lliure. Aquest colesterol lliure serà utilitzat per a la síntesi de membranes cel·lulars però també té tres funcions reguladores:

- 1.-Inhibir l'enzim 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGCoA), clau per a la síntesi de colesterol.
- 2.-Activar l'enzim Acil-CoA-Acilttransferasa (ACAT) que re-esterifica el colesterol per al seu emmagatzamament en forma d'èsters de colesterol.
- 3.-Inhibir la síntesi de nous receptors de LDL disminuint així el descens d'LDL plasmàtic.

Aquests mecanismes reguladors tenen com a finalitat evitar la sobrecàrrega de colesterol a les cèl·lules.

En els malalts amb Hipercolesterolèmia Familiar, l'R-LDL presenta una síntesi defectuosa i secundàriament un menor funcionalisme alhora de captar LDL circulants. Els pacients heterozigots estan dotats d'hepatòcits amb ambdós R-LDL (sans i defectuosos) però els homozigots tenen tots els R-LDL defectuosos. Són els nivells elevats de LDL circulants els que precipiten el procés ateroscleròtic precoç.

Aquest procés ateroscleròtic és fruit d'una via “alternativa” d'eliminació de les LDL circulants. Aquest excipient de LDL s'acumula en forma d'agregats a la matriu (rica en proteoglicans) de la capa íntima arterial. Aquestes

lipoproteïnes són més propenses a patir processos d'oxidació i altres modificacions químiques degudes a l'acció d'enzims com la NADH/NADPH oxidasa així com diverses lipooxigenases o mieloperoxidasses. Les LDL oxidades, altament pro-inflamatòries, causen l'expressió a nivell local de diverses citocines que augmenten l'expressió de molècules d'adhesió leucocitària a la superfície de les cèl·lules endotelials arterials (selectines, ICAM, VCAMs). Aquestes vehiculitzen l'adhesió i posterior migració per diapèdesi de monòcits i limfòcits a la capa íntima arterial. Aquests monòcits, gràcies a la presència de factor estimulant de colònies de macròfags (M-CSF), es transformaran en monòcits activats o macròfags tot expressant receptors antioxidants a la seva membrana (receptors no específics d' apoB ni apoE). D'aquesta manera es comença la captació de LDL oxidades que són fagocitades i digerides als lisosomes. El colesterol resultant s'acumula al citoplasma cel·lular transformant, progressivament, els macròfags en cèl·lules espumoses i promovent l'expressió de noves citocines i molècules inflammatòries com l'àcid hipoclorós, l'anió superòxid i diverses metaloproteïnases de matriu extracel·lular. Gràcies a citocines quimiotàctiques com el factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF) i el TGF- β secretat pels macròfags activats i limfòcits T reguladors, les cèl·lules musculars llises comencen la mitosi i la seva posterior migració de la capa mitja a la íntima arterial on començaran a elaborar matriu extracel·lular (proteoglicans i col·làgen I-III principalment). Amb aquest pas, l'estria grassa pot evolucionar a una lesió fibroadiposa. Posteriorment, aquestes lesions fibroadiposes patiran processos d'angiogènesi, mineralització, remodelat negatiu i, finalment, inestabilització d'elles mateixes en forma d'erosions o ruptura conduïnt a la trombosi sanguínia i el conseqüent event cardiovascular (**veure figura 2**).

Aquesta via "alternativa" d'eliminació permet eliminar un 15% de les LDL circulants i constitueix la única via d'eliminació d'LDL en malalts amb Hipercolesterolèmia Familiar Homozigota.

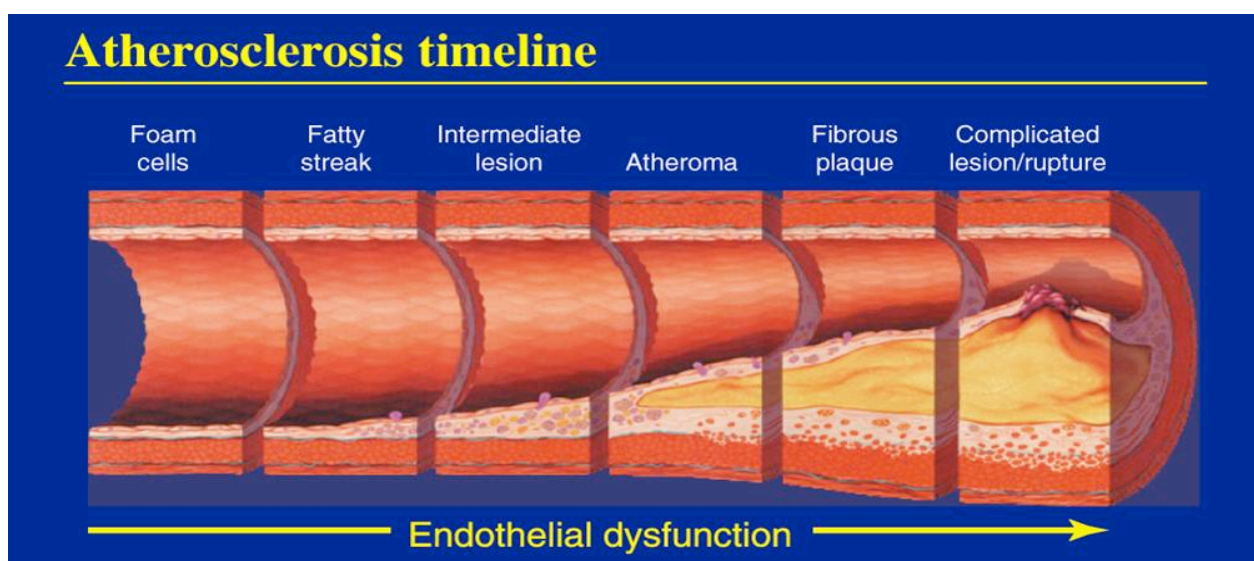


Figura 2.- Evolució natural de l'aterosclerosi arterial

Imatge extreta, amb el permís de l'autor, de l'article: Pepine C.J. *Am J Cardiol* 1998;82 (suppl 10A):23S-27S

Epidemiologia i expressió fenotípica de la HFHe

S'estima que una de cada 500 persones de raça caucàsica pateix la variant heterozigota de la malaltia i 1 de cada milió la variant homozigota²⁵⁻²⁶. La prevalença és més elevada en poblacions com la canadencs d'origen xinès i francès, la finesa, holandesa, islandesa, libanesa, lituana d'origen jueu i sudafricana d'ètnia blanca. Aquesta major prevalença és deguda a "l'efecte fundacional" en aquestes poblacions amb poca diversitat genètica i fa que s'observin més freqüentment certes mutacions específiques del R-LDL. Aquest fenomen és fruit de la presència d'una mutació causant de HFHe en els ancestres migratoris d'aquestes ètnies a partir dels quals s'ha transmès amb herència dominant la malaltia.

