

Itziar Lamiquiz Moneo

# Variaciones genéticas en los trastornos del metabolismo lipídico

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es  
Civeira Murillo, Fernando  
De Castro Oros, Isabel

**EXTRACTO**

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

El presente documento es un extracto de la tesis original depositada en el Archivo Universitario.

En cumplimiento del artículo 14.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, los autores que puedan verse afectados por alguna de las excepciones contempladas en la normativa citada deberán solicitar explícitamente la no publicación del contenido íntegro de su tesis doctoral en el repositorio de la Universidad de Zaragoza. Las situaciones excepcionales contempladas son:

- Que la tesis se haya desarrollado en los términos de un convenio de confidencialidad con una o más empresas o instituciones.
- Que la tesis recoja resultados susceptibles de ser patentados.
- Alguna otra circunstancia legal que impida su difusión completa en abierto.



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral [Extracto]

# VARIACIONES GENÉTICAS EN LOS TRASTORNOS DEL METABOLISMO LIPÍDICO

Autor

Itziar Lamiquiz Moneo

Director/es

Civeira Murillo, Fernando  
De Castro Oros, Isabel

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2018



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGIA CELULAR Y  
MOLECULAR



**Universidad**  
Zaragoza

**ITZIAR LAMIQUIZ MONEO**

TESIS DOCTORAL

-2018-



**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGIA CELULAR Y  
MOLECULAR



**Universidad  
Zaragoza**

Memoria presentada por:

**ITZIAR LAMIQUIZ MONEO**

para optar el Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Dirigida por

**Dr. FERNANDO CIVEIRA MURILLO**

**Dra. ISABEL DE CASTRO ORÓS**

-Diciembre 2018-





**D. FERNANDO CIVEIRA MURILLO**, Doctor en Medicina, Catedrático del Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología de la Universidad de Zaragoza.

**DÑA. ISABEL DE CASTRO ORÓS**, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Asesora médica en enfermedades genéticas, Global Medical Affairs en Shire.

Codirectores de esta Tesis Doctoral,

CERTIFICAN

Que la Memoria de Tesis Doctoral titulada: “Variaciones genéticas en los trastornos del metabolismo lipídico”, presentada por **DÑA. ITZIAR LAMIQUIZ MONEO**, ha sido realizada en la Unidad Clínica y de Investigación de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Miguel Server bajo su dirección, de acuerdo a los objetivos presentados en Proyecto de Tesis aprobado por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, reúne los requisitos para ser presentada por su autora para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza y autorizan su presentación en la modalidad de compendio de publicaciones con mención internacional.

Zaragoza, 6 septiembre de 2018.

Fdo: Fernando Civeira Murillo

Fdo: Isabel de Castro Orós



A mis padres

A mi hermana

A Mauri



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría comenzar haciendo justicia, más que agradeciendo, puesto que el trabajo que he realizado y que culmina en esta tesis ha sido posible gracias a un gran número de personas, que me han apoyado durante estos años tanto a nivel laboral como personal. Sin todos ellos, esto no habría sido posible.

Empiezo los agradecimientos con el ámbito laboral. Mi más sincero agradecimiento al Dr. Fernando Civeira Murillo, pues fue quien me brindó las primeras oportunidades laborales, quien me ha guiado durante todos estos años y me ha permitido llegar hasta el día de hoy. Su inmensa capacidad de trabajo y generosidad, hacen de él una persona digna de admirar. Tenerlo como jefe ha sido una enseñanza laboral, científica y personal. Ha sido un lujo trabajar a tu lado todos estos años.

Agradezco de igual modo su apoyo a la Dra. Isabel de Castro-Orós, que fue quien me introdujo en el laboratorio y con paciencia y dedicación me enseñó cada técnica y guió cada nuevo paso al inicio de mi carrera laboral. Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Ana Cenarro Lagunas, que me ha enseñado a pensar más detenidamente los resultados que obteníamos y organizar mis conocimientos y conclusiones. Ambas son mi referente, antes las dudas moleculares que me surgen.

El grupo de investigación, donde he tenido la fortuna de desarrollar mi tesis, creo con sinceridad, que será difícilmente igualable, constituido por grandes profesionales y amigos, que me han dado todo su apoyo, alegría y ánimos en momentos de fatiga y desilusión. No puedo sino comenzar por Ana B, a quien al principio gaste el nombre de tantas veces que solicite su ayuda y quien me ha enseñado a trabajar con calma y eficiencia. Durante estos años no solo agradezco su ayuda en cada trabajo, su disponibilidad, sino su amistad y apoyo constantes. Agradezco igualmente a Rocío, que además de enseñarme toda la estadística que sé, está siempre disponible para ayudar en la redacción o el diseño de cualquier proyecto. Ella ha sido un pilar laboral y personal fundamental durante mis años de tesis, no tengo la menor duda de que será una gran científica y profesora y verá sus esfuerzos recompensados. Continué con Sofía, que ha representado un apoyo fundamental para mí, la alegría y ánimo que transmite son imprescindibles. También agradecer a Lucía, Rosa, Estibaliz, Charo y Victoria toda su ayuda y compañía durante este tiempo. A todas ellas, mis compañeras y amigas, les debo un agradecimiento inmenso por todo lo que me han regalado a nivel personal y laboral. Vuestro es también este trabajo.

Quisiera agradecer a mis amigos, que tanto me han apoyado y enseñando a lo largo de estos años. A Elena, Angela, Blanca, Alejandra, Cristina, Sandra y Marta, junto a ellas he crecido, vivido grandes experiencias y sé que siempre puedo contar con ellas. Porque estos 20 años de amistad nos permiten hablar sin palabras. A mis amigos Diego, Yoli, Carlos y Sofía, porque con ellos siempre es fácil, divertido y uno se siente en casa. Gracias a todos ellos porque hacen mi carcajada más sonora, mi sonrisa más brillante, en definitiva, mi vida mejor.

Es típico concluir con la familia, aquellos que han acarreado la parte menos “científica” del trabajo, sin embargo, no sería de justicia remarcar, que, sin su soporte, esta carrera de fondo que emprendí no sería posible. En primer lugar, me gustaría agradecer a mis padres su amor incondicional. A mi madre, quien me inculcó su pasión por la ciencia y medicina y a mi padre, quien me siempre me exigía un 12 en cada examen, suyo es cada éxito que consiga en mi carrera. Ellos ha sido mi pilar, cuando el camino se ha vuelto tortuoso. A mi hermana, pues suya es la resiliencia de la familia, ella me ha demostrado durante todos estos años que quien lucha con ahínco, logra las metas más inalcanzables. Ellos son mi ejemplo de trabajo, cariño y los pilares de mi vida. Al resto de mi familia, principalmente a mis abuelos, tíos y a mis primos Nacho e Irene. Todos ellos me han cargado de recuerdos, momentos y enseñanzas inolvidables. Y por supuesto a mi medio familia, aquella familia que eliges, tanto Bayonas como Montano, con vosotros todo es fácil y divertido. Finalmente, a Mauri, por su paciencia, cariño y amor incondicional, con él todo es más fácil. Porque él consigue calmar mi dragón interior y hace posibles mis sueños. No podía elegir un mejor compañero de vida. Allí donde llego, llego siempre con él.

La presenté Tesis doctoral es un compendio de trabajos previamente publicados o aceptados para su publicación, que se dividen en dos grandes bloques:

#### PUBLICACIONES PRINCIPALES

---

Trabajos que constituyen el núcleo temático de la tesis y sobre los que se profundizará en sus objetivos, metodología y conclusiones:

1. Lamiquiz-Moneo I, Bea AM, Mateo-Gallego R, Baila-Rueda L, Cenarro A, Pocoví M, Civeira F, De Castro-Orós I. **Identification of variants in LMF1 gene associated with primary hypertriglyceridemia**. Clin Investig Arterioscler. 2015 Sep-Oct;27(5):246-52.
2. Lamiquiz-Moneo I, Blanco-Torecilla C, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Baila-Rueda L, Cenarro A, Civeira F, De Castro-Orós I. **Frequency of rare mutations and common genetic variations in severe hypertriglyceridemia in the general population of Spain**. Lipids Health Dis. 2016 Apr 23;15:82.
3. Lamiquiz-Moneo I, Pérez-Ruiz MR, Jarauta E, Tejedor MT, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Baila-Rueda L, Marco-Benedí V, De Castro-Orós I, Cenarro A, Civeira F. **Single Nucleotide Variants Associated with Polygenic Hypercholesterolemia in Families Diagnosed Clinically with Familial Hypercholesterolemia**. Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2017 Sep 14.
4. Lamiquiz-Moneo I, Baila-Rueda L, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Martín-Navarro A, Ros E, Cofán M, Rodríguez-Rey JC, Pocoví M, Cenarro A, Civeira F. **ABCG5/G8 gene is associated with hypercholesterolemias without mutation in candidate genes and noncholesterol sterols**. J Clin Lipidol. 2017 Nov - Dec;11(6):1432-40.
5. Lamiquiz-Moneo I, Mateo-Gallego R, Bea AM, Dehesa-García B, Perez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Baila-Rueda L, Laclaustra M, Civeira F, Cenarro A. **Genetic predictors of weight loss in overweight and obese subjects**. Obesity. 2018 (Under Review).

## PUBLICACIONES SECUNDARIAS

---

Trabajos complementarios englobados en el marco de las tesis, que se incluyen en el Anexo:

6. Mateo-Gallego R, Lamiquiz-Moneo I, Pérez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Bea AM, Baila-Rueda L, Laclaustra M, Peñalvo JL, Civeira F, Cenarro A. **Different protein composition of low-calorie diet differently impacts adipokine profile irrespective of weight loss in overweight and obese women.** Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2018 Feb;28(2):133-142.
7. Baila-Rueda L, Lamiquiz-Moneo I, Jarauta E, Mateo-Gallego R, Perez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Bea AM, Cenarro A, Civeira F. **Association between non-cholesterol sterol concentrations and Achilles tendon thickness in patients with genetic familial hypercholesterolemia.** J Transl Med. 2018 Jan 15;16(1):6.
8. Baila-Rueda L, Mateo-Gallego R, Lamiquiz-Moneo I, Cenarro A, Civeira F. **Severe hypercholesterolemia and phytosterolemia with extensive xanthomas in primary biliary cirrhosis: role of biliary excretion on sterol homeostasis.** J Clin Lipidol. 2014 Sep-Oct;8(5):520-4.
9. Marco-Benedí V, Lamiquiz-Moneo I, Álvarez-Sala LA, Civeira F. **Disappearance of recurrent pancreatitis after splenectomy in familial chylomicronemia syndrome.** Atherosclerosis. 2018. [In press].



# ÍNDICE





## INDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN/ABSTRACT</b>	<b>Pág.1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>Pág. 5</b>
1. METABOLISMO LIPÍDICO	Pág. 5
1.1 LÍPIDOS	Pág. 5
1.2 LIPOPROTEINAS	Pág. 5
1.2.1 METABOLISMO DE LOS QUILOMICRONES	Pág. 7
1.2.2 METABOLISMO DE LAS VLDL	Pág. 9
1.2.3 METABOLISMO DE LAS LDL	Pág. 11
1.2.4 METABOLISMO DE LAS HDL	Pág. 13
1.2.5 METABOLISMO DE LA LIPOPOTÉINA (a)	Pág. 15
1.2.6 ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO LIPÍDICO	Pág. 17
1.3 ESTEROLES NO COLESTEROL	Pág. 18
2. TRASTORNOS DEL METABOLISMO LIPÍDICO	Pág. 21
2.1 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR	Pág. 23
2.2 HIPERCOLESTEROLEMIA POLIGÉNICA	Pág. 25
2.3 HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA	Pág. 25
2.4 HIPERTRIGLICERIDEMIA ESPORÁDICA	Pág. 26
2.5 HIPERTRIGLICERIDEMIA FAMILIAR	Pág. 28
2.6 SINDROME DE QUILOMICRONEMIA FAMILIAR	Pág. 28
3. FACTORES GENÉTICOS RELACIONADOS CON LOS NIVELES LIPÍDICOS	Pág. 31
3.1 GENES RELACIONADOS CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR	Pág. 31
3.1.1 <i>LDLR</i>	Pág. 32
3.1.2 <i>APOB</i>	Pág. 35
3.1.3 <i>PCSK9</i>	Pág. 37
3.1.4 <i>APOE</i>	Pág. 40
3.1.5 <i>LDLRAP1</i>	Pág. 43
3.1.6 <i>ABCG5/G8</i>	Pág. 45
3.1.7 <i>STAP1</i>	Pág. 48

---

3.2 GENES CAUSALES DE HIPERTRIGLICERIDEMIA:	Pág. 49
3.2.1 <i>LPL</i>	Pág. 49
3.2.2 <i>APOA5</i>	Pág. 53
3.2.3 <i>LMF1</i>	Pág. 54
3.2.4 <i>GPIHBP1</i>	Pág. 56
3.2.5 <i>APOC-II</i>	Pág. 59
3.2.6 <i>APOC-III</i>	Pág. 61
3.3 OTROS LOCI ASOCIADOS A DISLIPEMIAS	Pág. 63
4. FACTORES AMBIENTALES Y GENÉTICOS RELACIONADOS CON LA OBESIDAD Y SOBREPESO	Pág. 66
4.1 FACTORES AMBIENTALES	Pág. 66
4.2 FACTORES GENÉTICOS	Pág. 70
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>Pág. 75</b>
<b>COMPENDIO DE PUBLICACIONES: ESTUDIOS PRINCIPALES</b>	<b>Pág. 77</b>
1. ESTUDIO 1	Pág. 79
1.1 ANTECEDENTES	
1.2 OBJETIVOS	
1.2.1 Objetivo principal	
1.2.2 Objetivos secundarios	
1.3 MATERIAL Y MÉTODOS	
1.4 RESULTADOS	
1.5 CONCLUSIONES	
2. ESTUDIO 2	Pág. 81
2.1 ANTECEDENTES	
2.2 OBJETIVOS	
2.3 MATERIAL Y MÉTODOS	
2.4 RESULTADOS	
2.5 CONCLUSIONES	
3. ESTUDIO 3	Pág. 83
3.1 ANTECEDENTES	
3.2 OBJETIVOS PRINCIPAL	
3.3 MATERIAL Y MÉTODOS	
3.4 RESULTADOS	
3.5 CONCLUSIONES	

4. ESTUDIO 4	Pág. 85
4.1 ANTECEDENTES	
4.2 OBJETIVO PRINCIPAL	
4.3 MATERIAL Y MÉTODOS	
4.4 RESULTADOS	
4.5 CONCLUSIONES	
5. ESTUDIO 5	Pág. 87
5.1 ANTECEDENTES	
5.2 OBJETIVO PRINCIPAL	
5.3 MATERIAL Y MÉTODOS	
5.4 RESULTADOS	
5.5 CONCLUSIONES	
<b>REFERENCIAS</b>	<b>Pág. 91</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>Pág. 123</b>
1. ÁREA TEMÁTICA, FACTOR DE IMPACTO Y APORTACIÓN DEL DOCTORADO EN COMPENDIO DE PUBLICACIONES	Pág. 123
2. COMPENDIO DE PUBLICACIONES: ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS	
2.1 ESTUDIO 6	Pág. 125
2.2 ESTUDIO 7	Pág. 127
2.3 ESTUDIO 8	Pág. 129
2.4 ESTUDIO 9	Pág. 131



**INDICE DE FIGURAS**

1. Estructura, densidad y diámetro de las subclases de lipoproteínas	Pág. 6
2. Síntesis de quilomicrones	Pág. 8
3. Lipólisis periférica de TG	Pág. 9
4. Aclaramiento hepático de QM y VLDL remanentes	Pág. 10
5. Síntesis hepática de VLDL.	Pág. 11
6. Esquema general de la vía metabólica del rLDL	Pág. 13
7. Síntesis y maduración de las partículas de HDL	Pág. 15
8. Estructura de la lipoproteína a	Pág. 16
9. Representación global del metabolismo de las lipoproteínas	Pág. 18
10. Estructuras moleculares de los principales esteroides	Pág. 20
11. Tráfico de colesterol a nivel de los enterocitos	Pág. 21
12. Estructura de los dominios rLDL	Pág. 35
13. Estructura del complejo rLDL/PCSK9	Pág. 36
14. Representación del gen de APOB y de la estructura de la proteína	Pág. 38
15. Estructura de PCSK9	Pág. 40
16. Papel de PCSK9 en la degradación de los receptores de cLDL	Pág. 41
17. Representación de la proteína ApoE	Pág. 44
18. Representación esquemática de la función de la proteína LDLRAP1	Pág. 47
19. Papel de ABCG5/G8 en el flujo de colesterol	Pág. 48
20. Biosíntesis, secreción y transporte de LpL.	Pág. 53
21. Papel del factor de maduración de la lipasa 1 en el ensamblaje y maduración de la lipoproteína lipasa	Pág. 57
22. Estructura del factor de maduración de la lipasa	Pág. 58
23. Características estructurales de GPIHBP1 y ubicaciones de las mutaciones clínicamente significativas en GPIHBP1	Pág. 59
24. Papel de GPIHBP1 en el metabolismo de los TG	Pág. 60
25. Estructura representativa calculada de Apo C-II	Pág. 62
26. Descripción general del papel de Apo C-III sobre el metabolismo de los TG	Pág. 64
27. Superposición de loci asociados con diferentes rasgos lipídicos	Pág. 66
28. Control de la homeostasis energética por neuronas del núcleo arcuado.	Pág. 70
29. Control del hambre y de la saciedad	Pág. 71
30. Genes involucrados en el desarrollo de la obesidad	Pág. 73