A nivell mundial es calcula que la malaltia, en la seva forma heterozigota, afecta prop de 10 milions de persones.

La HFHe predisposa a una major morbiditat i mortalitat cardiovascular (risc acumulat de malaltia CV als 60 anys major del 60% en homes i del 30% en dones¹¹). Aquest fet és encara més rellevant ja que la majoria d'aquests events apareixen durant la 3era-4arta dècada de la vida (més precoçment que a la resta de la població). Aquesta malaltia podria estar posant en risc fins a 2 milions de persones al continent europeu; la qual cosa implicaria fins a 30.000 - 40.000 infarts/anuals, generalment a edats precoces¹¹.

Avui en dia existeix medicació oral (principalment inhibidors de la HMG-CoA reductasa) que pot reduir significativament aquest risc. Diversos estudis^{9,33,34,37} han demostrat una relació cost-benefici favorable envers aquesta intervenció terapèutica. De tots els malalts, menys del 10% estan correctament diagnosticats i menys del 25% reben tractament eficaç amb fàrmacs hipolipemians. Per aquest motiu, donada l'elevada prevalença i morbimortalitat, la OMS ja la va declarar malaltia d'screening sistemàtic a la població general el 1999¹⁰.

Els signes clínics de HFHe ja s'aprecien a edats precoces. Els xantomes tendinosos, fruit del dipòsit de cèl·lules espumoses carregades d'LDL, són presents en el 70% dels malalts majors de 40 anys. En la forma homozigota aquests xantomes es poden apreciar en majors de 10 anys. Encara que els xantelasma circumferencials no són específics de la HFHe i són freqüents en persones majors de 70 anys, la seva presència en el segment inferior de l'arc corneal en persones joves de raça caucàsica s'ha relacionat amb la HFHe¹³⁻¹⁴.

A partir de diferents estudis amb coronariografia invasiva se sap que els malalts amb HFHe presenten ateromatosis coronària de predomini a segments proximals així com ectàsia coronària^{15,26-27}. La vàlvula aòrtica pot presentar calcificació precoç i estan descrits casos d'estenosi aòrtica supravàlvular.

Diagnòstic i screening de malaltia ateroscleròtica silent en HFHe

Encara que la presència de nivells elevats de colesterol total pot fer sospitar la malaltia no és suficient per establir el diagnòstic. Actualment, el diagnòstic es realitza d'acord amb les escales de risc validades per les diferents guies de pràctica clínica (*Dutch Lipid Network (DLN)*, *Simon Broom Register criteria (SBR)* o els *Utah MEDPED (Make Early Diagnosis-Prevent Early Death)* criteria, ***veure taula1.***

Historia Familiar:	Puntuación En caso afirmativo		
I.- Familiar de primer grado con enfermedad coronaria y/o vascular precoz	SI	NO	1
II.- Familiar de primer grado con C-LDL \geq 210 mg/dl	SI	NO	1
III.- Familiar de primer grado con Xantomas y/o Arco Corneal	SI	NO	2
IV.- Niño menor de 18 años con C-LDL \geq 150 mg/dl	SI	NO	2
Historia Personal:			
I.- Antecedentes enfermedad coronaria precoz	SI	NO	2
II.- Antecedentes de enfermedad vascular periférica o cerebral precoz (precoz= < 55 años en varones y < 60 años en mujeres)	SI	NO	1
Examen Físico			
I.- Xantomas tendinosos	SI	NO	6
II.- Arco Corneal antes de los 45 años	SI	NO	4
Analítica en ayunas, con triglicéridos < 200 mg/dl			
I.- C-LDL \geq 330 mg/dL	SI	NO	8
II.- C-LDL 250 - 329 mg/dL	SI	NO	5
III.- C-LDL 190 - 249 mg/dL	SI	NO	3
IV.- C-LDL 155 - 189 mg/dL	SI	NO	1
TOTAL DE PUNTOS:			
Diagnóstico Clínico de Hipercolesterolemia Familiar:			
Cierto: \geq 8 puntos		Probable: 6 - 7 puntos	

Taula 1.- Criteris MedPed

Totes elles contempnen variables clíniques, antecedents familiars i un perfil lipídic en el moment del diagnòstic. L'eficàcia d'aquestes escales (tant DLN com SBR) va ser avaluada en un estudi danès fa cinc anys ¹². Per a un diagnòstic clínic definitiu d'HFHe segons aquestes escales, la sensibilitat i especificitat varen ser, respectivament, del 41.5 -34.1% per a la sensibilitat i del 88 – 90% per a l'especificitat.

Les últimes guies en prevenció cardiovascular ³⁴ recomanen l'screening del risc CV a través dels scores clínics com el Framingham o SCORE. Donat que aquests estudis epidemiològics es van fer a partir de la població general, es recomana ser cautelosos a l'hora d'aplicar-los en pacients amb HFHe, ja que tendeixen a infraestimar el seu risc CV.

Avui en dia, l'estimació del risc CV i la seva implicació terapèutica en aquests malalts es realitza de manera empírica segons nivells lipídics, antecedents CV familiars, la concomitància d'altres FRCV o la presència d'afectació ateromatosa de territoris vasculars.

L'screening d'ateroesclerosi coronària subclínica en aquests pacients pot contribuir a una millor estratificació del risc CV i, així, identificar els individus de major risc que requereixen una teràpia hipolipemiant més agressiva i precoç. En els últims anys, nombrosos estudis han relacionat paràmetres semiològics (arc corneal¹³, IMC, xantomes tendinosos¹⁴), angiogràfics (IVUS intracoronari¹⁵, ectàsia coronària²⁹⁻³⁰, reserva de fluxe coronari), cronològics (producte meso-hipercolesterolèmia), bioquímics (LDL, Ratio HDL, Colesterol no HDL, LpA¹⁶, TG¹⁷ etc...), ecogràfics (gruix íntima-mitja carotídia¹⁸⁻¹⁹, índex turmell-braç²⁸), radiològics (Score càlcic o Índex Agatston²⁰⁻²¹) o tests d'isquèmia miocàrdica (ergometria²³, eco-DBT, RMNc) amb la presència (o no) de MAC silent²³⁻²⁶.