**INDICE DE TABLAS**

- |   |         |
|---|---------|
| 1. Clasificación de las apolipoproteínas                            | Pág. 7  |
| 2. Clasificación de Fredrickson y Lees de las dislipemias primarias | Pág. 24 |



# ABREVIATURAS



2-MG	2-monoacilglicerol
AA	Aminoácidos
ABCA1	Transportador dependiente de unión de adenosín trifosfato 1
ABCG5	Transportador dependiente de unión de G5
ACAT	Colesterol acil transferasa
ACAT2	Isoforma 2 de la colesterol aciltransferasa
ADF	Apo B-100 defectuosa familiar
AG	Ácidos grasos
AGL	Ácido graso libre
AP	Proteína adaptadora
Apo	Apolipoproteína
ATGL	Lipasa adiposa de TG
C	Colesterol
CCV	Vesículas recubiertas de clatrina
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína transferidora de esteres de colesterol
cHDL	Colesterol HDL
CL	Colesterol libre
cld	Deficiencia combinada de lipasa
cLDL	Colesterol LDL
CNX	Chaperona Calnexina
ColS	Colaboradores
COPII	Complejo de la proteínas de la cubierta II
CT	Colesterol total
Da	Daltons
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DM	Diabetes mellitus

ECP	Evento cardiovascular prematuro
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EEA1	Antígeno endosómico temprano 1
EFG	Factor de crecimiento de la epidermis
ERAD	Vías de degradación del retículo endoplasmático
FH-	Hipercolesterolemia familiar sin mutación en los genes candidatos
FL	Fosfolípidos
G8	Transportador dependiente de unión de G8
GATA4	Proteína 4 de unión GATA
GPIHBP1	Glicosil-fosfatidil-inositol unida a una proteína 1
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HF	Hipercolesterolemia familiar
HFC	Hipercolesterolemia familiar combinada
HFN4 $\alpha$	El factor nuclear de los hepatocitos 4 $\alpha$
HLS	Lipasa sensible a hormona
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A
HNF4 $\alpha$	Factor nuclear hepatocito 4 alfa
HP	Hipercolesterolemia poligénica
HSPGs	Proteoglicanos heparan sulfato
HTG	Hipertrigliceridemia
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IMC	Índice de masa corporal
KDa	Kilodaltons
LAMP1	Proteína de membrana 1 asociada a lisosomas
LCAT	Lecitin colesterol acil transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLRAP1	Proteína adaptadora de rLDL

---

LH	Lipasa hepática
LMF1	Factor 1 de maduración de la lipasa
Lp(a)	Lipoprotein a
LPL	Lipoprotein Lipasa
LRP	Proteína relacionada con el rLDL
LXR $\alpha$	Receptor del hígado X $\alpha$
miR	microRNA
MTP	Proteína microsomal de transferencia de triglicéridos
NPC1L1	Proteína Niemann-Pick C1- <i>like</i> -1
PCSK9	Proproteína convertasa subtilisina/ kexina tipo 9
PLTP	Proteína transferidora de fosfolípidos
QM	Quilomicrón
QMr	Quilomicrones remanentes
Rab4	Pequeña proteína asociada de GTPasa
RE	Retículo endoplasmático
rLDL	Receptor LDL
SERBP	Proteína de unión al ARN inhibidor del activador del plasminógeno
SNV	Single nucleotide variant (cambios de un único nucleótido)
SorLA	Receptor relacionado con la sortilina
SRB1	Receptor scavenger clase B tipo 1
STAP1	Proteína transductora de señales 1
TG	Triglicéridos
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VLDL	VLDL remanentes





**RESUMEN**  
**ABSTRACT**



Cardiovascular diseases are the main cause of death, disability and consumption of health resources both in Spain and in most of the developed world. Cardiovascular diseases are, mostly of vascular origin and atherosclerosis is the main cause of their development. The etiology of the atheroma plaque is multifactorial. Risk factors include age, body mass index, arterial hypertension, smoking, diabetes and dyslipidaemia.

Primary hyperlipemias are a heterogeneous group of lipid metabolism disorders characterized by a high cardiovascular risk. The most important clinical forms are accompanied by increases in the plasma concentration of cholesterol, triglycerides or both. Although the concentration of cholesterol and triglycerides depends on multiple genetic and environmental mechanisms, subjects who have extremes of hypercholesterolemia or hypertriglyceridemia usually have a higher genetic risk. In spite of the important advances in the field of genetics that have allowed the identification of numerous loci responsible for different dyslipidaemias, there is still a high percentage of dyslipidaemias of unknown genetic origin.

This thesis is made by a compendium of 5 different publications which main objective is to discover novel genes and understand their role on cholesterol and triglyceride metabolism in the pathogenesis of hereditary dyslipidaemia.

The first study aimed to identify genetic variants in *LMF1* gene in subjects with triglyceride (TG) values above 500 mg/dL and without secondary causes recruited at the Lipid Unit at the Miguel Servet Hospital. The promoter, exons and exon-intron regions of the *LMF1* gene were sequenced in 112 patients with severe primary hypertriglyceridemia (HTG). Five patients (4.46%) were carriers of 4 rare variants in *LMF1* previously associated with HTG. In addition, 2 common variants were identified with an allelic frequency different from that observed in the general population: c.194-28 T> G and c.729 + 18C> G. A bioinformatic analysis of the variants found was carried out, identifying the variants p. (Arg364Gln), p. (Arg451Trp), p. (Pro562Arg) and p. (Leu85Leu) as potentially harmful. Therefore, we conclude that our results suggest that the *LMF1* gene contributes to the etiology of severe primary HTG in a significant percentage of patients, with a combination of mutations with moderate to aggressive effects and polymorphisms classically associated with this dyslipidaemia.

In the second study, our objective was to identify the prevalence of HTG and the frequency of rare mutations causing HTG in a whole non-selected population. A total of 23,310 subjects, aged over 18 years, from a primary care-district in a middle-class area of Zaragoza (Spain) with TG >500 mg/dL were selected to establish HTG prevalence. Those diagnosed as primary HTG were considered for further genetic analysis. The promoters, coding regions and exon-intron

boundaries of *LPL*, *LMF1*, *APOC2*, *APOA5*, *APOE* and *GPIHBP1* genes were sequenced. The frequency of rare variants identified was studied in 90 controls. We defined rare variants those their frequencies were less than 1 % in general population obtained from the 1000 Genomes project. Our results show that one hundred ninety-four subjects (1.04 %) had HTG and 90 subjects (46.4 %) met the inclusion criteria for primary HTG. In this subgroup, nine patients (12.3 %) were carriers of 7 rare variants in *LPL*, *LMF1*, *APOA5*, *GPIHBP1* or *APOE* genes. Three of these mutations are described for the first time in this work. The presence of a rare pathogenic mutation did not confer a differential phenotype or a higher family history of HTG. We concluded that the prevalence of rare mutations in candidate genes in subjects with primary HTG is low. The low frequency of rare mutations, the absence of a more severe phenotype or a dominant transmission of HTG indicates the complexity and heterogeneity of this disease.

In the third study, our objective was to determine the contribution to low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) of the single nucleotide variants associated with polygenic hypercholesterolemia in probands with genetic hypercholesterolemia without mutations in candidate genes (FH-) and the genetic score in cascade screening in their family members. We recruited 49 nonfamilial hypercholesterolemia genetic hypercholesterolemia families (294 participants) and calculated cholesterol gene scores, derived from single nucleotide variants in *SORT1*, *APOB*, *ABCG8*, *APOE* and *LDLR* and lipoprotein(a) plasma concentration. Our results showed that risk alleles in *SORT1*, *ABCG8*, *APOE*, and *LDLR* showed a statistically significant higher frequency in blood relatives than in the 1000 Genomes Project. However, there were no differences between affected and nonaffected members in each of the single nucleotide variants. Although, the contribution of the cholesterol gene score to LDL-C was significantly higher in affected than in nonaffected participants ( $p = 0.048$ ). The percentage of the LDL-C variation explained by the score was 3.1%, and this percentage increased to 6.9% in those families with the highest genetic score in the proband. In this work we concluded that nonfamilial hypercholesterolemia genetic hypercholesterolemia families concentrate risk alleles for high LDL-C. Their contribution varies greatly among families, indicating the complexity and heterogeneity of these forms of hypercholesterolemias. The gene score explains a small percentage of LDL-C, which limits its use in diagnosis.

In the fourth study, we analysed the prevalence the of *ABCG5/G8* genetic variants in FH- patients, as defects in these genes relate to intestinal hyperabsorption of cholesterol and thus *ABCG5/G8* variants could explain in part the mechanism of hypercholesterolemia. We sequenced the *ABCG5/G8* genes in 214 FH- and 97 controls and quantified surrogate markers

of cholesterol absorption (5 $\alpha$ -cholestanol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, stigmasterol, and sitostanol) by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in both studied groups. We found 8 FH- patients (3.73%) with a pathogenic mutation in *ABCG5/G8* genes. We observed significantly higher concentration of surrogate markers of cholesterol absorption in FH- than in controls. In addition, we found significantly higher concentrations of cholesterol absorption markers in FH- with *ABCG5/G8* defects than FH- patients without mutation in *ABCG5/G8* genes. A gene score created from 27 common single nucleotide variants in *ABCG5/G8* associated with hypercholesterolemia was significantly higher in cases than in controls ( $p=0.032$ ). Subjects with a gene score above the mean had significantly higher 5 $\alpha$ -cholestanol and stigmasterol than those with a lower gene score. We concluded that FH- subjects accumulate an excess of rare and common gene variations in *ABCG5/G8* genes. This variation is associated with increased intestinal absorption of cholesterol, as determined by surrogate makers, suggesting that these loci contribute to hypercholesterolemia by enhancing intestinal cholesterol absorption.

Finally, we concluded this thesis with one study still pending publication in the Obesity journal, in which we aim to investigate the role of genetic factors in weight loss in a large cohort of subjects with overweight under a homogeneous dietary intervention. We retrospectively recruited all subjects ( $N=788$ ) aged over 18 with a BMI between 25-40 kg/m<sup>2</sup> and a control group of subjects (168 patients) with normal BMI (18.5-25 kg/m<sup>2</sup>) from a Lipid Unit with at least one-year of follow-up from 2008 to 2016. All cases received counselling by a nutritionist which included healthy diet and increase of physical activity. We genotyped 25 single nucleotide variants (SNV) in 25 genes previously associated with obesity and calculated weighted genetic score derived from 5 SNV (*FLJ35779*, *KCTD15*, *NRXN3*, *RPL27A* and *SH2B1* genes). Our results showed the risk allele in *CADM2* showed a higher frequency in overweight and obese subjects than in controls ( $p=0.007$ ). The mean follow-up was  $5.58 \pm 2.68$  years. Subjects with lower genetic score showed higher weight loss along follow-up. The genetic score was the variable that explained best weight change variance, after baseline weight, explaining 1.7% weight change variance at one year and 1.5% weight change variance at the end of follow-up ( $p<0.001$  and  $p=0.001$ , respectively) adjusting by baseline weight, sex, age and years of follow-up.



# INTRODUCCIÓN





## 1. METABOLISMO LIPÍDICO

### 1.1 LÍPIDOS

Desde el punto de vista clínico, los lípidos más importantes en el plasma son los triglicéridos (TG) y el colesterol (1). El colesterol juega numerosos papeles en la fisiología humana: es componente de las membranas celulares, precursor de hormonas esteroideas, ácidos biliares y de la vitamina D, y es necesario, de forma directa o a través de productos del metabolismo para la activación de muchos procesos celulares, como señal molecular (2). El 80% del colesterol plasmático es derivado de la síntesis endógena intracelular cuya enzima principal es la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) y, sólo un pequeño porcentaje proviene de la dieta. Los TG son una llave energética formada por tres ácidos grasos unidos a un glicerol, son sintetizados en el intestino y en células hepáticas y liberados al plasma. Posteriormente se produce la lipólisis de los TG en la superficie endotelial, liberando los ácidos grasos en las células periféricas para su  $\beta$ -oxidación o su almacenaje (3).

Por tanto, los lípidos plasmáticos son aportados por la dieta mediante absorción intestinal y por la síntesis endógena, especialmente a nivel hepático. En el torrente sanguíneo, son transportados a lugares de modificación y almacenamiento. El metabolismo lipídico está finamente regulado para mantener el aporte entre las fuentes de aporte y las vías de eliminación (vías metabólicas y de excreción) (4). En la regulación del metabolismo lipídico intervienen factores genéticos, ambientales, así como interacción entre ambos. Todos ellos pueden alterar el metabolismo generando una situación conocida como dislipemia (4).

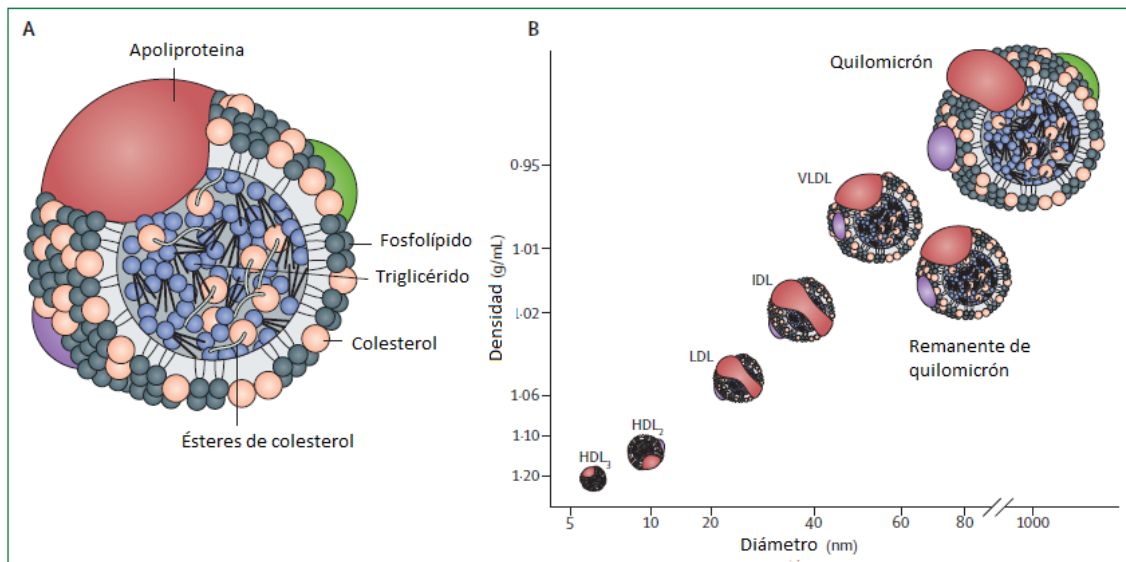
### 1.2 LIPOPROTEÍNAS

La insolubilidad del colesterol y los TG requiere que sean transportados por macromoléculas esféricas llamadas lipoproteínas. Las lipoproteínas son agregados moleculares esféricos de 20 Å de grosor, pseudomicerales, solubles en agua y formadas por un núcleo de lípidos apolares (colesterol esterificado (CE) y TG) cubiertos por una capa polar de 2 nm formada a su vez por varias proteínas específicas, llamadas apolipoproteínas (apo), fosfolípidos (FL) y colesterol libre (CL) (Figura 1A). La unión de los lípidos del núcleo a la superficie exterior de FL y apo se realiza mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van de Waals, fuerzas de unión relativamente lábiles que permiten el intercambio de lípidos y apo entre las distintas lipoproteínas séricas (5).

El grupo de las lipoproteínas alberga 5 grandes clases en función de sus características físico químicas: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de alta

densidad (HDL). La distinta densidad de cada una de las lipoproteínas se debe a las diferentes proporciones de lípidos y proteínas que contienen. Las lipoproteínas con mayor porción lipídica son los QM, seguidas de las VLDL, sin embargo el colesterol es principalmente transportado por las LDL y las HDL (Figura 1B) (5).

**Figura 1. Estructura, densidad y diámetro de las subclases de lipoproteínas**



Adaptada de Ridker (6). Abreviaturas anteriormente no descritas y que aplican en la figura: VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*, lipoproteína de muy baja densidad), IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*, lipoproteína de densidad intermedia), LDL (*Low Density Lipoprotein*, lipoproteína de densidad baja), HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub> subfracciones de la lipoproteína de alta densidad (*High Density Lipoprotein*).

Las apos varían de unas lipoproteínas a otras, y se denominan por las letras del alfabeto de acuerdo con la secuencia en la que han sido descubiertas. Las LDL contienen un único tipo de apo, la apo B, las demás lipoproteínas contienen una mezcla de ellas. Las apo A son las más abundantes en HDL y las apos C y apo E están presentes en todas las lipoproteínas excepto en las LDL. Cada una de estas apo está a su vez formada por una familia de dos o más proteínas, con características inmunológicas, estructurales y funcionales distintas:

Tabla 1. Clasificación de las apolipoproteínas

<b>Apo</b>	<b>Localización/Gen</b>	<b>Síntesis</b>	<b>Estructura</b>	<b>Función</b>	<b>Lipoproteínas</b>	<b>Ruta metabólica</b>
<b>AI</b>	Cromosoma 11 Cluster génico: A1/C3/A4/A5	Intestino hígado	243 AA 28 KDa	Estructura de HDL Activador de LCAT	Proteína más abundante de HDL, VLDL y QM.	Transporte reverso de colesterol
<b>AII</b>	Cromosoma 1, A2	Intestino hígado	77 AA 17,4 KDa	Estructura de HDL, TG y el metabolismo de ácidos grasos	Segunda proteína más abundante en las HDL, tras la apo-AI. QM, VLDL.	Transporte reverso de colesterol
<b>AIV</b>	Cromosoma 11 Cluster génico: A1/C3/A4/A5	Intestino hígado	376 AA, 46 KDa	Metabolismo de partículas ricas en TG. Interactúa con apo-CII en LPL. Activador de LCAT	QM, HDL, libre en plasma	Transporte reverso de colesterol
<b>AV</b>	Cromosoma 11 Cluster génico: A1/C3/A4/A5	Hígado	367 AA, 41 KDa	Ensamblaje de QM y VLDL. Activador de LPL	QM, VLDL, HDL	Relacionado con el metabolismo de los TG
<b>CIII</b>	Cromosoma 11 Cluster génico: A1/C3/A4/A5	Intestino hígado	79 AA 8,8 KDa	Inhibidor de LPL. Desplaza la apo E de LRP.	Superficie de partículas ricas en TG: QM y VLDL	Relacionado con el metabolismo de los TG
<b>CII</b>	Cromosoma 19 Cluster génico: E/C1/C2/C4	Intestino hígado	79 AA 8,9 KDa	Activador de LPL: su deficiencia llevará al aumento de la HTG	QM, VLDL, HDL	Relacionado con el metabolismo de los TG
<b>CI</b>	Cromosoma 19 Cluster génico: E/C1/C2/C4	Intestino hígado	57 AA	Activador de LCAT, inhibidor de LPL y CETP. Inhibe la apo E uniéndose a LRP.	QM, VLDL, HDL	Relacionado con el metabolismo de los TG
<b>B100</b>	Cromosoma 2, <i>APOB</i>	Hígado	4536 AA 550 KDa	Componente estructural de VLDL, IDL y LDL. Ligando del rLDL.	VLDL, IDL, LDL	Ligando de rLDL
<b>B48</b>	Cromosoma 2, <i>APOB</i>	Intestino	2152 N- terminal AA, 264 kDa	Componente estructural de QM y remanentes de QM	QM, remanentes de QM	Ligando de rLDL
<b>E</b>	Cromosoma 19 Cluster génico: E/C1/C2/C4	Hígado, intestino, cerebro y otros	299 AA, 34,5 KDa	Proteína multifunción. Ligando del rLDL y remanentes de QM. Ligando de LRP. Modula LPL, CETP, LCAT, LH. Molécula antioxidante. Regulador de la respuesta inflamatoria	QM, VLDL, remanentes de HDL	Ligando de rLDL, transporte reverso de colesterol
<b>(a)</b>	Cromosoma 6, unido al gen LPA	Hígado	Masas moleculares variables de 187-800 kDa.		Lp(a)	

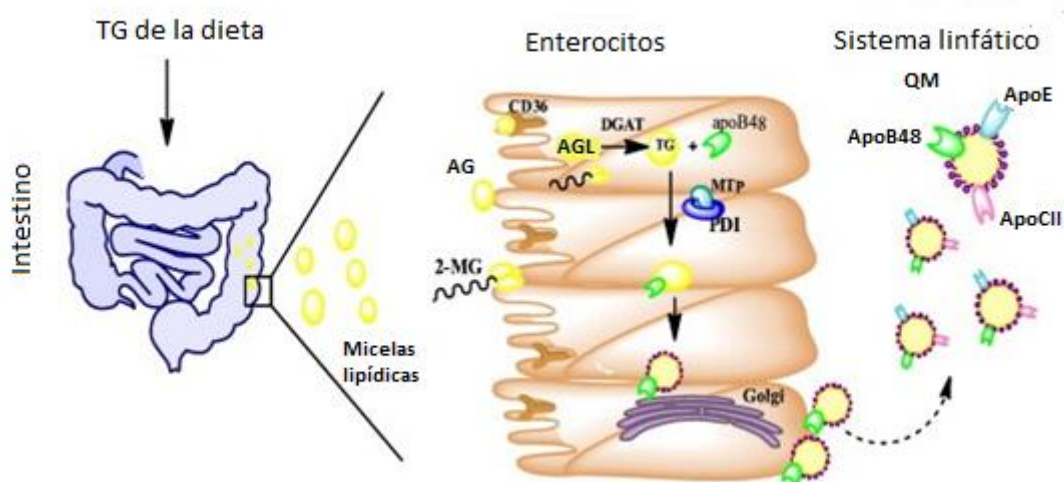
Adaptado de Dominiczaky y cols (7). Abreviaturas no descritas anteriormente y que aplican en la figura: aminoácidos (AA), Kilo Daltons (KDa), proteína transferidora de esteres de colesterol (CETP), lecitin

colesterol acil transferasa (LCAT), proteína relacionada con el rLDL (LRP), hipertrigliceridemia (HTG), Lipasa hepática (LH), lipoprotein lipasa (LPL), lipoproteína (a) (Lp(a)), receptor LDL (rLDL).

### 1.2.1 METABOLISMO DE LOS QUILOMICRONES

Los QM son las lipoproteínas más ricas en TG, con un contenido superior al 85%, y tan solo un 2% de proteína. Además, contienen las apo B-48, apo C-III, apo C-II y apo A-V (3). Los TG derivados de la dieta son hidrolizados en el intestino por medio de la lipasa pancreática en 2-monoacilglicerol (2-MG) y ácidos grasos (AG), que pueden ser absorbidos por los enterocitos por difusión o por transporte específico como CD36 (8). En el interior del enterocito, el 2-MG y AG son resintetizados en TG por medio de la *Acil-CoA* diacilglicerolaciltransferasa (DGAT) (9). A continuación, la proteína *Microsomal Triglyceride Transfer Protein* (MTP), junto con la proteína disulfuro isomerasa (PDI), facilita la lipidación de la apo B-48, en el primer paso para la formación del QM. Posteriormente, son trasladados al aparato de Golgi mediante el complejo proteína *Coatmore* II (complejo COP II) y los transportadores SAR1a y SAR1b. Los QM nacientes son exocitados desde la membrana basolateral del enterocito hacia el torrente circulatorio (10). Una vez ha entrado la lipoproteína en la circulación, intercambia apos con las HDL enriqueciéndose en apo E y apo C-II y apo C-I hasta formarse el QM maduro. La presencia de apo C-II hace que los QM maduros sean reconocidos como sustratos por la lipoprotein lipasa (LPL). (Figura 2).

Figura 2: Síntesis de quilomicrones

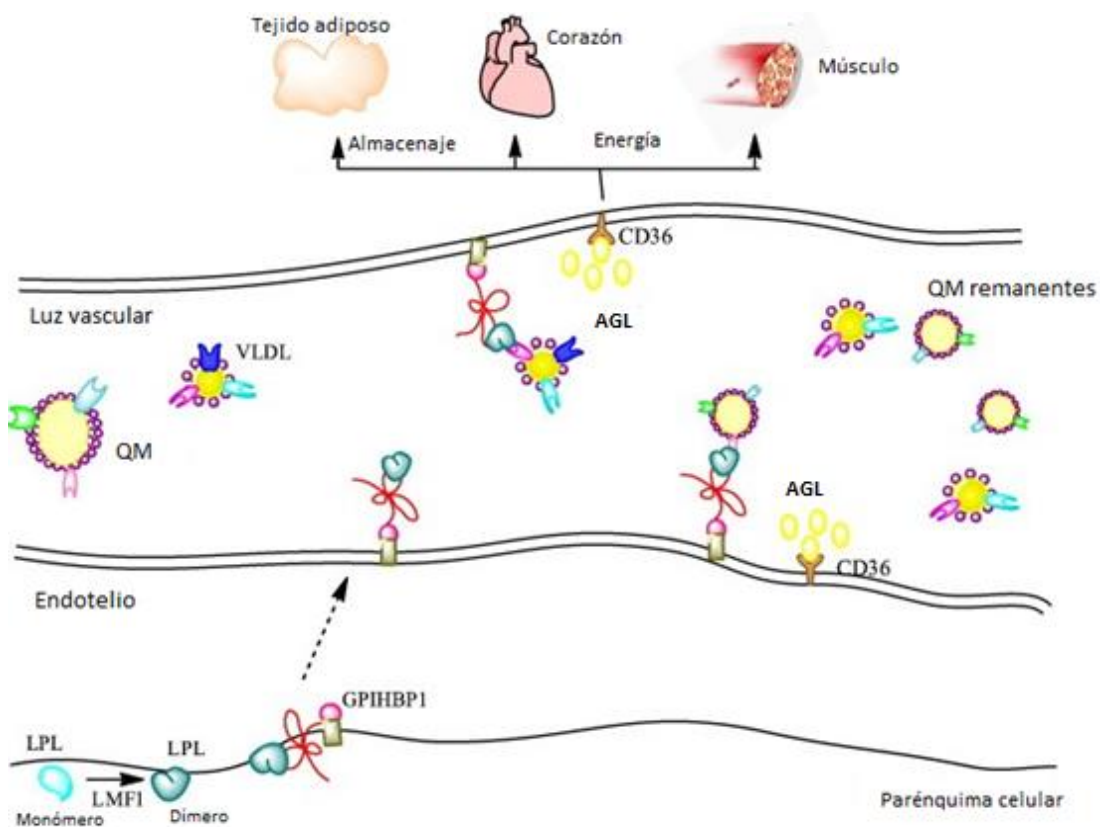


Adaptada de Hassing HC y cols (11). Abreviaturas anteriormente no descritas y que aplican en la figura: ácido graso libre (AGL).

El QM maduro es sustrato de la LPL (12), enzima glicoproteica anclada por medio de los glucosaminoglicanos a la superficie endotelial. La LpL es sintetizada en el parénquima celular del tejido adiposo, corazón o músculo esquelético. El factor 1 de maduración de la lipasa (LMF1) es esencial para el propio ensamblaje dimérico de la LPL (13).

Posteriormente, la LPL es transportada a la superficie endotelial donde se une a la proteína Glicosil-Posfatidil-Inositol anclado a la HDL Unida a una Proteína 1 (GPIHBP1) (14). La GPIHBP1 proporciona una plataforma para la LPL y las lipoproteínas ricas en TG, resultando allí la hidrólisis de TG. Parece que tiene una función esencial para el transporte de LPL desde el endotelio celular hacia la superficie de los capilares (15).

**Figura 3: Lipólisis periférica de TG**

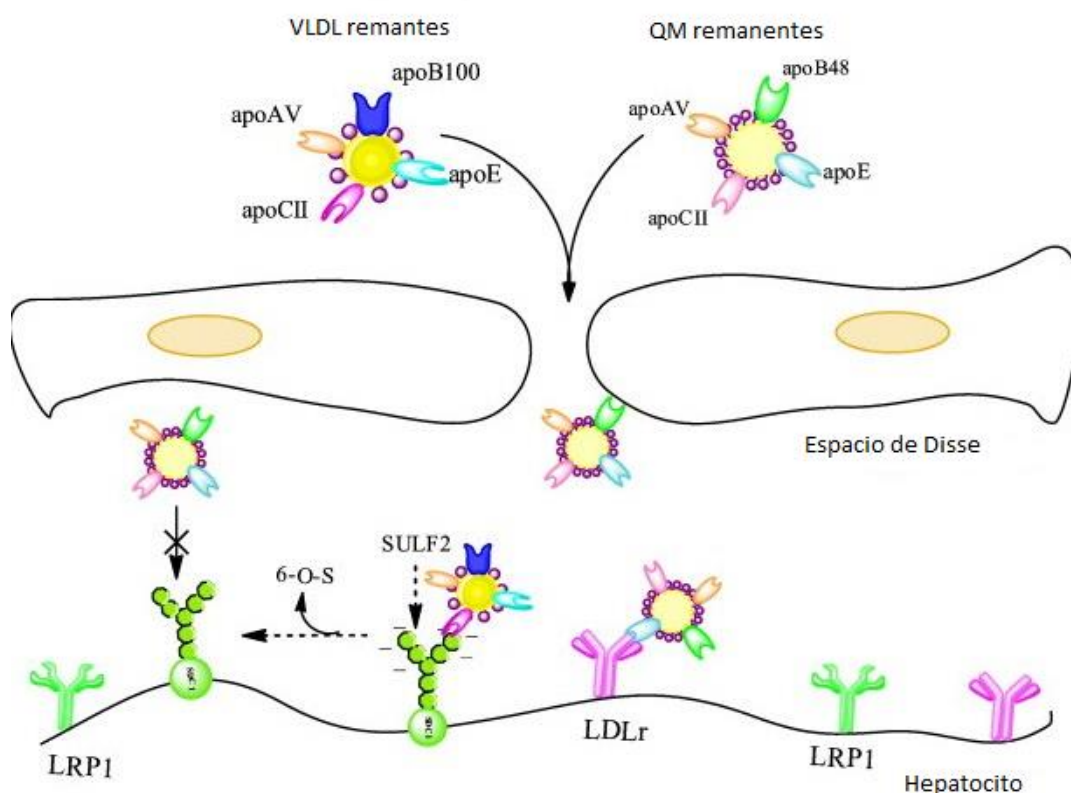


Adaptada de Hassing HC y cols (11).

La LPL hidroliza los TG a 2-MG y AGL que son capturados por los tejidos adiposo y muscular. EL QM, tras perder los TG, mediante intercambio con las HDL, pierde contenido en apo C-II y se enriquece en apo C-III, dando lugar a los QM remanentes (QM<sub>r</sub>). Los QM<sub>r</sub> van al hígado, donde son metabolizados por la lipasa hepática (LH) (11) (Figura 3).

La apo E es esencial para el aclaramiento de los QMr, ya que contiene residuos cargados positivamente que facilitan la unión con los dominios negativos de los receptores hepáticos. Finalmente, los QMr ricos en apo E, son reconocidos por el receptor LDL (rLDL) y por la Proteína 1 Relacionada con el Receptor LDL (LRP1) e internalizados en las células hepáticas mediante endocitosis (16). Por la acción de las enzimas hidrolíticas lisosómicas se libera el colesterol que transportaban, el cual influirá en la síntesis y formación de esterios de colesterol y síntesis de ácidos biliares. (Figura 4).

**Figura 4: Aclaramiento hepático de QM y VLDL remanentes**



Adaptada de Hassing HC y cols (11). Abreviaturas anteriormente no descritas y que aplican en la figura: Sulfato glucosamina 6-O-endosulfatasa-2 (SULF2).

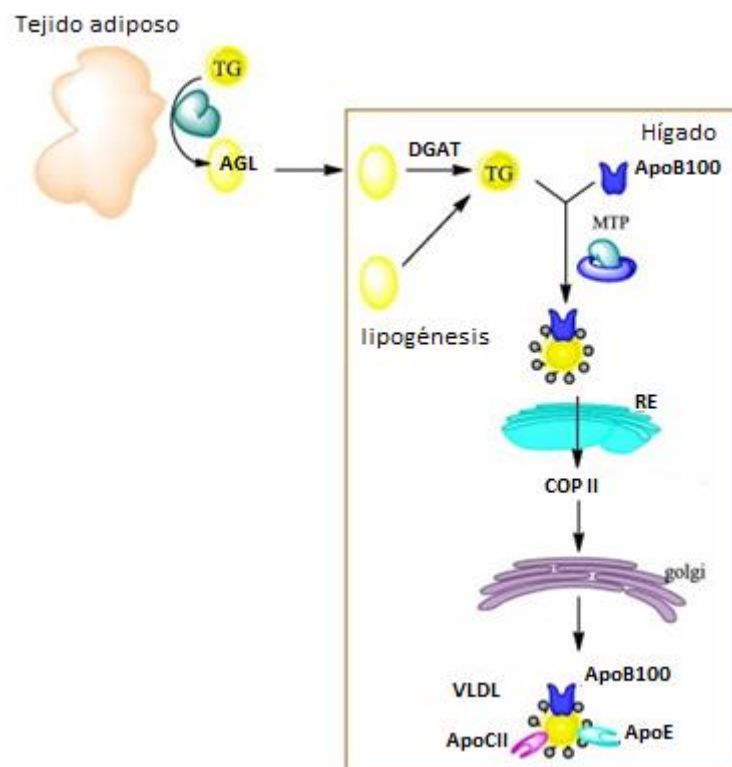
### 1.2.2 METABOLISMO DE LAS VLDL

Las VLDL son lipoproteínas de origen hepático precursoras de las LDL y que participan en el transporte de los lípidos de síntesis endógena. Son ricas en TG, suponiendo el 55% de la masa total frente al 10-15% de colesterol. También contienen apo B-100 y pequeñas cantidades de apos Cs y apo E (5).