Totes aquestes troballes semiològiques, analítiques y exploratòries, excepte la coronariografia invasiva, pretenen estimar de manera indirecta la presència o no de MAC significativa però cap d'elles presenta una correlació precisa. Actualment existeix la possibilitat de realitzar una coronariografia no invasiva amb TCMD de manera segura (baixa irradiació i nefrotoxicitat per contrast) i amb un cost acceptable prescindint dels riscos derivats d'un abordatge invasiu (sagnats arterials, fístules arteriovenoses, pseudoaneurismes arterials o infeccions).

Hipòtesi de treball

Els malalts amb HFHe presenten una malaltia ateroscleròtica més agressiva i precoç. Totes les tècniques d'screening contemplades a les guies de pràctica clínica actuals es basen en l'estudi de diferents territoris arterials (femoral ²⁸, carotidi ¹⁸⁻¹⁹,...) o del coronari mitjançant diferents tests cardíacs funcionals (ergometria ²³, Eco-DBT, SPECT, RMNc). Cap d'aquestes tècniques estudia directament el territori arterial coronari, la principal causa de morbimortalitat d'aquests pacients.

Aquest estudi pretén confirmar, mitjançant la realització d'una coronariografia no invasiva per TCMD, la major prevalença i extensió de malaltia ateroscleròtica coronària silent en malalts amb Hipercolesterolèmia Heterozigota Familiar respecte la població general. Tanmateix es vol determinar quines variables clíniques o analítiques s'associen a una major probabilitat pre-test de presentar malaltia coronària silent per TCMD. Finalment es pretén determinar quin perfil de malalt es beneficiaria més de l'screening d'aterosclerosi coronària amb TCMD per tal de poder optimitzar el seu tractament hipolipemiant.

Material i Mètode

Inclusió pacients

Es va realitzar un estudi prospectiu de casos i controls amb un total de 120 pacients. Els casos eren 50 pacients amb HFHe i els controls 70 individus (de la població general). El 50% dels pacients eren homes, de 45±5 anys. Tots els participants es van incloure de manera consecutiva i no seleccionada. Es van excloure els pacients que presentessin alguna contraindicació per a la realització d'una coronariografia no invasiva: IMC >40Kg/m², al·lèrgia al contrast iodat, creatinina sèrica >1.5 mg/dl o incapacitat per a mantenir una apnea >10 segons.

En el moment de la inclusió tots els individus havien estat asimptomàtics en els últims 12 mesos. Els participants del grup control eren persones als que se'ls havia realitzat una revisió laboral a la qual se li va afegir una CNI, com a cribatge de malaltia arterial coronària silent, d'acord amb el protocol del nostre estudi. Els pacients amb HFHe procedien de la Unitat de Lípids de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Estudi amb coronariografia no invasiva per TCMD

A ambdues poblacions, i després de signar un consentiment informat, se'ls va realitzar un estudi de calci coronari i una coronariografia no invasiva. L'equip emprat va ser un Toshiba® Aquilion System (Toshiba Corporation, Medical Systems Company) dotat de 64 detectors. La col·limació va ser de 64 x 0,5 mm i el temps de rotació durant l'adquisició d'imatges de 400-450 msec depenent de la freqüència cardíaca. L'amperatge i el voltatge del tub van ser de 320 mA (rang 300-400 mA) i 120 kV (rang 100-135 Kv) respectivament.

En els estudis es va administrar contrast iodat (Xenetix®, concentració de 300 mg/ml i velocitat d'infusió de 4-5 ml/s) mitjançant una bomba d'infusió a través d'una vena de l'avantbraç i amb la finalitat de realçar l'arbre arterial coronari. L'ajust entre l'infusió de contrast i l'inici de l'adquisició d'imatges va ser realitzada automàticament per l'equip mitjançant un algoritme de "bolus tracking". L'adquisició d'imatges del volum cardíac es realitzava de manera contínua (helicoïdal) en totes les fases del cicle cardíac. Un cop acabada l'adquisició es procedia a la reconstrucció de les imatges, en diàstole, de tot el volum cardíac. L'estudi de l'score càlcic (CAC) es va realitzar amb un protocol d'adquisició prospectiva "half-scan" del volum cardíac amb una resolució de tall de 3mm/secció. La detecció i quantificació del CAC es va realitzar d'acord a la puntuació d'Agatston.

L'anàlisi de les dades obtingudes es va fer en una estació de treball, amb un *software* especialitzat (Vitrea2®, Vital images, Plymouth, MN) mitjançant diferents tipus d'imatge: imatges axials, reconstruccions multiplanars obliqües i corbades (MPR, *Multiplane reformat*), projeccions de màxima intensitat (MIP, *Maximal Intensity Projection*) i reconstruccions tridimensionals "renderitzades". L'estudi de les artèries coronàries es va realitzar sistemàticament segons el model anatòmic de la American Heart Association (AHA) que divideix el miocardi en 17 segments. Es va considerar com a estenosi coronària significativa la reducció del diàmetre luminal de l'artèria coronària igual o superior al 70%.

Anàlisi estadístic

Les variables contínues s'han expressat mitjançant la seva mitja \pm desviació estàndard i les variables categòriques amb percentatges. Per a les variables contínues es va utilitzar una prova T-Student per a la comparació de mitges en ambdues cohorts i un anàlisi ANOVA si existien més de dos grups. Inicialment es va realitzar un test de T-Student per a mostres independents per tal de confirmar que ambdues mostres (casos i controls) fossin estadísticament comparables en la prevalença mostral de les diferents variables demogràfiques i clíniques. La comparació de variables contínues es va realitzar mitjançant un test de Chi-quadrat. Per valorar la relació entre les taules d'estimació del risc CV Regicor i el resultat del TCMD es va utilitzar un test U de Mann-Whitney. Tots els valors de $p \leq 0,05$ han estat considerats com a estadísticament significatius, amb un interval de confiança del 95%. Es va realitzar un anàlisi multivariat de les diferents variables demogràfiques, clíniques i analítiques respecte la presència/absència de lesions coronàries per TCMD. Mitjançant un model GLM es va analitzar l'evolució del perfil lipídic en pacients amb i sense aterosclerosi subclínica per CNI.