Los TG de las VLDL son sintetizados en el hígado y empaquetados en partículas de VLDL con apo B-100 como proteína principal. Los AG requeridos son derivados de la síntesis *de novo*, usando

glucosa como sustrato, o de la lipólisis de TG en el tejido adiposo por acción de la lipasa sensible a hormonas (HSL). Los AGL penetran en el hígado y la enzima DGAT generará TG para almacenarlos en pequeñas gotas (9). La enzima MTP es esencial para la lipidación de apo B-100 y el complejo COPII es responsable de la translocación de partículas pequeñas de VLDL desde el retículo endoplasmático (RE) hasta Golgi, donde se acaba formando la VLDL madura con las apos B y E (17). Las VLDL maduras migran a la membrana basal del hepatocito, donde por endocitosis, son liberadas a los sinusoides, que dan lugar a la formación de capilares a través del espacio de Disse y finalmente a la circulación sistémica.

**Figura 5: Síntesis hepática de VLDL.**



Adaptada de Hassing HC y cols (11).

Se ha postulado que la apo C-III puede contribuir a la producción de VLDL, por lo menos en modelos animales (18). Un aumento de la expresión de apo C-III coincide con un aumento de la expresión de VLDL.

Cuando las partículas nacientes de VLDL llegan al plasma, sufren una serie de cambios semejantes a los que ocurre en los QM nacientes. Intercambian CL y esterificado con la HDL por mediación de la LTP y la LCAT (Lecitina Colesterol Acil Transferasa) y reciben de éstas las apos C y E, y FL. Al poseer apo C-II son un sustrato adecuado para la acción de la LPL (5). Las VLDL son retenidas por el proteoglicano heparán sulfato y sus TG son hidrolizados por la acción de LpL

liberando AGL y glicerol. Tras la hidrólisis de los TG, se distorsiona la superficie de las VLDL, liberándose FL y apos C, que son incorporados a las HDL. Finalmente, la partícula queda libre y convertida en una partícula enriquecida proporcionalmente en colesterol y apo E, denominada VLDL remanentes (VLDLr), conocida también como IDL. Esta partícula puede ser captada de nuevo por el hepatocito mediante el rLDL o ser metabolizada a LDL por la LH.

Las IDL son productos de la degradación de las VLDL que contienen apo B100, apos C y apo E. Tienen un diámetro de cerca de 35 nm y una vida media corta, por lo que, normalmente, están en sangre en concentraciones muy bajas (3).

El papel de la apo A-V en la facilitación de la producción de VLDLr no está determinado. Recientemente se ha demostrado que niveles altos de apo A-V, localizado en gotas lipídicas en el hígado, coinciden con altos niveles de TG almacenados, sugiriendo un papel de apo A-V en la movilización de TG en la producción de VLDL (19). La disponibilidad de parte de TG determina el destino de apo B y consecuentemente la secreción de partículas de VLDL (20).

Por otra parte, las VLDL pueden ser reconocidas por receptores específicos en tejidos como corazón, músculo esquelético, tejido adiposo, cerebro y macrófagos en función de su contenido en apo E (21).

### 1.2.3 METABOLISMO DE LAS LDL

La lipoproteína LDL es el principal transportador de colesterol en su forma esterificada. Las LDL contienen el 60-70% del colesterol total (CT) plasmático, por tanto, son las principales transportadoras de colesterol, cuya eliminación del plasma depende del rLDL que reconoce la única apo que portan, la apo B-100. Las LDL son las lipoproteínas con mayor potencial aterogénico y, por ende, la principal diana de tratamiento en las hipercolesterolemias (3).

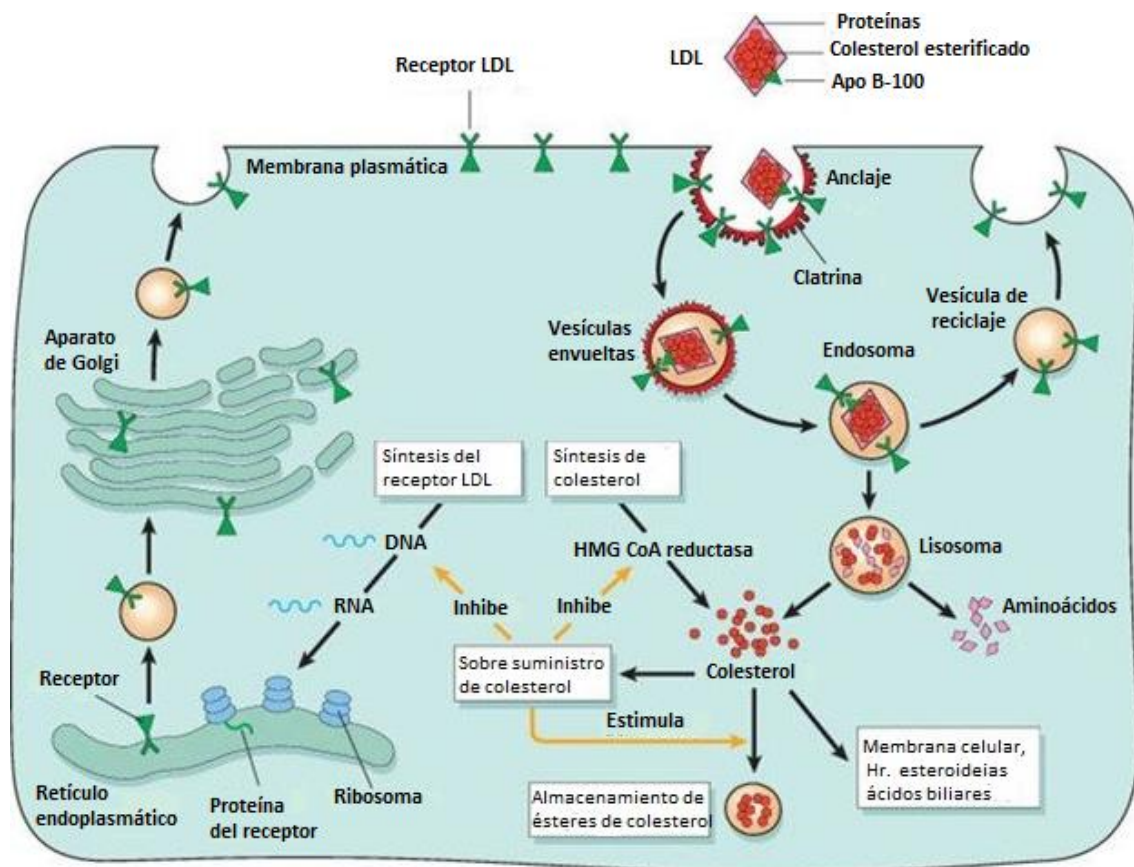
Las LDL son eliminadas del plasma mediante diferentes mecanismos que dependen del tipo celular y del estado de la apo B-100. El órgano cuantitativamente más importante en cuanto a la captación de las LDL plasmáticas es el hígado, seguido del intestino, las glándulas esteroidogénicas y los macrófagos. El hígado y las suprarrenales captan las LDL por mediación del rLDL, mientras que el intestino y los macrófagos emplean mecanismos independientes a este receptor. Los macrófagos, además del receptor de apo B-100, disponen de otros que reconocen formas especiales de VLDL, denominadas  $\beta$ -VLDL, y QMr y otros receptores que reconocen las LDL modificadas (5).

El rLDL y su mecanismo de acción fue descubierto por Goldstein y Brown hace más de 40 años (22). El rLDL es una glicoproteína con una secuencia hidrofóbica de 21 aminoácidos en su extremo N-terminal, que es eliminada inmediatamente después de su formación y que parece



tener un papel importante como señal para dirigirlos desde los ribosomas, que participan en la síntesis del rLDL, hacia la membrana del retículo endoplasmático. El rLDL sintetizado en el retículo endoplasmático migra a través del aparato de Golgi hasta la membrana celular en las fosas cubiertas de catrina, donde enlaza con la apo B-100 de las LDL (5). Tras la unión del rLDL con las LDL, se produce una invaginación de la membrana y la formación de un endosoma, en cuyo interior hay un descenso acusado del pH que disocia la apo B-100 y el rLDL, que por medio de una vesícula de reciclaje volverá a la superficie de la membrana. El resto del endosoma se fusiona con los lisosomas, donde queda internalizada la apo B-100, que será degradada por enzimas lipolíticas. La partícula LDL se hidroliza totalmente dando lugar a aminoácidos libres procedentes de la apo B-100 y ésteres de colesterol. Estos últimos serán hidrolizados por medio de la colesterol esterasa ácida lisosomal, dando lugar a CL. Parte del CL se esterificará por medio de la acil-CoA colesterol acil transferasa (ACAT) y se acumulará en vesículas; y otra parte se unirá al CL sintetizado por la célula. El CL ejercerá diferentes funciones, como activar la ACAT, inhibir la síntesis de nuevas moléculas del rLDL e inhibir la síntesis endógena de colesterol (por medio de su acción sobre la HMG-CoA reductasa) (Figura 6).

**Figura 6: Esquema general de la vía metabólica del rLDL**



Adaptada de Szadai y cols (23).

El colesterol tiene una alta capacidad de auto-regulación. A principios de los 90, Yokoyama y colaboradores descubrieron la proteína SERBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein* o proteína de unión al elemento regulado por esteroides) un factor de transcripción responsable de la regulación de este proceso (24). En la última década se descubrió la Proteína Convertasa Subtilisina/ Kexina tipo 9 (PCSK9), que es secretada al plasma por el hígado y otros tejidos, se une al rLDL y promueve la internalización del receptor al interior celular. De tal modo que disminuye la vida útil del rLDL sobre la superficie celular y aumenta en gran medida los niveles de colesterol LDL plasmáticos (cLDL) (25).

#### 1.2.4 METABOLISMO DE LAS HDL

Las HDL son un complejo macromolecular compuesto, aproximadamente, por un 50% de lípidos y un 50% de proteínas. Contienen el 20-30% del CT y su función principal es el transporte del colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para su catabolismo. Sus principales apoproteínas son apo A-I, apo A-II, apo A-IV, apo C y apo E (3).

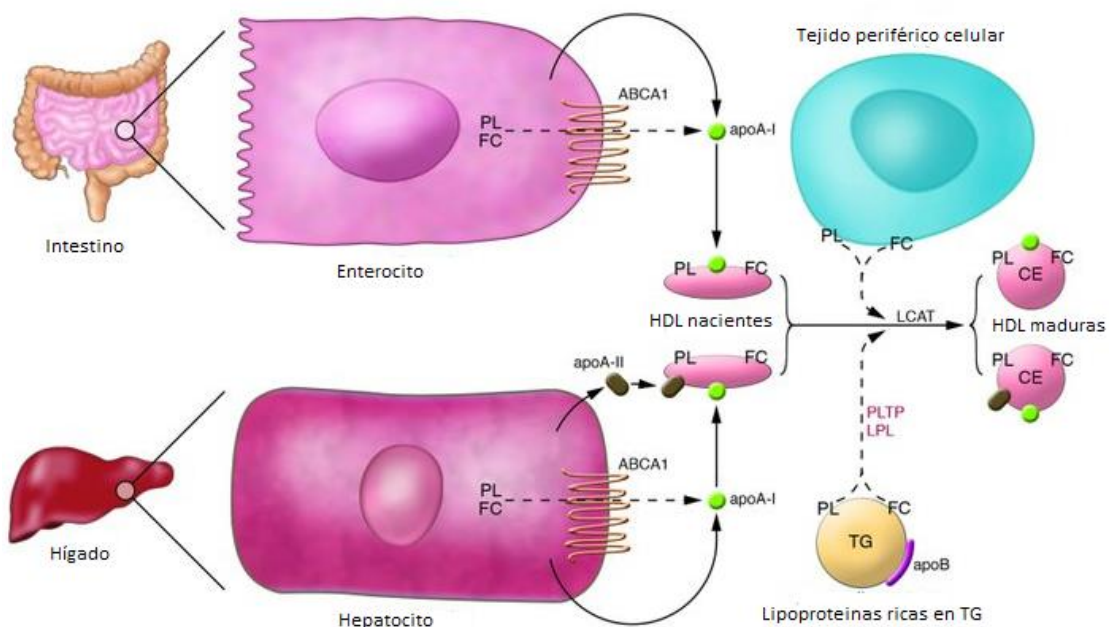
La biosíntesis de HDL es un proceso complejo que incluye la síntesis y secreción de las apoproteínas de la HDL, la adquisición de lípidos extracelulares (FL y colesterol) y el ensamblaje de la HDL madura (26). La apo A-I es la principal proteína de las HDL, constituyendo el 70% del contenido proteico de la partícula. La apo A-II es la segunda proteína más importante, constituyendo el 20% de las proteínas de HDL. Las recién sintetizadas apoproteínas de HDL deben adquirir FL y colesterol. En este paso, el transportador ATP-Binding Cassete AI (ABCA1) tiene un papel importante en la lipidación de la apo A-I facilitando el eflujo de colesterol hacia las lipoproteínas pobres en lípidos y que contienen apo A-I. Dicho transportador se localiza principalmente en intestino e hígado y parece ser el responsable de la mayoría de la lipidación inicial de apo A-I libre (27).

En este paso de la formación de las HDL, dos moléculas de apo A-I se unen alrededor de un núcleo hidrofóbico con estructura de bicapa fosfolipídica, adquiriendo la estructura discoidal o también llamada cinturón (28). Las HDL nacientes van adquiriendo lípidos a través del eflujo del colesterol celular y de la lipólisis de las lipoproteínas ricas en TG. Estas HDL nacientes se encuentran en muy baja concentración en el plasma, tan solo un 5%, ya que rápidamente se transforman a maduras (29).

La masa lipídica de las HDL proviene, principalmente, de tejidos periféricos, aunque los mecanismos mediante los cuales se produce la lipidación no se conocen en su totalidad. El

proceso de maduración de la HDL se realiza por diferentes vías. Una parte importante de las HDL nacientes maduran gracias a la lipólisis de partículas ricas en TG, principalmente VLDL y QM. La LPL actúa sobre estas partículas liberando lípidos superficiales, FL y CL. Los productos liberados se unen a las HDL nacientes. Las HDL nacientes también intercambian lípidos con las HDL maduras en un proceso de remodelado mediante la acción de la LH, la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína transferidora de FL (PLTP). Los FL derivados de las VLDL y los QM se transfieren a las HDL a través de la PLTP, pero, para la maduración total de la partícula es necesario que el CL se esterifique y formen el núcleo hidrofóbico característico. El colesterol internalizado en la partícula de HDL es esterificado por la enzima LCAT que cataliza la transferencia de grupos 2- acilo de la lecitina al CL (30).

**Figura 7: Síntesis y maduración de las partículas de HDL**



Adaptada de Rader y cols (26).

El riñón, el hígado y los tejidos esteroideogénicos son los principales sitios implicados en el catabolismo de las HDL. La eliminación de las HDL puede llevarse a cabo bien por captación selectiva de colesterol u otros lípidos de la partícula, o bien por endocitosis y degradación de toda la partícula.

El colesterol transportado por la HDL se retira principalmente en hígado por medio del receptor Scavenger SR-BI (31). Este receptor es capaz de captar selectivamente colesterol, tanto libre como esterificado, pero no apoB (26). Estudios realizados con este receptor en hepatocitos

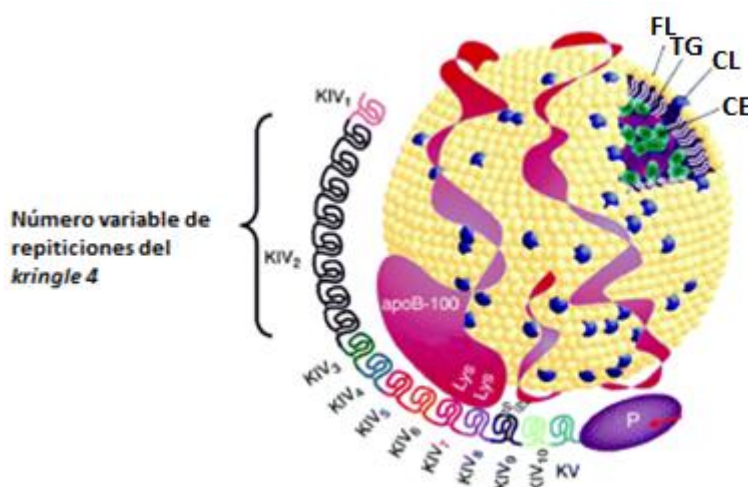
polarizados, sugieren que SR-BI participa en la internalización de las partículas completas de HDL, la eliminación del colesterol y secreción de partículas HDL delipidadas (32).

Otro mecanismo clave en la eliminación del colesterol transportado por la HDL es el catalizado por la CETP (33). Esta enzima cataliza el intercambio de TG desde las LDL, y VLDL por el CE de la HDL, resultando un empobrecimiento de CE y un enriquecimiento en TG de la partícula HDL, disminuyendo así el tamaño de la partícula.

#### 1.2.5 METABOLISMO DE LA LIPOPROTEÍNA (a)

La partícula de lipoproteína (a), Lp (a), detectada por primera vez por Berg en 1963, es un complejo macromolecular esférico con un diámetro de aproximadamente 25 nm y una densidad que oscila entre 1,05 y 1,12 g/ml. La estructura de Lp (a) es similar a la de las LDL, con respecto al tamaño y la composición lipídica de las partículas y la presencia de apo-B100. La mayor diferencia estructural entre ambos es que, además de apo B, la Lp (a) tiene una segunda proteína, la apolipoproteína (a) [apo (a)], que se une a apo B-100 a través de interacciones no covalentes y un único puente disulfuro (34).

**Figura 8: Estructura de la lipoproteína a**



Adaptada de Li Y y cols (35). Abreviaturas anteriormente no descritas y que aplican en la figura: Kringle IV (KIV), *Kringle V* (KV).

La apo (a) es una proteína de peso molecular variable, desde 400 a 800 kDa, constituida por un número variable de aminoácidos (3.600 a 7.200), que forman una larga cadena, con un dominio de serin-proteasa en su región terminal, y homóloga en un 94% a la molécula de plasminógeno; el resto de la cadena de aminoácidos está organizada en regiones o unidades de 78 aminoácidos cada una, denominadas *kringles*. El primer *kringle* es semejante al *kringle 5* del plasminógeno y se continúa con múltiples copias del *kringle 4* de la molécula del plasminógeno, con quien

comparte una homología del 60 al 75% (36). El número de repeticiones de *kringle 4* está genéticamente determinado, oscilando entre 12 y 51 veces, lo que da como resultado 34 isoformas de apo (a) diferentes (37).

A pesar de las similitudes estructurales entre la Lp(a) y la LDL, la síntesis y el metabolismo de Lp(a) no se ha dilucidado completamente, pero se sabe que son totalmente independientes de la síntesis y metabolismo de las LDL. Los estudios *in vitro* han demostrado que la síntesis de apo (a) tiene lugar en los hepatocitos y su asociación con la apo B-100 ocurre en la superficie celular; por lo que el hígado se ha descrito como el principal sitio de síntesis de Lp(a). Al contrario que la LDL, la Lp(a) no se deriva del catabolismo de otra lipoproteína (34).

La captación celular de Lp(a) no está bien establecida, aunque varios estudios han demostrado que la Lp(a) se une a receptores específicos de LDL, pero con menor afinidad. Sin embargo, cuando la apo (a) se disocia de la Lp(a), por la escisión de los puentes disulfuro, la capacidad de unión de la lipoproteína aumenta, llegando a ser equivalente a la de las LDL (34). A pesar de estas evidencias que señalan al rLDL como una vía de eliminación importante para la Lp(a), el uso de anticuerpos monoclonales anti-PCSK9, con los que se han observado reducciones del más del 50% de la concentración de cLDL, no consiguieron reducciones similares de Lp(a) plasmática, estableciendo que el papel del rLDL en el catabolismo de la Lp(a) podría ser reducido. Además, en individuos con hipertrigliceridemia (HTG), la Lp(a) se encuentra reducida, probablemente debido a un aumento del aclaramiento plasmático (38).

Las concentraciones plasmáticas de Lp (a) tienen un carácter hereditario, con una gran variación interindividual, no se ve alterada por factores ambientales y tiende a permanecer constante durante toda la vida. En la población general, las concentraciones de Lp (a) pueden oscilar entre <1 mg/dL y > 1,000 mg/dL. El gen que codifica la apo a, *LPA*, presenta una homología del 70% con el gen del plasminógeno humano. El gen *LPA* se caracteriza por múltiples variantes diferentes presentes en el *kringle 4*. Se cree que el gen *LPA* podría ser el responsable del 91% de la variación en la concentración de Lp (a). De esa variación, el 69% se debería a la cantidad de repeticiones del *kringle 4* (34).

Un gran número de trabajos han confirmado la asociación de valores elevados de Lp(a) con la cardiopatía coronaria debido de la acción de la Lp (a) en el desarrollo de la aterogénesis (39,40). La participación de Lp(a) en la aterogénesis podría ser multifacética con implicación en la agregación plaquetaria, reducción en la fibrinólisis, inducción de la expresión de moléculas de adhesión, remodelación vascular mediante cambios en la capacidad proliferativa, transporte de

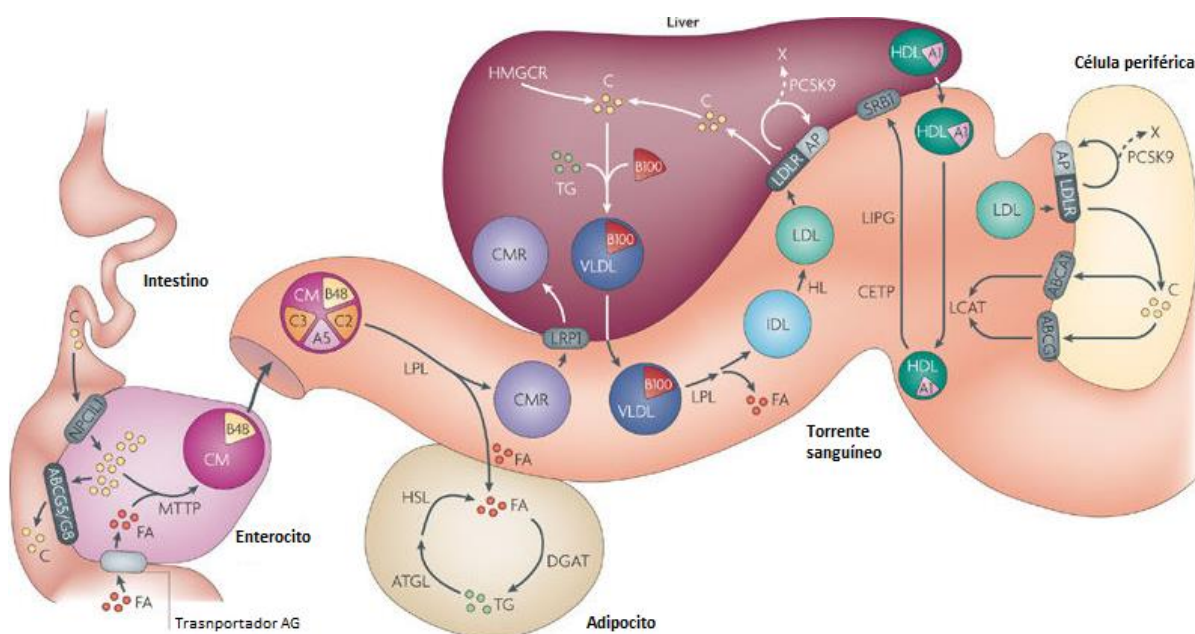
lípidos oxidados y migración de células endoteliales y células musculares lisas residentes, modificación oxidativa y formación de células espumosas (41).

### 1.2.6 ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO LIPÍDICO

En la figura 9 se representa el metabolismo de las lipoproteínas en función de los procesos de síntesis, maduración y el catabolismo que tienen lugar. El hígado y el intestino constituyen las fuentes principales de las partículas nacientes de todas las lipoproteínas.

A nivel intestinal, se produce la absorción de colesterol proveniente de la dieta, por medio de la proteína Niemann-Pick C1-like-1 (NPC1L1). Parte de este colesterol será de nuevo enviado a luz intestinal por medio del transportador reverso de colesterol, transportador dependiente de unión de G5 y transportador dependiente de unión de G8 (ABCG5/G8). El colesterol disponible por el enterocito será empaquetado en QM nacientes tras la adición de ácidos grasos libres y de apo B-48. Los QM nacientes se transforman en lipoproteínas maduras en el torrente sanguíneo y serán sustrato de la LPL, que hidrolizará los TG, liberando AGL al medio, que será captados principalmente por el tejido adiposo. En este proceso, también se liberarán colesterol y apos de los QM que serán incorporados a las HDL y los QM<sub>r</sub> serán recogidos por los receptores hepáticos LRP1, siendo así eliminados del torrente sanguíneo.

**Figura 9. Representación global del metabolismo de las lipoproteínas**



Adaptada de Hegele y cols (3). Abreviaturas anteriormente no descritas y que aplican en la figura: ácido graso (FA), Lipasa sensible a hormona (HLS), proteína adaptadora (AP), colesterol (C), lipasa adiposa de TG (ATGL), receptor scavenger clase B tipo 1(SRB1).

A nivel hepático, se produce la síntesis de colesterol endógeno, por medio de la HMG-CoA reductasa, y este será empaquetado junto con TG y apo-B100 en VLDL. Las VLDL saldrán al torrente sanguíneo, liberando los TG por acción de la LPL, convirtiéndose así en IDL, que serán reconocidas por receptores hepáticos para eliminarlas o transformadas a LDL por medio de la LH. Las LDL serán eliminadas de la circulación, tras ser reconocidas por el rLDL, localizado en el hígado o los tejidos periféricos. Por último, las HDL que han ido recogiendo colesterol de las membranas tisulares y otras lipoproteínas circulantes terminarán siendo reconocidas por el receptor hepático SRB1 y serán degradadas y eliminadas por vía biliar y riñón.

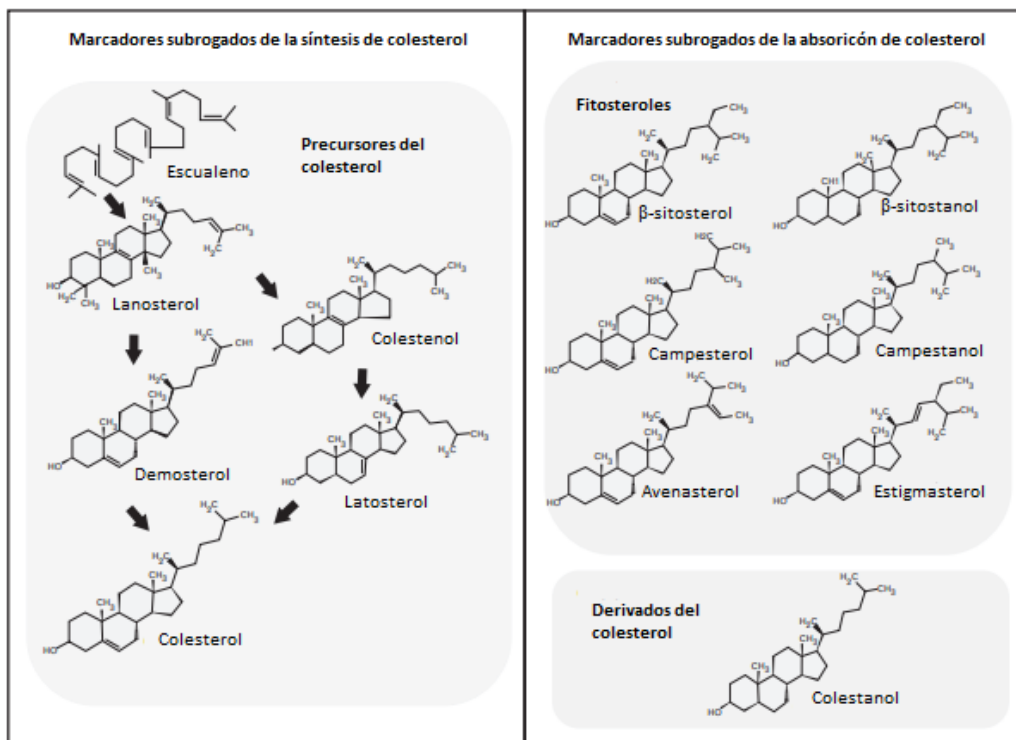
### 1.3 ESTEROLES NO COLESTEROL

Los esteroides son un grupo de moléculas que aparecen de forma natural en el reino animal y vegetal. El esteroide de origen animal más conocido es el colesterol y los esteroides vegetales, también llamados fitoesteroides, más comunes son el  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol. Todos los esteroides comparten una estructura química similar, un ciclopentanofenotreno tetracíclico con una cadena lateral de iso-octilo en el carbono 17 y un grupo hidroxilo en el carbono 3. La diferencia entre unos y otros radica en la adición de un grupo metilo, etilo o hidroxilo extra en la cadena lateral (42). La estructura molecular contiene un doble enlace que al ser hidrolizado formará moléculas insaturadas llamadas estanoles, en el caso de los esteroides de origen vegetal. Por lo tanto, los fitoestanoles se forman a partir de los fitoesteroides y el 5 $\alpha$ -colestanol a partir del colesterol.

Otros esteroides son los precursores de la síntesis de colesterol. Los principales son el demosterol, el lanosterol y el latosterol. Estos precursores se encuentran en suero humano en una proporción mucho menor que el colesterol. Los esteroides no colesterol también incluyen las formas oxidadas del colesterol, como el 24S-hidroxicolesterol, el 27S-hidroxicolesterol y el 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, que se forman durante la conversión hepática de colesterol a ácidos biliares y el 5 $\alpha$ -colestanol, un metabolito del colesterol que se produce directamente por la oxidación de colesterol. La estructura molecular de los diferentes esteroides se presenta en la figura 10.

El colesterol constituye el 95% de los esteroides de la bilis, siendo el 5% restante precursores de colesterol y esteroides de origen vegetal (5). Los esteroides vegetales (fitoesteroides) se sintetizan en plantas, donde tienen la misma importancia biológica que el colesterol en los animales. Los más abundantes en el ser humano son el  $\beta$ -sitosterol y el campesterol, que se obtienen por medio de la dieta en cantidades que varían desde los 150 a 450 mg/día (43).

Figura 10. Estructuras moleculares de los principales esteroides



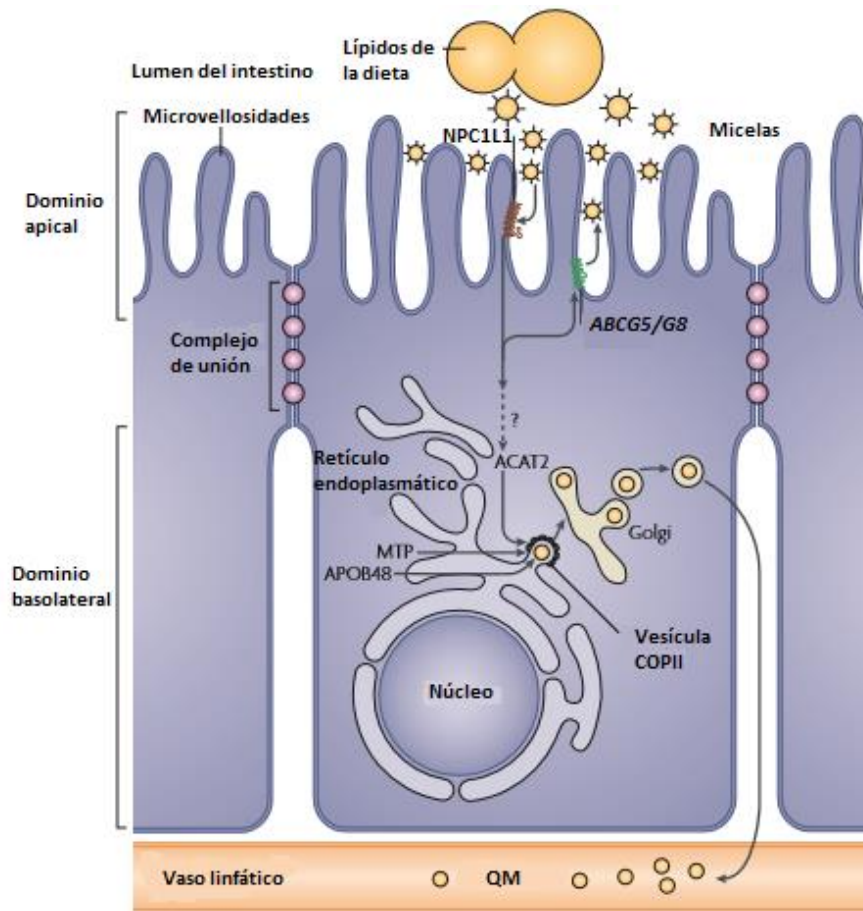
Adaptada de Mackay y cols (42).