L'anàlisi estadístic es va fer utilitzant el software SPSS per a Windows, versió 18 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

Resultats

Característiques antropomètriques i clíniques

Dins les variables demogràfiques i clíniques de ambdues mostres només les variables tabac, antecedent familiar de miocardiopatia isquèmica, presència d'arc corneal i xantomes foren estadísticament diferents en ambdues mostres. Aquest fet ja era esperable si tenim en compte que els malalts afectes de HFHe tenen una herència genètica autosòmica dominant, una major morbimortalitat CV i una major prevalença de xantomes/xantelasma a la exploració física que la resta de població general (***veure taula 2***).

Variables	Controls	Casos (HFHe)	Sig.Bilateral
Edat	48.35 (45.35±51.35)	47.58(43.58±51.58)	0,755
Sexe (masculí)	44% (31/70)	50% (25/50)	0,581
Tabac	11% (8/70)	36% (18/50)	0,000
HTA	11.4% (8/70)	6.7% (4/60)	0,772
DM	2.9% (2/70)	1.7% (1/60)	0,502
IMC	25.60 (24.2±27)	26.82 (25.7±28)	0,234
Xantomes	(0/70)	20.7% (12/58)	0,000
Xantelasma	(0/70)	3.4% (2/58)	0,197
Arc corneal	(0/70)	6.7% (4/58)	0,037
Vasculopatia dx previament	(0/70)	1.7% (1/57)	0,446
AVC dx previ	(0/70)	5.0% (3/58)	0,056
Ant.Familiar C.isquèmica	1.4% (1/70)	58.3% (35/58)	0,000

Taula 2.- Característiques antropomètriques i clíniques dels pacients estudiats

Perfil lipídic

Dins la mostra de malalts amb HFHe el promig de temps des del diagnòstic de HFHe fins a la inclusió a l'estudi va ser de 164 mesos. Tanmateix, aquests malalts portaven un promig de 158 mesos amb tractament hipolipemiant fins a la inclusió. La mitja de colesterol total en la cohort amb HFHe va ser de 8,05 µmol/L (311 mg/dL) i la de LDL va ser 6,10 µmol/L (235 mg/dL). La resta de dades analítiques i fenotípiques en el moment de la inclusió es mostra a la següent taula (***veure taula 3***):

Variables	Mostra HFHe (p<0.05)
Temps DLP (mesos)	164.43 (40±260)
Temps tt (mesos)	158.65 (42±240)
Xantomes	20.7% (12/58)
Xantelasmes	3.4% (2/58)
Arc corneal	6.7% (4/58)
Col.tot al dx	8.05 (7.52±8.58)
LDL al dx	6.10 (5.56±6.64)
HDL al dx	1.38 (1.29±1.47)
VLDL al dx	0.56 (0.47±0.64)
TG al dx	1.22 (1.05±1.38)
Urats al dx	300.52 (286.32±327.10)
Creatinina al dx	82.22 (78.55±85.88)
ApoB al dx	1.82 (1.60±2.04)
LpA al dx	382 (179.46±585.43)
VSG al dx	15.82 (11.58±20,05)
Ratio Col.tot/HDL al dx	5.74 (5.20±6.28)

Taula 3.- Variables cronològiques, fenotípiques y analítiques en el moment de la inclusió

Malgrat que cap variable bioquímica en el grup HFHe va obtenir la significació estadística respecte la presència o no d'aterosclerosi coronària, es va realitzar una segona determinació analítica 12-24 mesos després de rebre un tractament hipolipemiant òptim per tal d'apreciar si hi havia alguna diferència en l'evolució del perfil lipídic que diferenciés aquells malalts amb aterosclerosi subclínica d'aquells que no la tenien. Les variables Colesterol Total, HDL, LDL, LpA, ApoB, Ratio CT/HDL varen disminuir amb tractament hipolipemiant amb la mateixa magnitud entre malalts amb i sense aterosclerosi coronària per TCMD. Únicament els nivells de VLDL, TG i Urats varen presentar una evolució diferent en ambdós grups, malgrat que cap d'elles va assolir significació estadística (p=0.3, p=0.13 i p=0.3 respectivament) (**veure figura 3**).

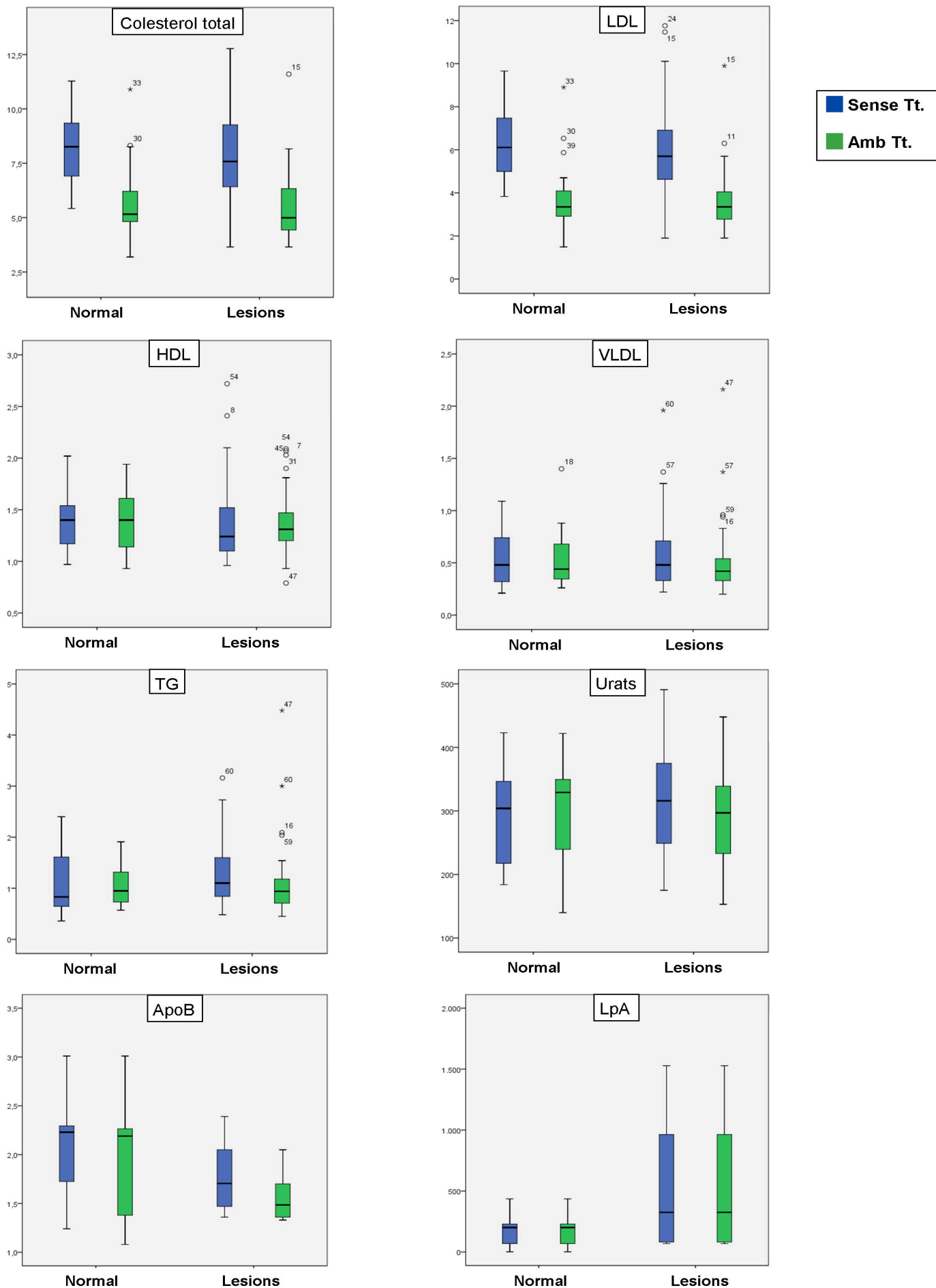


Figura 3.- Diagrama de caixes sobre l'evolució del perfil lipídic d'un any amb pacients agrupats segons presència/absència de lesions coronàries per TCMD

Coronariografia no invasiva per TCMD

D'acord amb els estudis prèviament publicats ^{8,22,25,27-29}, els malalts amb HFHe van presentar a la coronariografia no invasiva per TCMD més lesions coronàries significatives i menys estudis sense presència de lesions (significatives o no). Encara que el grau de calcificació de les lesions coronàries va ser superior en els malalts amb HFHe respecte als seus homònims sans (260 vs 46, $p=0,002$) no van haver-hi diferències estadísticament significatives en la proporció d'estudis no conclouents (**veure taula 4**).

Variables	Controls	Casos (HFHe)	Sig.Bilateral
Agatston	46.02 (0±96)	260.18 (100±410)	0,002
Absència lesions TCMD	44/72	25/60	0,041
Lesions no significatives TCMD	21/72	21/60	0,230
Lesions significatives TCMD	4/72	13/60	0,032
TCMD no conclouent	3/72	1/60	0,775

Taula 4.- Dades angiogràfiques no invasives per TCMD

L'aterosclerosi coronària subclínica va resultar ser més prevalent en el grup HFHe. La prevalença observada en pacients asimptomàtics afectes de HFHe va ser del 56% (28/50) i en grau significatiu en el 28% (8/28). En el grup control la prevalença d'aterosclerosi va ser del 34% (25/70) i significativa en un 16% (4/25). Aquesta afectació coronària va ser més difusa (multisegmentària) i freqüent en els segments proximals de les artèries epicàrdiques, amb una distribució, de més a menys freqüent, de $DA > CD > CX > TC$ (**veure figura 4**).

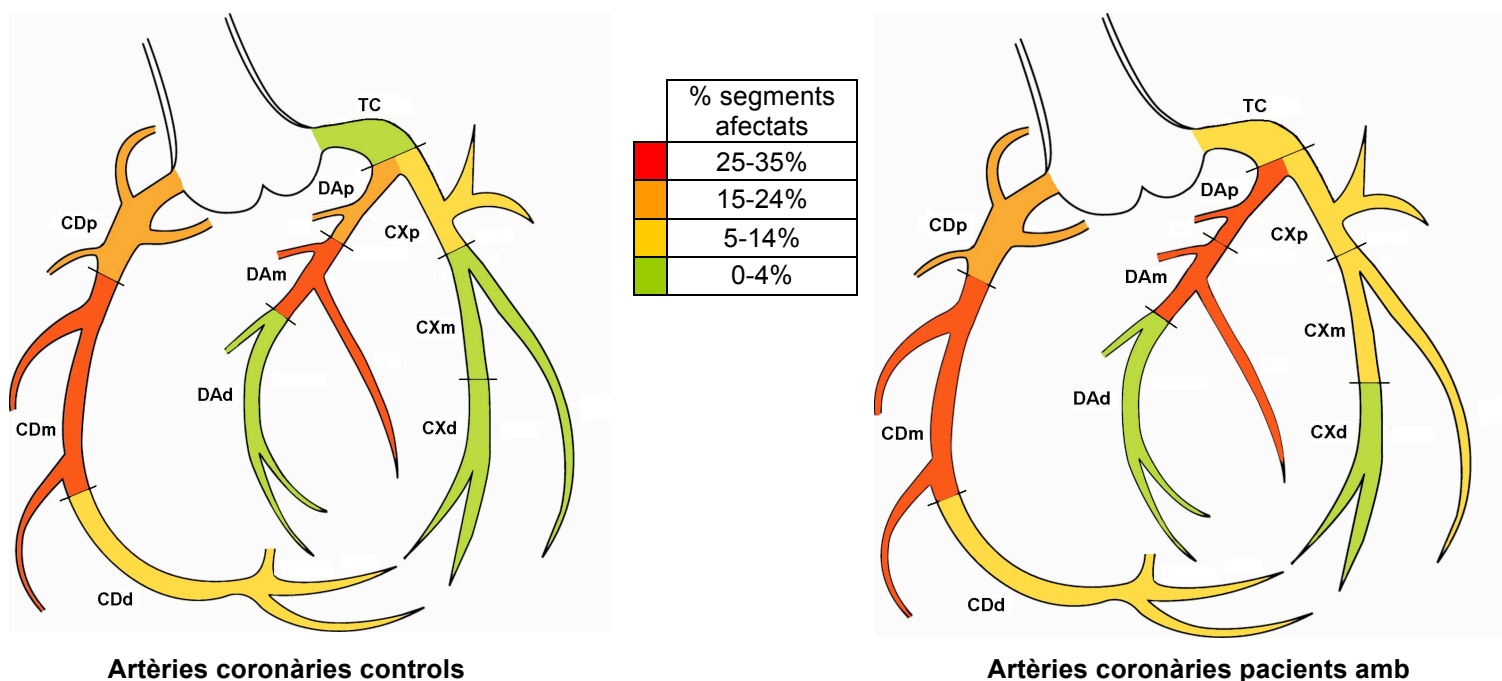
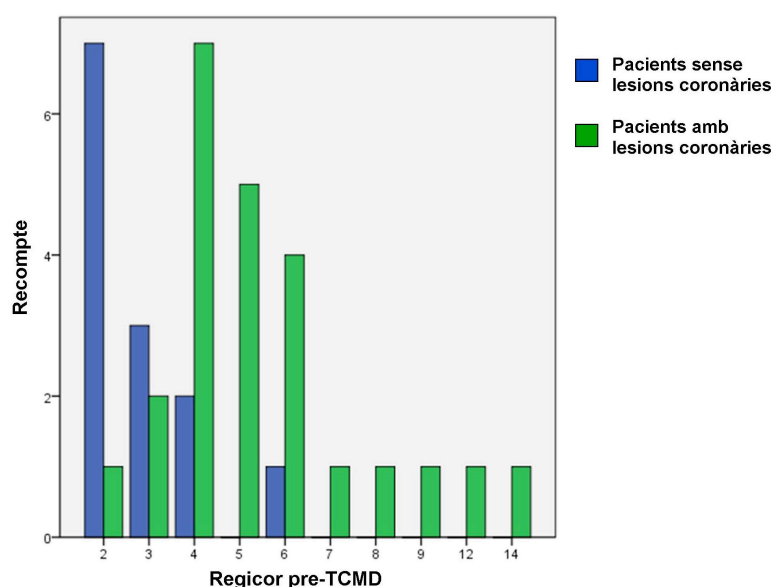