Los fitoesteroides y fitoesteranos comparten el mismo mecanismo de absorción intestinal y secreción que el colesterol (Figura 11). La concentración de plasmática de fitoesteroides es muy baja, ya que su absorción a nivel intestinal es muy pobre. La eficacia de absorción del sitosterol es el 4%, la del campesterol un 10%, la estigmasterol un 5% y la del sitostanol es prácticamente nula. Estos porcentajes difieren mucho de la absorción de colesterol, que llega al 30-70%. Los fitoesteroides y fitoesteranos compiten con el colesterol en su absorción, donde han demostrado ejercer un efecto inhibitorio en la absorción intestinal de colesterol. Esto se debe a que los fitoesteroides son moléculas más hidrófobas que el colesterol y lo desplazan eficazmente de las micelas mixtas, generando su precipitación con otros esteroides vegetales no solubilizados. La mayor parte de los fitoesteroides que entran en el enterocito son bombeados rápidamente de nuevo a la luz intestinal por medio del transportador ABCG5/G8, que limita su absorción intestinal y promueven su excreción a través de la bilis. La combinación de la escasa absorción y la secreción efectiva por la bilis, son los mecanismos responsables de la baja concentración plasmática de estos esteroides, que es 100 veces menor a la del colesterol. El incremento de la ingesta de fitoesteroides en forma de suplementos, es una medida efectiva para la reducción de



la concentración plasmática de CT y colesterol LDL (cLDL) (44). Al disminuir el colesterol intestinal que llega a través del hígado mediante los QM remanentes se reduce el contenido hepático de colesterol y TG (45). Disminuye así la disponibilidad de colesterol para su incorporación a partículas VLDL, incrementando además la expresión del gen encargado de la síntesis del rLDL (*LDLR*). Por lo tanto, disminuye la absorción intestinal de colesterol procedente de la dieta como de la bilis y aumenta su excreción por las heces.

**Figura 11: Tráfico de colesterol a nivel de los enterocitos**



Adaptada de Ikonen y cols (46). La solubilización micelar de los esteroides de la dieta por acción de los ácidos biliares les permite moverse a través de la barrera de difusión que recubre la superficie luminal de los enterocitos. La proteína NPC1L1, marcada en rojo, se localiza en la membrana apical de los enterocitos y facilita la absorción de colesterol a través de la membrana del borde en cepillo. Esta absorción puede bloquearse por medio del fármaco ezetimibe. En contra partida a NPC1L1, el transportador ABCG5/G8 promueve la transferencia activa de colesterol y esteroides vegetales a luz intestinal para su excreción por heces. La isoforma 2 de la acil CoA colesterol aciltransferasa (ACAT2) esterifica el colesterol absorbido que se incorpora a los QM nacientes. Los QM se sintetizan alrededor de la apolipoproteína apo B-48 en el retículo endoplasmático. Los AG de la dieta se usan para la síntesis de TG en el retículo endoplasmático por medio de la acción de la MTP, que transfiere los TG y ésteres de colesterol a la apo B-48. Los QM

nacientes abandonan el retículo endoplasmático en vesículas recubiertas de COPII y se secretan a través del complejo de Golgi hasta el lado basolateral del enterocito y alcanzan la circulación venosa.

## 2. TRASTORNOS DEL METABOLISMO LIPÍDICO

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en los países desarrollados y se considera que seguirá siendo en el futuro. La Organización Mundial de la Salud registró que en el año 2012 murieron por esta causa 17,5 millones de personas, representando un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. Se calcula que en 2030 morirán cerca de 23,3 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías e ictus y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte (47).

Una de las principales causas de las enfermedades cardiovasculares es la alteración del metabolismo lipídico, produciendo acumulación de lípidos a nivel arterial y la formación de placa de ateroma, causantes de cardiopatía isquémica y otros accidentes cardiovasculares (4).

Las dislipemias son un conjunto de patologías caracterizadas por alteraciones en las concentraciones lipídicas plasmáticas. Es un término genérico para denominar cualquier situación clínica en la cual existan concentraciones anormales de CT, colesterol HDL (cHDL), cLDL o TG (4). Cuando estos trastornos se acompañan de un trastorno de las vías metabólicas se denominan hiperlipoproteinemias.

Frederickson y Lees realizaron una clasificación de las hiperlipoproteinemias dividiéndolas en 6 tipos, en función del tipo de partículas lipoproteínas que se acumulan en sangre (48). En la tabla 2, se muestra un resumen de las principales hiperlipoproteinemias, de acuerdo al fenotipo y mostrando las principales características clínicas, que son explicadas a continuación.

Tabla 2. Clasificación de Fredrickson v Lees de las dislipemias primarias

Fenotipo	I	Ila	Ilb	III	IV
Lipoproteína aumentada	QMI	LDL	LDL y VLDL	QMI y VLDLr	VLDL
TG	++++	-	++	++/+++	++
CT	+ / ++	+++	++ / +++	+++ / ++++	- / +
cLDL	0	+++	++	0	0
chDL	+++	+	++	++	++
Aspecto del plasma	Latescente	Claro	Claro	Turbio	Turbio
Xantomas	Eruptivos	Tuberosos, tendones	-	Tuberoeruptivos, palmares	-
Pancreatitis	+++	0	0	0	0
Aterosclerosis coronaria	0	+++	+++	+++	+ / -
Defectos genéticos	<i>LP<sub>I</sub>, LMF1, APOC2, APOA5, GPIIIBP1</i>	<i>LDLR, APOB, PCSK9, LDLRAP1, APOE, ABCG5/8</i>	Desconocido	<i>APOE</i>	<i>LP<sub>I</sub>, LMF1, APOC2, APOA5, GPIIIBP1</i>
Nomenclatura	Síndrome de Hiperquilomicronemia	Hipercolesterolemia familiar	Hipercolesterolemia familiar combinada	Disbetalipoproteinemia familiar	Hipertrigliceridemia esporádica

Adaptada de Fredrickson y cols (48). Abreviaturas no descritas anteriormente: proteína adaptadora de rLDL (LDLRAP1).

## 2.1 HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

La hipercolesterolemia familiar (HF) es un trastorno autosómico dominante caracterizado por concentraciones plasmáticas muy elevadas de colesterol unido a partículas de cLDL, xantomas tendinosos y elevado riesgo de ECV (22). Tradicionalmente, la HF ha sido descrita como una enfermedad monogénica, con transmisión autosómica dominante, con una prevalencia estimada en población general de 1:500 en sujetos heterocigotos y 1:1.000.000 para sujetos homocigotos (22). Sin embargo, estudios recientes como el proyecto *Copenhagen General Population Study* (49) han demostrado que esta prevalencia es superior a la estimada, llegando a 1:217 en sujetos heterocigotos en población general. Esta prevalencia puede llegar a 1:70 sujetos, en poblaciones con efecto de gen fundador, como la población *Afrikaners* de Sudáfrica (50). De igual modo, la prevalencia de sujetos homocigotos en HF se ha comprobado superior a la estimada tradicionalmente, llegando a 1: 450.000 en población española (51) y hasta 1:300.000 en población mundial (52).

La mayor parte de los casos de HF están causados por mutaciones en el gen *LDLR*, seguidos de mutaciones en el gen que codifica la apo B (*APOB*), que es el ligando de las LDL, para el rLDL; o en el gen *PCSK9*, que codifica una serin-proteasa que regula el reciclado intercelular del rLDL (53–56). En el caso de mutaciones en el gen *APOB*, la HF se denomina apo B-100 defectuosa familiar, un trastorno poco frecuente, ya que junto los casos de HF causados por mutaciones en *PCSK9* no superan el 10% de los casos HF (57). Recientemente, se han descrito nuevas causas que podrían explicar el fenotipo de HF en sujetos sin mutación en los genes candidatos, como sería la mutación p.(Leu167del) del gen de *APOE* y mutaciones en el gen que codifica la proteína transductora de señales 1 (*STAP1*) (58,59).

Los sujetos afectos de HF con mutaciones en heterocigosidad presentan concentraciones de cLDL por encima del percentil 95 de la población, ajustado por edad y sexo. Así, las concentraciones en la edad adulta en sujetos heterocigotos varían entre 250 a 400 mg/dL, llegando a valores por encima de 600 mg/dL en sujetos homocigotos ya desde la infancia (60,61). Todos estos individuos presentan un exceso de partículas LDL circulantes, debido a que tienen un catabolismo disminuido, sin embargo, las características de las partículas LDL en la HF no difieren de las normales (62). La concentración de TG suele ser normal o ligeramente elevada, al igual que las concentraciones de cHDL. La deposición de colesterol en compartimentos extravasculares se produce generalmente a dos niveles: en tendones y la piel, generando los xantomas; y a nivel de córnea, generando el denominado arco corneal. La presencia de xantomas tendinosos es frecuente en sujetos heterocigotos mayores de 40 años, mientras que, en lo sujetos homocigotos, estos xantomas aparecen en la primera década de vida. La

localización habitual de los xantomas es el tendón de Aquiles, pero también son frecuentes en codos y extensores de los dedos de la mano (63). El arco corneal en la primera década es otro depósito lipídico superficial característico de la HF, que al igual que los xantomas, está incluido como criterio diagnóstico (62).

La enfermedad coronaria es el problema clínico fundamental de la HF. Tanto es así, que algunos estudios han postulado que aproximadamente el 85% de los varones y el 50% de las mujeres con HF sufrirán un ECV antes de los 65 años, si no son tratados farmacológicamente (57,61). La incidencia de arteriosclerosis y por ende de ECV en pacientes con HF homocigota es todavía mayor, ya que estos pacientes generalmente presentan arteriosclerosis, enfermedad de la válvula aórtica y ECV antes de los 20 años si no reciben tratamiento farmacológico. La exposición de por vida a una hipercolesterolemia grave es la responsable del daño del endotelio vascular, arteriosclerosis acelerada, enfermedad arterial periférica y enfermedad valvular que experimentan estos pacientes (51). A pesar de que el diagnóstico de HF conlleva un riesgo cardiovascular elevado por sí solo, debe de realizarse una valoración del paciente que incluya la presencia de otros factores de riesgo adicionales, como la diabetes mellitus (DM), hipertensión, hábito tabáquico, obesidad o concentraciones elevadas de Lp (a) (61,62,64). Aunque gracias a la terapia preventiva farmacológica se han conseguido una reducción de la mortalidad por ECV del 37% en los sujetos HF, la prevalencia de ECV en estos sujetos sigue siendo 4 veces superior a la media de la población general (65). Por ello, la estratificación del riesgo es esencial para el correcto manejo terapéutico y la determinación del tratamiento farmacológico, aunque el tratamiento precoz e intensivo se ha demostrado beneficioso en esta población (52). Un nivel de cLDL < 100 mg/dL o conseguir reducciones del 50%, sería el objetivo terapéutico, siendo las estatinas el grupo farmacológico de elección. En la última década se han desarrollado nuevos fármacos, como los inhibidores de PCSK9, que consiguen reducciones de las concentraciones de cLDL por encima del 50%, regulando la vida media del rLDL. Estos nuevos fármacos responde a la necesidad de terapias más agresivas o alternativas a las estatinas, ya que se sabe que sólo el 20% de los pacientes HF alcanzan objetivos terapéuticos de cLDL con estatinas únicamente (66).

El diagnóstico clínico de la HF se basa en criterios clínicos, bioquímicos y genéticos. Estos incluyen: historia personal y familiar de hipercolesterolemia grave o de ECV precoz, arco corneal o xantomas tendinosos; y presencia de una mutación funcional en los genes candidatos (67). Sin embargo, no todos los criterios diagnósticos están siempre presentes en todos los pacientes, por lo que se han establecido diferentes índices diagnósticos basados en diversos aspectos clínicos. Los algoritmos más frecuentes utilizados son el elaborado por la red de Unidades de Lípidos de Holanda, el índice de MedPed y el de Simon Broome que estratifican la posibilidad de

presencia de HF en un individuo (68–70). La presencia de mutaciones funcionales en los genes candidatos confirman el diagnóstico de HF de forma definitiva. Sin embargo, estas mutaciones sólo son detectadas en el 20-30% de pacientes clínicamente diagnosticados como HF posibles y entre el 60-80% de pacientes con diagnóstico clínico de HF definitiva (71). Lo que plantea la hipótesis de la existencia de nuevos *loci*, todavía pendientes de descubrir, implicados en la etiología de la HF o bien la combinación de formas oligogénicas en las que un número de variantes de cambio de aminoácido o *single nucleotide variant* (SNV) de diferentes genes, que por si solas tienen efectos discretos sobre el colesterol plasmático, pero que pueden provocar un efecto aditivo si se transmiten de forma conjunta (57,71,72).

## **2.2 HIPERCOLESTEROLEMIA POLIGÉNICA**

La hipercolesterolemia poligénica (HP) es el resultado de la acumulación de múltiples defectos genéticos que en su mayor parte, no han sido identificados todavía, con un patrón de herencia aditivo (72). En este trastorno, los antecedentes familiares no son tan claros como en la HF y tampoco se dan las manifestaciones clínicas típicas de la HF, como la presencia de xantomas tendinosos (61). Los sujetos con HP presentan un fenotipo IIa (véase la tabla 2), aunque con concentraciones de cLDL inferiores a las formas monogénicas u oligogénicas. Sin embargo, el riesgo de sufrir un ECV es igualmente elevado y por ello el manejo terapéutico es similar al de la HF heterocigota. La intervención dietética, el control o eliminación de otros factores de riesgo junto con el tratamiento hipolipemiante se encuentran dentro del manejo terapéutico de elección (61,62,72).

## **2.3 HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA**

La hiperlipemia familiar combinada (HFC) fue descrita por primera vez como un trastorno del metabolismo lipídico autosómico dominante en 1973 por Goldstein y Brown (73). Estudios posteriores han evidenciado, sin embargo, que se trata de un modelo hereditario multigénico, con una acumulación de SNV pertenecientes a diferentes genes asociados con CT, TG, cLDL, HDL e Índice de Masa Corporal (IMC) entre otros. Estos SNVs generan efectos pequeños e independientes que implican un aumento de las concentraciones de lipídicos y una fuerte asociación con factores ambientales fundamentales para el desarrollo de este fenotipo (74). Todo ello explicaría la variabilidad del fenotipo lipídico dentro de la HFC (habitualmente del tipo IIb según la clasificación de Frederickson y Lev, véase la Tabla 2). Esta susceptibilidad genética tiende a acumularse en determinadas familias, aunque la transmisión no se produce de forma mendeliana. Esto explicaría porque algunos familiares sólo presentan algunos patrones del

fenotipo HFC, con niveles elevados de cLDL, TG y disminución de cHDL de forma aislada o en combinación.

La HFC es un desorden lipídico muy común dentro de los trastornos lipídicos hereditarios, con una prevalencia estimada entre el 1-2% en población general, ascendiendo al 10-20% en pacientes que han sufrido un episodio de infarto agudo de miocardio (75). Esta hiperlipemia se caracteriza por concentraciones elevadas de CT y/o TG (por encima del percentil 95 en población general ajustado por edad y sexo) en plasma y suele cursar con niveles bajos de cHDL. Estas alteraciones lipídicas se acompañan generalmente de una alta concentración de apo B (>120 mg/dL), una sobre producción hepáticas de partículas pequeñas de VLDL y un aumento de partículas pequeñas y densas de LDL, ambas especialmente aterogénicas (76). Los antecedentes familiares de primer grado de dislipemia y de ECV prematura son igualmente criterios fundamentales para su diagnóstico (75,77). La HFC se ha asociado directamente con al menos 35 genes diferentes, entre ellos genes relacionados con desórdenes metabólicos como la obesidad, la resistencia periférica a la insulina, la DM tipo 2, la hipertensión y el síndrome metabólico (78–80).

Los sujetos con HFC sufren una alta predisposición a desarrollar ECV ateromatosa prematura (81). De hecho, la prevalencia de ECV en pacientes con HFC menores de 60 años se estima superior al 15% (82). Sin embargo, el incremento de riesgo cardiovascular está influido por la variabilidad fenotípica y por la presencia de otros factores de riesgo no lipídicos, como el síndrome metabólico, la hipertensión o la DM tipo 2 (83). Algunos estudios, sugieren que el riesgo cardiovascular del paciente HFC es equivalente al paciente HF, y esta similitud puede deberse a la mayor prevalencia, en sujetos HFC, de otros factores de riesgo no lipídicos (83). En esta misma línea, algunos autores han demostrado que la presencia de HFC es un factor de riesgo independiente de incremento del grosor de la íntima media de la carótida (84). Por ello, se ha propuesto para optimizar el manejo clínico, que los pacientes con HFC sean considerados como pacientes de muy alto riesgo cardiovascular. Este aspecto es fundamental en la práctica clínica, que incluye una intervención dietética sobre los hábitos de vida, tratamiento hipolipemiante y el tratamiento de los trastornos metabólicos asociados como la obesidad, hipertensión arterial, DM, hábito tabáquico o síndrome metabólico.