Figura 4.- Localització de les lesions coronàries en pacients amb HFHe i en els individus control

Risc Cardiovascular

En els pacients amb HFHe es va calcular el risc de presentar un esdeveniment coronari (angina, infart de miocardi silenciosos o amb símptomes, mortal o no) a 10 anys mitjançant les taules de Regicor, validades per a la població caucàsica mediterrània, d'on procedien els subjectes de l'estudi. La mitja de l'Score pre-TCMD va ser del 4.65 ± 0.88 ($p < 0.05$) a 10 anys.

Considerant malalts d'alt risc CV aquells amb un risc a 10 anys superior al 10%, les taules varen infraestimar sistemàticament el risc CV en més de la meitat dels malalts amb aterosclerosi coronària silent apreciada per TCMD ($p = 0.696$), no essent així si baixàvem el punt de tall amb risc a 10 anys $< 4\%$ ($p = 0.000$). A continuació es mostra una taula amb la distribució de les diferents puntuacions del risc cardiovascular dels pacients amb HFHe, **veure taula 5**.



Taula 5.- Distribució del risc cardiovascular dels pacients segons puntuació Regicor

Estudi de regressió logística

Finalment es va realitzar un anàlisi de regressió logística per determinar quines variables (demogràfiques, semiològiques o analítiques) predisposaven a presentar lesions coronàries subclíniques per coronariografia no invasiva. Només l'edat, el sexe masculí, l'antecedent familiar de miocardiopatia isquèmica, els nivells HDL i la puntuació d'Agatston varen mostrar una relació estadísticament significativa ($p < 0.05$ bilateral) (**veure taula 6**).

Els pacients de sexe masculí presentaven una probabilitat 6 cops superior de presentar aterosclerosi coronària subclínica ($OR = 6.6$). La probabilitat de patir ateromatosis coronària subclínica, tant en homes com en dones, va augmentar un 11% per any d'edat. Tanmateix, aquells pacients sense antecedents familiars (de primer o segon grau) de miocardiopatia isquèmica tenien una probabilitat del 80% de no presentar ateromatosis coronària subclínica.

Variablen	Significaci3 estadística (p)	Odds Ratio (IC 95%)
Edat	0,001	1,024-1,129
Sexe (masculí)	0,019	1,359-32,32
Fumadors	0,105	0,089-1,574
HTA	0,999	---
H°Familiar Cardiopatia isquèmica	0,023	0,044-0,791
Antec. Familiar de DLP	0,605	0,028-8,011
Vasculopatia	1,000	---
Col.tot	0,595	0,714-1,213
LDL	0,539	0,709-1,200
HDL	0,050	0,034-1,093
VLDL	0,689	0,247-8,285
TG	0,278	0,650-4,461
Ratio Col.tot/HDL	0,459	0,700-1,175
LpA	0,757	0,700-1,002
Agatston	0,013	1,013 -3,252

Taula 6.- Estudi de regressió logística de la cohort amb HFHe

Discussió

Tal i com mostren les dades d'aquest estudi, els malalts amb HFHe tenen major prevalença, extensió i severitat de malaltia ateroscleròtica coronària subclínica respecte la població general. Aquests presenten major calcificació coronària, afectació multisegmentària amb especial predilecció pels segments coronaris proximals, sobretot de l'Artèria Coronària Descendent Anterior i Coronària Dreta.

Com ja era d'esperar, aquests malalts van presentar una major incidència d'estigmes fenotípics d'hipercolesterolèmia (xantomes i arc corneal) no sent així pel que fa als xantelasmes, segurament degut a la baixa prevalença en la nostra mostra de malalts. A diferència d'altres estudis publicats prèviament ⁷, els factors de risc CV modificables com l'HTA, la DM o l'hàbit tabàquic (actiu o no) no varen presentar relació estadísticament significativa respecte la presència de aterosclerosi coronària subclínica ($p=0,99$, $p=0,99$ i $p=0,105$ respectivament). Aquesta dada, pot ser deguda a la baixa prevalença mostral d'aquests factors de risc i a l'edat relativament jove dels subjectes amb Hipercolesterolèmia Familiar (mitja de 47 anys).

La presència d'aterosclerosi coronària subclínica apreciada per TCMD depèn de factors de risc cardiovascular invariables com l'edat i el sexe masculí així com també l'antecedent familiar de miocardiopatia isquèmica. La possible explicació per la qual la variable "antecedent familiar de dislipèmia" no va mostrar significació estadística ($p=0,605$) pot explicar-se pel fet que aquesta no diferencia els portadors de mutacions més agressives i amb més capacitat aterogènica d'aquells amb mutacions més benignes, a diferència de la variable "antecedent familiar de miocardiopatia isquèmica" que sí que distingiria aquelles famílies portadores de mutacions més aterogèniques ($p=0,023$).

Dins de les diferents variables del perfil lipídic, només els nivells d'HDL van presentar significació estadística a l'hora de predir aterosclerosi coronària silent tal i com estudis previs ja havien confirmat ^{15,18}. Aquest fet podria justificar-se per la seva capacitat "protectora" a través de la reabsorció lipídica tissular i transport "revers" cap al fetge. Segons aquestes dades els nivells de HDL podrien ser una eina més d'screening en aquests malalts i també una futura diana terapèutica.

La resposta del perfil lipídic un cop iniciat el tractament hipolipemiant òptim no va demostrar diferències significatives entre els pacients amb i sense lesions coronàries silents.

La coronariografia no invasiva per TCMD podria ser un mètode útil de cribatge d'aterosclerosi coronària subclínica en els malalts amb HFHe. El fet que la variable "antecedent familiar de miocardiopatia isquèmica" tingui rellevància estadística alhora de predir aterosclerosi coronària silent deixa entreveure la importància del genotip com a una possible eina d'screening per a aquells malalts més vulnerables. Alguns grups ja han publicat estudis relacionant aquells malalts amb mutacions més agressives del R-LDL i la major presència d'aterosclerosi arterial, tant carotídia ⁴⁷ com coronària ⁴¹⁻⁴³.

Aquest treball pot ser el punt de partida per a futurs estudis que pretenguin estratificar el risc d'aterosclerosi coronària subclínica segons el genotip mutacional i la realització d'una coronariografia no invasiva per TCMD.

Conclusions

Aquest estudi confirma la major prevalença d'aterosclerosi coronària silent en malalts amb Hipercolesterolèmia Familiar Heterozigota mitjançant la realització d'una coronariografia no invasiva per TCMD i, a la vegada, demostra que el TCMD pot ser una eina eficaç per al seu screening. Aquesta afectació coronària presenta major calcificació arterial i predilecció pels segments arterials proximals. Els nivells elevats d'HDL podrien conferir certa protecció envers la presència de malaltia coronària silent en aquests malalts. L'evolució del perfil lipídic un cop instaurat un tractament hipolipemiant òptim no és un paràmetre que permeti detectar aquells malalts més vulnerables. Els malalts que més es beneficiarien de la realització d'una coronariografia no invasiva per TCMD són aquells amb major risc de presentar aterosclerosi coronària silent: pacients de sexe masculí, d'edat avançada, amb nivells baixos de HDL i amb antecedent familiar de miocardiopatia isquèmica.

Agraïments

Agraïm el suport rebut dels experts en estadística Sra. Cristina Baeza i Sr. Ignasi Gich de la Unitat de Suport Metodològic i Estadística CAIBER Sant Pau així com a la Clínica Creu Blanca per al recolzament tecnològic i en recursos humans.

Tanmateix, també voldria agrair personalment al Dr. Joan Cinca Cusculola el seu suport, la seva participació activa i entusiasme en la elaboració d'aquest treball de recerca.

Bibliografia

- 1.-Goldstein, J. L., Brown, M. S. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 2804-2808, 1973.
- 2.-Goldstein, J. L., Brown, M. S. The LDL receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia. *Annu. Rev. Genet.* 13: 259-289, 1979.
- 3.-Goldstein, J. L., Brown, M. S. Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 76: 504-507, 1987
- 4.-Goldstein, J. L., Brown, M. S., Stone, N. J. Genetics of the LDL receptor: evidence that the mutations affecting binding and internalization are allelic. *Cell* 12: 629-641, 1977.
- 5.-Goldstein, J. L., Dana, S. E., Brunschede, G. Y., Brown, M. S. Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72: 1092-1096, 1975.
- 6.-Goldstein, J. L., Kita, T., Brown, M. S. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis: lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *New Eng. J. Med.* 309: 288-296, 1983
- 7.-H A W Neil, V Seagroatt, D J Betteridge, M B Cooper, P N Durrington, Established and emergent coronary risk factors in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia *Heart* 2004;90:1431-1437
- 8.-Rosamond WD, Chambless LE, Folsom AR, et al. Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987-1994. *N.Engl.JMed* 1998;339:861-7.
- 9.-GoldmanL,Goldman PA,Williams LW, et al. Cost-effectiveness considerations in the treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia with medications. *AmJCardiol* 1993;72:75D-9D.
- 10.-World Health Organization-HumanGenetics (editors).DoNDP, familial hypercholesterolemia: report of a second WHO Consultation. Geneva:WHO 1999.
- 11.-Gaddi A, Cicero AFG, Odoio FO. *Vascular Health and Risk Management* 2007;3(6) 877-886
- 12.-Damgaard D, Larsen ML, Nissen PH, et al. The relationship of molecular genetic to clinical diagnosis of familial hipercholesterolemia in a Danish population. *Atherosclerosis* 2005;180:155-60.
- 13.-Loren A Zech Jrand Jeffery M Hoeg. Correlating corneal arcus with atherosclerosis in familial hipercolesterolemia. *Lipids in Health and Disease* 2008, 7:7
- 14.-Civeira F, Castillo S, Alonso R, Merino-Ibarra E, Cenarro A, Artied M, Martin-Fuentes P, Ros E, Pocovi M, Mata P; Spanish Familial Hypercholesterolemia Group. Tendon xanthomas in familial hypercholesterolemia are associated with cardiovascular risk independently of the low-density lipoprotein receptor gene mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Sep;25(9):1960-5.
- 15.- D Hausmann, JA Johnson, K Sudhir, WL Mullen, G Friedrich, PJ Fitzgerald. Angiographically silent atherosclerosis detected by intravascular ultrasound in patients with familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia: correlation with high density lipoproteins. *J Am CollCardiol*, 1996; 27:1562-1570
- 16.-Holmes DT, Schick BA, Humphries KH, Frohlich J. Lipoprotein(a) is an independent risk factor for cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *ClinChem.* 2005Nov;51(11):2067-73.
- 17.-Austin MA, McKnight B, Edwards KL, et al.2000. Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: A 20-year prospective study. *Circulation*, 101:2777-82
- 18.-Junyent M, Cofán M, Núñez I, Gilabert R, Zambón D, Ros E. Influence of HDL cholesterol on preclinical carotid atherosclerosis in familial hipercolesterolemia *Arterioscler Thromb VascBiol.* 2006 May;26(5):1107-13.