#### **2.4 HIPERTRIGLICERIDEMIA ESPORÁDICA**

Este trastorno lipídico es también conocido como HTG tipo IV o HTG simple (Tabla 2). La HTG está definida como la concentración de TG en plasma en ayunas, sin tratamiento previo, por encima del percentil 90 ajustado por sexo y edad en la población (3.0 mmol/l en adultos de edad



media) (85). El incremento de la concentración de TG es debido a un aumento aislado de las VLDL, resultado de una sobreproducción o una eliminación disminuida de estas partículas, que pueden acompañarse o no de QM elevados. Se estima que el 5-10% de la población presenta HTG tipo IV, cuyo desarrollo es el resultado de la presencia de un grupo heterogéneo de mecanismos responsables del incremento de VLDL (11).

La HTG tipo IV se diagnostican en adultos, con un rango de TG entre 200 y 900 mg/dL y suele cursar con concentraciones bajas de cHDL. Los pacientes con HTG presentan un cuadro que puede cursar con xantomas palmares, hepatoesplenomegalia, pancreatitis lipémica, así como la formación de placas de ateroma que suponen un aumento del riesgo de padecer un evento cardiovascular. Como se ha comentado con anterioridad, estos pacientes presentan elevadas concentraciones de VLDL plasmáticas, que además tienen un tamaño mayor de los normales y mayores que las que caracterizan la HFC, y se asocian a partículas HDL ricas a TG, lo que probablemente favorezca que den lugar a una menor concentración de cHDL, con niveles normales de apo A1 (86). Una moderada HTG es factor de riesgo independiente para enfermedades arterioescleróticas, particularmente para un evento cardíaco prematuro (ECP) (87,88). Un estudio con cientos de sujetos seguidos durante más de 10 años, muestran que un incremento de 1 mmol/l en los niveles de TG plasmáticos incrementan el riesgo de un ECP del 32% al 76%, incluso después de ajustar el c-HDL (89). Más recientemente, se ha confirmado que concentraciones en plasma de TG en ayunas tienen una fuerte asociación con el riesgo de ECP (90,91). Complejos mecanismos subyacen la asociación TG- arterioesclerosis, ya que existen anomalías metabólicas, como la obesidad, la DM tipo 2, niveles de c-HDL bajos, concentraciones elevadas de LDL, altos niveles de AGL, la hiperinsulinemia y el incremento de la viscosidad plasmática que pueden estar asociadas con niveles altos de TG. Sin embargo, se ha demostrado que las lipoproteínas ricas en TG (QM y VLDL) y sus remanentes pueden contribuir directamente a la formación de la placa de ateroma (92).

Factores ambientales como el consumo de alcohol, de hidratos de carbono simples, la obesidad y la resistencia a la insulina contribuyen tanto al desarrollo de la HTG como su exacerbación. La HTG desencadenada a raíz de factores ambientales, es conocida como HTG secundaria, y puede deberse a otras anomalías como la diabetes mal controlada, el consumo de alcohol, el hipotiroidismo, la enfermedad renal o una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. La obesidad, en particular la troncular, está asociada con un incremento de los niveles de TG, una disminución de los niveles de c-HDL, y resistencia a la insulina, siendo éste el mayor factor que puede contribuir a la dislipemia asociada con la DM tipo 2 (93). Por todo lo anteriormente expuesto, el tratamiento de primera línea en este trastorno son las medidas

dietéticas, principalmente la reducción del consumo de alcohol y de azúcares simples, además de la pérdida de peso en el caso que coexista sobrepeso u obesidad. A estas medidas se le sumará el tratamiento farmacológico en casos de que persistan los niveles de TG por encima de 500 mg/dL tras la adherencia al tratamiento dietético (94).

### **2.5 HIPERTRIGLICERIDEMIA FAMILIAR**

Como se ha expuesto anteriormente, la HTG constituye un trastorno con un aumento de las partículas VLDL, y en ocasiones también de QM, que se observa a las 12-14 horas de ayuno. Su prevalencia es de 1 de cada 600 sujetos y suele aparecer en la edad adulta, al contrario que el hiperquilomicronemia familiar. Se caracteriza por un patrón hereditario variable en el que los factores ambientales o las alteraciones hormonales juegan un papel importante en su desarrollo (85)

Su base molecular aún es desconocida, en gran parte debido a su componente poligénico y la necesidad de la presencia factores secundarios para su expresión (95). En esta línea, estudios previos han demostrado que la asociación entre factores ambientales junto con variantes raras y comunes en múltiples genes pueden determinar colectivamente las concentraciones de TG (91). Estos hallazgos fueron confirmados y ampliados por Teslovich y colaboradores, en un metaanálisis del *Global Lipids Genetics Consortium* con más de 100.000 sujetos de diferentes etnias, donde identificaron 32 *loci* que albergan variantes comunes que contribuyen a las variaciones de TG plasmáticas (96).

La HTG familiar en ocasiones se presenta como hiperlipoproteinemia tipo V, que se caracteriza por niveles de TG plasmáticos por encima de los 1000 mg/dL, con un aumento de las partículas VLDL que en ocasiones cursa con un incremento de los niveles de colesterol. Normalmente los pacientes son asintomáticos, pero dependiendo del grado de HTG, pueden presentar características clínicas de hiperquilomicronemia, como xantomas eruptivos, lipemia retinalis, hepatomegalia, síntomas focales neurológicos, dolor recurrente epigástrico y episodios de pancreatitis. Los sujetos con este desorden lipídico pueden presentar un característico suero turbio y con un sobrenadante de aspecto cremoso, tras dejarlo reposar (85,95). El manejo terapéutico de estas HTG es similar a la HTG esporádica, siendo las medidas higiénico-dietéticas el pilar clave (94).

### **2.6 SÍNDROME DE QUILOMICRONEMIA FAMILIAR**

El síndrome de quilomicronemia familiar o hiperlipoproteinemia tipo I es un trastorno lipídico monogénico que se caracteriza por el mantenimiento de niveles muy elevados de QM tras 12-24h de ayuno. La hiperquilomicronemia tiene una frecuencia en la población menor a 1:10<sup>6</sup> suele

aparecer en la infancia o adolescencia y se caracteriza por niveles de TG de 1000-10000 mg/dl debidos a la deficiencia en la actividad de la LpL o a su cofactor apo C-II (97). Mutaciones en al menos 5 genes diferentes (*LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1* y *LMF1*) se han identificado como causantes de quilomicronemia familiar. Actualmente, se conocen más de 80 variantes disfuncionales en el gen *LPL* que producen la reducción o eliminación de la actividad LpL, resultando en la acumulación de lipoproteínas ricas en TG (98). Mutaciones en homocigosis en *APOC2* pueden generar un fenotipo similar, ya que codifica para la apo C-II, un cofactor clave para la LpL. Variaciones en homocigosis que se han demostrado disfuncionales para el gen *APOC2* son causantes de modificaciones en la actividad de LpL en plasma (97). A pesar de ello, en torno al 30% de los sujetos con quilomicronemia no presenta mutación en ninguno de estos genes, por lo que otros genes podrían estar implicados en la etiopatogenia de la enfermedad.

Las manifestaciones clínicas de la quilomicronemia dependen del grado de elevación de la concentración de TG. Los niveles de TG oscilan entre 1000 y 10000 mg/dL, debido a la alta capacidad que tienen los QM de albergar TG en su interior. El resto del perfil lipídico también se encuentra alterado en estos pacientes, con elevaciones ligeras de CT y niveles bajos de cHDL y cLDL, presentando un plasma turbio y lechoso, con un sobrenadante de aspecto cremoso, muy característico (75,95). Este trastorno suele aparecer en la infancia o adolescencia y suele ir acompañada de alteraciones cutáneas y oculares, como xantomas eruptivos en superficies extensoras y nalgas, lipemia retinal, hepatoesplenomegalia, dolor recurrente abdominal, náuseas y vómitos así como pancreatitis recurrente (85). Los sujetos con hiperquilomicronemia presentan un riesgo aumentado de presentar pancreatitis recurrentes, principalmente cuando los TG superan los 1000 mg/dL, y más aún cuando estas cifras superan los 2000 mg/dL (99).

Se ha asociado un aumento del riesgo cardiovascular en sujetos con quilomicronemia familiar. Sin embargo, Benlian y colaboradores demostraron ya hace dos décadas que los sujetos con quilomicronemia familiar a los que practicaron autopsia no presentaban lesiones arterioscleróticas significativas (100). Los autores proponen que los niveles bajos de cLDL combinados con QM de gran tamaño, que presentarían dificultad para penetrar el endotelio, podrían explicar la ausencia de la arteriosclerosis en estos sujetos. Por el contrario, otros estudios han indicado el aumento de desarrollo de aterosclerosis prematura en estos sujetos, proponiendo los QMr o las bajas concentraciones de cHDL como potenciales causantes de los mecanismos aterogénicos.

El manejo terapéutico de la quilomicronemia familiar sigue los principios generales del tratamiento de la HTG. Esto incluye la intervención del estilo de vida como base principal, el control de los factores secundarios que coexistan y el tratamiento farmacológico. Los niveles

tan elevados de TG que presentan estos pacientes hacen que en ocasiones los fármacos sean insuficientes, para evitar las pancreatitis recurrentes que presentan estos individuos. Por lo que la intervención dietética, que comprende consumos de grasa por debajo del 15% de la ingesta calórica diaria, consumo de AG de cadena corta, restricción del consumo de alcohol y de azúcares simples son las medidas dietéticas esenciales en el manejo terapéutico de los pacientes con hiperquilomicronemia (101). Algunos autores han reportado que casos en los que la plasmaféresis podría ayudar a disminuir los niveles de TG (102). También se han desarrollado nuevos tratamientos basados en terapia génica, como la inoculación en tejido muscular del adenovirus-LPL<sup>S447X</sup> que consigue reducciones muy significativas de TG en todos los pacientes a las 12 semanas, sin embargos estos valores retornan a los niveles basales tras 18-30 meses, fallo que los autores achacan a la respuesta inmunitaria frente a las proteínas de la cápside del virus (103). En esta misma línea, se está desarrollando el fármaco Volanesorsen (IONIS FARMACEUTICAL, INC.), aún en experimentación (fase 4), cuyo objetivo es disminuir la expresión de apo C-III, por medio de un nucleótido antisentido, que logra amplias reducciones de la concentración de TG en plasma (104).

### 3. FACTORES GENÉTICOS RELACIONADOS CON LOS NIVELES LIPÍDICOS

Los niveles lipídicos en sangre son factores de riesgo hereditarios y modificables que influyen en el desarrollo de la ECV. Los niveles de CT, cLDL, cHDL, y TG están finamente regulados por genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo lipídico.

Los primeros estudios se basaron en la búsqueda de mutaciones graves en pacientes con fenotipos extremos de dislipemias, lo que ha permitido descubrir genes como el *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* o *LPL* entre otros. Tras el descubrimiento de los genes causales los siguientes pasos consistían en la caracterización de estas mutaciones, lo que permitió ahondar en conocimiento del metabolismo lipídico.

Finalmente, el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación, ha permitido encontrar nuevos genes con efectos menores sobre el metabolismo lipídico e incluso genes cuyo efecto a nivel celular está todavía pendiente de conocer.

#### 3.1 GENES RELACIONADOS CON LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR

Los niveles de colesterol están estrechamente regulados y se ven afectados tanto por la genética como factores ambientales. Se estima que del 40% al 50% de las concentraciones plasmáticas de cLDL estarían explicados por factores genéticos. En la actualidad, se conocen un puñado de trastornos monogénicos del metabolismo de LDL: unos cursan con cLDL bajo, como la hipobetalipoproteinemia primaria o la abetalipoproteinemia (producida por mutaciones en los genes *MTPP*, *APOB*, *PCSK9* y *ANGPTL3*), y otros cursan con cLDL alto, como la hipercolesterolemia familiar, atribuible a mutaciones en *LDLR*, *PCSK9* o *APOB*, o la hipercolesterolemia autosómica recesiva, atribuible a mutaciones en *LDLRAP1* (105).

El diagnóstico de HF se está volviendo cada vez más dependiente de las caracterizaciones moleculares, porque se ha observado que las mejoras en el estilo de vida, la dieta y el uso de la medicación para la reducción de lípidos han cambiado la expresión clínica de HF en las últimas décadas (106). Además, conocer con precisión el diagnóstico molecular permite guiar la elección de la terapia y asegurar un mejor pronóstico en pacientes con HF. La HF está causada predominantemente por mutaciones en los genes *LDLR*, *APOB* y *PCSK9* y más del 90% de las mutaciones causantes de HF reportadas se localizan en el *LDLR*. Los sistemas de secuenciación de nueva generación han permitido descubrir nuevas mutaciones en heterocigosidad en los genes *STAP1* y *APOE*, así como mutaciones bialélicas en los genes *ABCG5/G8*, que pueden cursar con un fenotipo similar a la HF (107).

### **3.1.1 LDLR**

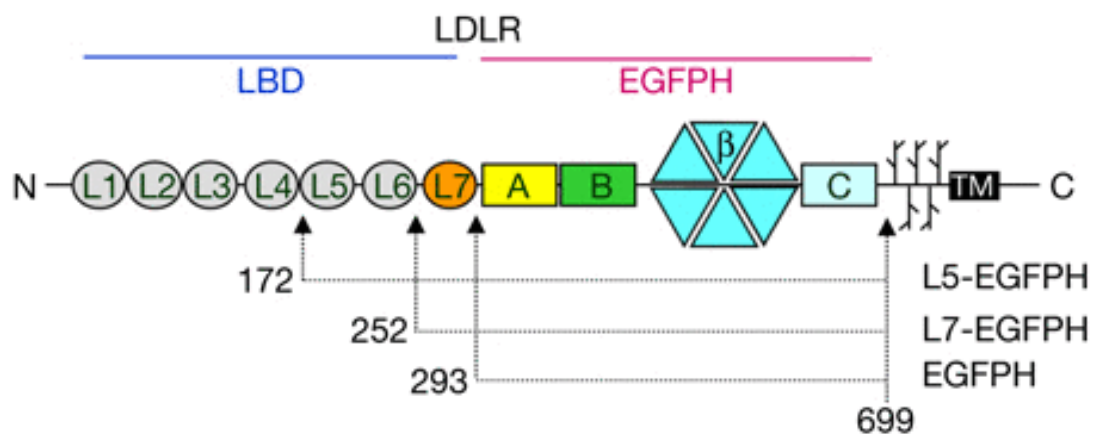
En 1938, el clínico noruego Carl Müller, describió la HF como un “error innato del metabolismo”, que producía altas concentraciones de colesterol en la sangre, infartos de miocardio y con una transferencia autosómica dominante, pero no fue hasta 1974, gracias a los estudios de Goldstein y Brown cuando se descubrió el papel del rLDL en la etiopatogenia de la HF (22). En 1972 Goldstein y Brown iniciaron sus experimentos con fibroblastos cultivados, donde en primer lugar confirmaron la autorregulación entre la síntesis y absorción de colesterol, midiendo la actividad de la HMG-CoA reductasa. Encontraron que cuando se eliminaban lipoproteínas ricas de colesterol del medio de cultivo, la actividad de la HMG-CoA reductasa se elevaba; y al contrario, la actividad de la enzima se reducía tras la adición de partículas LDL al medio. A continuación, realizaron los mismos experimentos en cultivos celulares de pacientes FH homocigotos, y observaron que estos individuos presentaban valores enzimáticos de HMG-CoA reductasa 50 o 100 veces por encima de lo normal y que la actividad de dicha enzima no se veía afectada por la presencia o ausencia de partículas LDL en el medio. La interpretación más simple para estos resultados era que los pacientes HF homocigotos presentaban mutaciones en HMG-CoA reductasa. Esta hipótesis fue inmediatamente refutada por el siguiente experimento, en el cual adicionaban colesterol emulsionado en etanol (esta emulsión tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática). Tras la adición del colesterol emulsionado, los niveles de HMG-CoA reductasa tanto de fibroblastos sanos, como de fibroblastos de pacientes HF homocigotos, eran igualmente suprimidos. Este experimento, indicó que el defecto de las células homocigotas HF residía en su capacidad de extraer el colesterol de las lipoproteínas. La existencia del rLDL fue postulada formalmente en 1974 cuando al realizar experimentos con LDL marcado, encontraron que las células normales tenían sitios de unión de alta afinidad para el LDL, mientras que las células homocigotas HF carecían de estos sitios. Este mismo experimento, mostró que las partículas LDL marcadas en células sanas, eran incorporadas al interior celular, donde se hidrolizaban generando colesterol no esterificado, que suprimía la actividad enzimática de la HMG-CoA reductasa (22).