- 19.-Spengel FA, Kaess B, Keller C. Atherosclerosis of the carotid arteries in Young patients with familial hypercholesterolemia. *KlinWochenschr.* 1988 Jan 15;66(2):65-8
- 20.-Hoffmann U, Bodlaj G, Derfler K. Quantification of coronary artery calcification in patients with FH using EBCT *Eur J ClinInvest.* 2001 Jun;31(6):471-5.
- 21.-Möhlenkamp S, Park JW, Grönemeyer D. Improved coronary risk assessment with electron beam computed tomography in an asymptomatic female with familial hypercholesterolemia. *Mayo ClinProc.* 1999 Oct;74(10):1017-20.
- 22.-R D Santos, R S Meneghelo, A P M Chacra, et al. Detection of subclinical atherosclerosis by electron beam tomography in females with heterozygous familial hypercholesterolaemia *Heart* 2004 90: 92-94
- 23.-Michaelides AP, Furlas CA, Pitsavos C. Exercise testing in asymptomatic patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *CoronArteryDis.* 2004 Dec;15(8):461-5.
- 24.-Jansen AC, van Aalst-Cohen ES, Tanck MW, Trip MD, Lansberg PJ, Liem AH, van Lennep HW, Sijbrands EJ, Kastelein JJ. The contribution of classical risk factors to cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: data in 2400 patients. *J InternMed.* 2004 Dec;256(6):482-90.
- 25.- George Yuan, JianWang, Robert A. Hegele. Heterozygous familial hypercholesterolemia: An underrecognized cause of early cardiovascular disease. *CMAJ* • April 11, 2006 • 174(8) | 1124
- 26.-Christopher Sibley, MD Neil J.Stone,. Familial hypercholesterolemia: A challenge of diagnosis and therapy. *Cleveland clinicjournal of Medicine* Volume 73 • Number 1 January 2006
- 27.-Miida T, Nakamura Y, Okada M. Development of coronary atherosclerosis in asymptomatic heterozygous patients with familial hipercolesterolemia. *J Cardiol.* 1996 Aug;28(2):71-7.
- 28.-Carolyn M. Hutter¹, Melissa A. Austin¹, and Steve E. Humphries. Familial Hypercholesterolemia, Peripheral Arterial Disease, and Stroke: A HuGE Minireview. *American Journal of Epidemiology*, Vol. 160, No. 5
- 29.- Melissa A. Austin¹, Carolyn M. Hutter¹, Ron L. Zimmern², and Steve E. Humphries. Familial Hypercholesterolemia and Coronary Heart Disease: A HuGE Association Review. *American Journal of Epidemiology* Vol. 160, No. 5
- 30.-Sudhir K, Ports TA, Amidon TM. Increased prevalence of coronary ectasia in heterozygous familial hipercolesterolemia. *Circulation.* 1995 Mar 1;91(5):1375-80
- 31.-Kuo PT, Kostis JB, Moreyra AE. Protection of myocardium by the compensatory mechanism of coronary collaterals after total occlusion of major coronary arteries shown in patients with familial hipercolesterolemia. *AmHeart J.* 1982 Jul;104(1):36-43
- 32.-Alonso R, Mata N, Castillo S, Fuentes F, Saenz P, Muriz O, Galiana J, Figueras R, Diaz JL, Gomez-Enterra P, Mauri M, Piedecausa M, Irigoyen L, Aguado R, Mata P; Spanish Familial Hypercholesterolaemia Group. Cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors. *Atherosclerosis.* 2008Oct;200(2):315-21.
- 33.-Iughetti L, Predieri B, Balli F, Calandra S. Rational approach to the treatment for heterozygous familial hipercholesterolemia in childhood and adolescence: a review. *J EndocrinolInvest.* 2007Sep;30(8):700-19. Review.
- 34.-Civeira F; International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2004 Mar;173(1):55-68. Review.
- 35.-Schuster H. Risk assessment and strategies to achieve lipid goals: lessons from real-world clinical practice. *Am J Med.* 2004 Mar 22;116Suppl 6A:26S-30S.
- 36.-Alonso R, Castillo S, Civeira F, Puzo J, de la Cruz JJ, Pocovi M, Mata P. [Heterozygous familial hypercholesterolemia in Spain. Description of 819 non related cases]. *MedClin (Barc).* 2002 Apr 13;118(13):487-92. Spanish.
- 37.-Alonso R, Mata P, De Andres R, Villacastin BP, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Sustained long-term

improvement of arterial endothelial function in heterozygous familial hypercholesterolemia patients treated with simvastatin. *Atherosclerosis*. 2001 Aug;157(2):423-9.

38.-Dedoussis G, Schmidt H, Genschel J. LDL-Receptor mutations in Europe. *Human Mutation* 2004 24:443-459.

39.-Umans-Eckenhausen M, Sijbrands E, Kastelein J, Defesche J. Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Mutations and Cardiovascular Risk in a large genetic cascade screening population. *Circulation* 2002; 106:3031-3036

40.-Graham CA, McClean E, Ward. Mutation screening and genotype: phenotype correlation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1999; 147:309-316

41.-Moorjani S, Roy M, Torres A. Mutations of low density lipoprotein receptor gene, variation in plasma cholesterol and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolemia. *Lancet* 1993; 341:1303-1306

42.-Bertolini S, Cantafora A, Aversa M. Clinical expression of Familial Hypercholesterolemia in clusters of mutations of LDL Receptor Gene that cause a receptor defective or receptor negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:e41-e52

43.-Gaudet D, Vohl MC, Couture P. Contribution of receptor negative versus receptor defective mutations in the LDL-receptor gene to angiographically assessed coronary artery disease among young (25-49y) versus middle-aged (50-64y) men. *Atherosclerosis* 1999; 143:153-161

44.-Marina A.W et al. Low-Density Lipoprotein Receptor gene mutation and Cardiovascular Risk in a large genetic cascade screening population. *Circulation* 2002; 106:3031-3036

45.-AW.Neil et al. Established and emergent coronary risk factors in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Heart* 2004;90:1431-1437.

46.-Tejedor.D et al. Reliable Low-Density DNA Array Based on Allele- Specific Probes for Detection of 118 Mutations Causing Familial Hypercholesterolemia *Clinical Chemistry* 2005 51:7 1137-1144

47.-Junyent M et al. Impact of low-density lipoprotein receptor mutational class on carotid atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia *Atherosclerosis* 208 (2010) 437-441