Como se ha descrito anteriormente, el rLDL se localiza en la membrana plasmática y tras la captación de las partículas LDL, se produce una invaginación de la membrana, generando una vesícula que contiene el colesterol que será posteriormente esterificado en el interior de los lisosomas. El colesterol derivado de las partículas LDL, actúa a varios niveles, inhibiendo la actividad de la HMG-CoA reductasa, por medio de la vía SREBP; activa la enzima ACAT, para que el exceso de colesterol se pueda almacenar como gotas de ésteres de colesterol en el citoplasma. Al inhibir la vía SREBP, el colesterol también suprime la transcripción del gen LDLR,

lo que permite a las células ajustar la cantidad de rLDL expuestos para proporcionar suficiente colesterol a la célula para las necesidades evitando su acumulación (22).

El rLDL es una glicoproteína que se sintetiza como un precursor de 860 aminoácidos y tras la escisión de los 21 primeros aminoácidos se obtiene una proteína madura de 839 aminoácidos con cinco dominios reconocibles. El primer dominio del receptor maduro contiene el sitio de unión para las apop B y E. Este dominio consta de aproximadamente 300 aminoácidos, que se ensambla a partir de múltiples repeticiones de 40 residuos cada una (denomina L1-L7). El segundo dominio es una secuencia de aproximadamente 400 aminoácidos con una homología del 33% al precursor al factor de crecimiento de la epidermis (EGF). El tercer dominio es una secuencia de 48 aminoácidos que contiene serinas y treoninas, muchas de las cuales parecen servir como sitios de unión para las cadenas de carbohidrato ligadas a oxígeno. El cuarto dominio es una región membrana hidrofóbica de 22 aminoácidos, y el quinto dominio es una cola citoplasmática COOH-terminal de 50 aminoácidos (Figura 12) (108).

**Figura 12: Estructura de los dominios del rLDL**



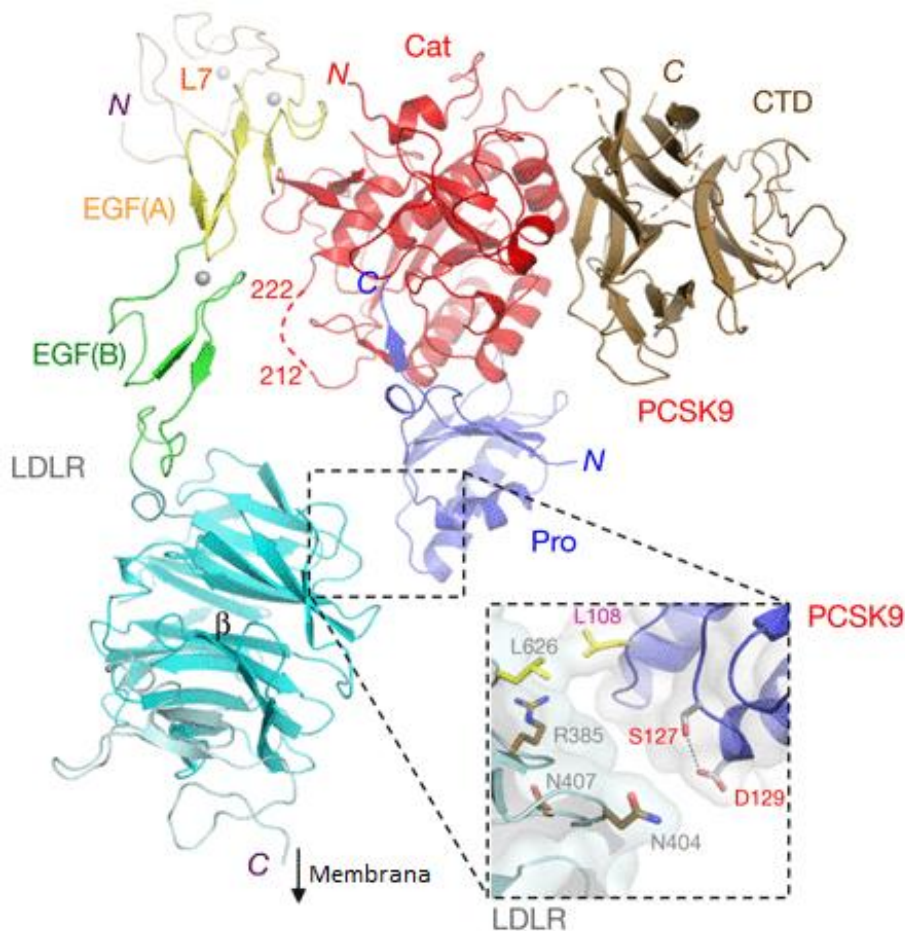
Adaptada de Lo Surdo y cols (109). Abreviaturas anteriormente no descritas y que aplican para esta figura: LBD (*Ligand-binding domain*, dominio de unión al ligando); EGFPH (*Precursor homology domain epidermal growth factor*, dominio homólogo al precursor del factor de crecimiento epidérmico). El dominio LBD está compuesto por secuencias repetitivas de 40 residuos cada una, denominadas L1-L7. El dominio EGPH está compuesto por dominio EGF A, B y C y una β-hélice.

El gen *LDLR* contiene más de 45 kilobases de longitud y codifica 18 exones, la mayoría de los cuales correlacionan con los dominios proteicos anteriormente descritos. Trece de los 18 exones codifican secuencias de proteínas que son homólogas a otras secuencias de proteínas: cinco de estos exones codifican una secuencia similar al componente C9 del complemento, tres exones codifican una secuencia similar al precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y a

proteínas de sistema de coagulación sanguíneo (factor IX, factor X y proteína C) y otros cinco exones codifican secuencias no repetidas homólogas con el precursor EGF (109).

Como se ha expuesto anteriormente, la vida media del rLDL en la membrana plasmática, está regulada por la proteína PCSK9. Tras la unión de PCSK9 al rLDL expuesto en la superficie celular, este complejo será internalizado en el interior celular para la posterior degradación del receptor. La mayoría de uniones entre PCSK9 y rLDL se producen entre el dominio catalítico de PCSK9 y el dominio EGF A del rLDL (Figura 13) (109).

**Figura 13: Estructura del complejo rLDL/PCSK9**



Adaptada de Lo Surdo y cols (109). En PCSK9, el prodominio está indicado en azul, el dominio catalítico en rojo y el dominio C-terminal en marrón. En rLDL el dominio de unión al ligando está indicado en beige, la región EGF (A) en amarillo, la región EGF (B) en verde y las regiones EGF (C) y la β-hélice en azul.

En la actualidad, la mayoría de individuos (60-80%) diagnosticados clínicamente con HF presentan mutación en el gen que codifica el rLDL. Se han reportado más de 2000 mutaciones en el *LDLR* causales del HF, de las cuales, el 8-10% son mutaciones que generan deleciones parciales; el 12-15%, son mutaciones sin cambio de aminoácido en región codificante; el 15-



20%, son mutaciones que generan pequeñas inserciones o deleciones que alteran el marco de lectura; el 8-10%, son mutaciones que la región de ajuste intrón-exón; y el 40-50% son mutaciones que generan un cambio de aminoácido

### 3.1.2 APOB

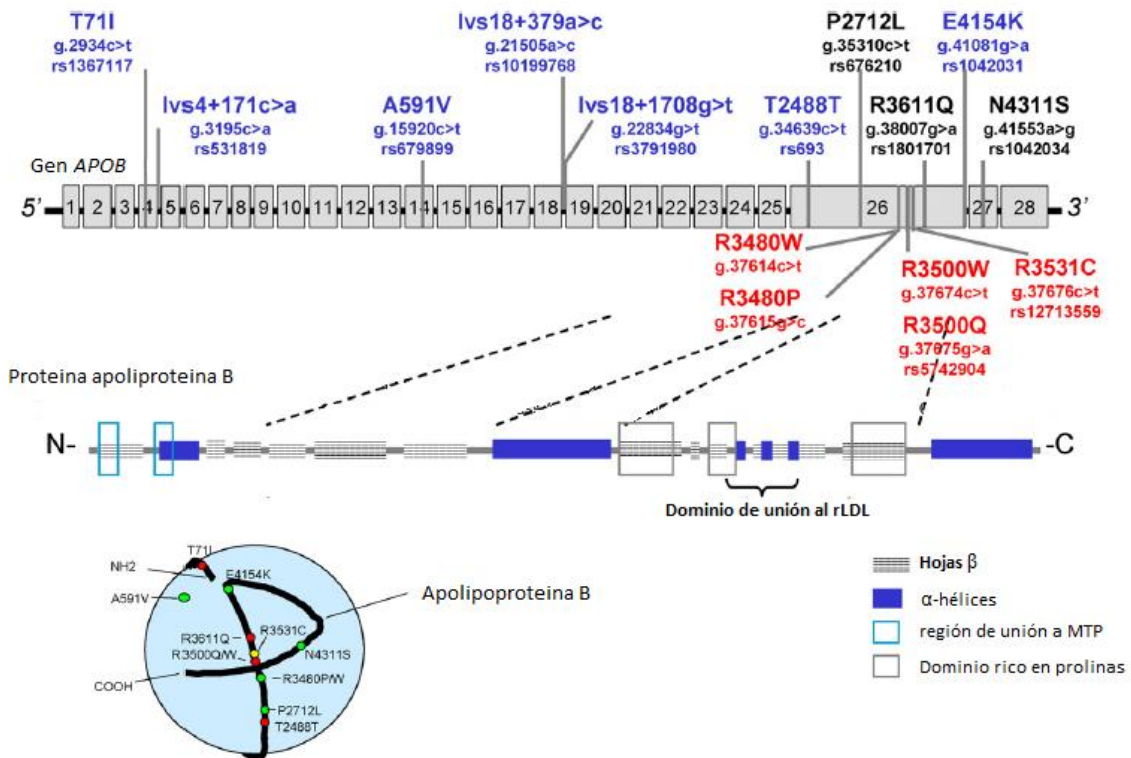
Dentro de la HF, aquellas que cursan con una mutación del gen de *APOB*, dan lugar a un trastorno poco frecuente, denominado, apo B-100 defectuosa familiar (ADF). La ADF es un trastorno genético autosómico dominante caracterizado por elevadas concentraciones de cLDL debido a una disminución de la eliminación a nivel hepático de partículas que contienen apo-B (110). La ADF fue descrita por primera vez en 1987 por Inneraty y cols, quienes reportaron una familia con la actividad de unión del cLDL al rLDL de tan solo el 32% e indicaron que este defecto de unión se debía a una anomalía genética de la apo B-100 (111).

La apo B-100, codificada por el gen *APOB*, tiene dos funciones principales conocidas: mantener la integridad de la partícula LDL y permitir la unión de LDL al receptor, y así promover la retirada de las partículas LDL del plasma mediante el proceso de internalización por medio del rLDL (73). apo B-100 es el ligando del rLDL y la única apolipoproteína en la superficie de las partículas LDL; apo B-100 envuelve la partícula LDL como si fuera un “cinturón”, y existe unos residuos aminoacídicos que son críticos para la afinidad entre apo B y el rLDL (112).

El gen *APOB* abarca 43 kilobases incluyendo 28 exones y codifica una péptido señal de 27 aminoácidos seguidos de una proteína madura de 4536 aminoácidos, siendo una de las proteínas monoméricas más grandes conocidas. El dominio de unión al rLDL de apo B se localizó en un principio en la región entre los residuos 3386 y 3396 (113). Sin embargo, la mutación más común, p.(Arg3527Gln), que además fue la primera mutación reportada, se encuentra fuera de esta región (111). Posteriormente, se demostró que la alteración que involucra este aminoácido desestabiliza un *cluster* de variantes importantes para la conformación de apo B-100. Además, también se ha demostrado que las regiones entre los aminoácidos 3174-3184 y 4181-4540 son importantes para el correcto plegamiento del extremo carboxilo terminal de la apo B-100, necesario para la unión del rLDL. En 2007, Krisko y Etchebest propusieron un modelo para la estructura terciara de apo B-100, definiendo 8 dominios diferentes, y estableciendo que el dominio para la unión con el receptor estaba entre los residuos 2820-3202 y 3243-3498 (114). Sin embargo, este modelo teórico no ha podido ser reproducido experimentalmente, debido a la longitud de apo B-100 y a que esta solo adopta su correcta conformación cuando se asocia con lípidos, y por tanto es difícil de cristalizar (115).

Se estima que las mutaciones en *APOB* que causan HF ocurren en 1/300-1/700 en población europea caucásica (116). Se han identificado un total de 132 variantes: de las cuales, una se encuentra a, 2000 pares de bases antes del comienzo del gen; otra, en la región 5'UTR, 63 variantes que codifican un cambio de aminoácido, 22 variantes que no generan cambio de aminoácido, 44 en la región intrónica y una variante en la región 3'UTR. La asociación de SNVs no sinónimos se ha examinado ampliamente en varios pequeños estudios y metaanálisis, aunque con resultados contradictorios (117,118) (Figura 14).

**Figura 14: Representación del gen de *APOB* y de la estructura de la proteína**



Adaptada de Marianne (116). En la parte superior del dibujo están marcados los 10 SNVs estudiados y en rojo cuatro mutaciones que generan un cambio de aminoácido y que se han demostrado causales de ADF. En la parte inferior se representa un diagrama esquemático de la estructura de apo B-100. La apolipoproteína B envuelve la LDL como un cinturón que completa el cerco alrededor del residuo de aminoácido 4050. El extremo carboxilo terminal forma un arco que cruza hacia atrás sobre la cadena entre los residuos 3000 y 3500.

Como se ha comentado anteriormente, la primera mutación causal identificada en *APOB* y también la más frecuente, es la p.(Arg3527Gln) (111). Posteriormente, se identificaron otras variantes, como p.(Asn1914Ser), p.(His1923Arg), p.(Arg3507Trp), p.(Arg3527Trp), p.(Arg3558Cys), p.(Trp4396Tyr) y p.(Ala8881Thr) (116,119,120). Sin embargo, sólo se demostró

que fueran patogénicas las variantes p.(Arg3507Trp), p.(Arg3558Cys), p.(Trp4396Tyr) y p.(Arg3527Trp). Las mutaciones p.(Arg3527Trp) y p.(Arg3527Gln) han demostrado que reducen la fracción de cLDL catabolizado entre un 33-70% en estudios in vivo (121). Por otro lado, existen datos controvertidos respecto a la mutación p.(Arg3558Cys), ya que, aunque se ha identificado en pacientes con altos niveles lipídicos y en estudios funcionales con fibroblastos la mutación reportó que el cLDL tenía una afinidad reducida por el LDL del 28-51%, anteriormente, un estudio había mostrado que la mutación p.(Arg3558Cys) no estaba asociada con los niveles lipídicos en población general (122) y un estudio in vivo mostró que la actividad de catabólica del cLDL estaba disminuida solo un 17% en los sujetos que padecían esta mutación (121).

La penetrancia de las mutaciones patogénicas de *APOB* es del 100% y los pacientes con mutaciones en *APOB* tienen un fenotipo similar al de los sujetos con mutaciones en el *LDLR*, aunque suele ser menos grave. En 2012 se publicaron dos nuevas variantes en *APOB* mediante el estudio de la secuenciación del exoma y el análisis de ligamiento en dos familias no relacionadas, p.(Arg3059Cys) y p.(Lys3394Asn). Los ensayos in vitro con células HepG2 demostraron una reducción en la captación de cLDL en pacientes portadores de dichas mutaciones del 28-49% (123). Estas alteraciones están localizadas en la teórica región de unión al receptor postulada por Krisko y Etchebest, sin embargo, la cosegregación en estas familias no es completa, mostrando una baja penetrancia en ambos casos. Más recientemente, en 2014, se identificaron 2 nuevas mutaciones en *APOB*, p.(Arg1164Thr) y p.(Gln4494del), que producían un 40% de disminución de la internalización de cLDL en linfocitos y células HepG2. En este estudio, se identificaron otras 8 variantes genéticas, pero los experimentos in vitro demostraron que no afectan a la funcionalidad y se catalogaron como polimorfismos (124). Por lo tanto, todavía no se conoce bien el papel de los diferentes dominios de apo B en el metabolismo lipídico, ya que mutaciones que afectan drásticamente al mismo, como p.(Arg3527Gln), están fuera del dominio de unión al rLDL, lo que indica que hay que profundizar en su estudio para conocer mejor el papel de los diferentes dominios de apo B en la interacción con el rLDL, PCSK9 y la Lp(a).

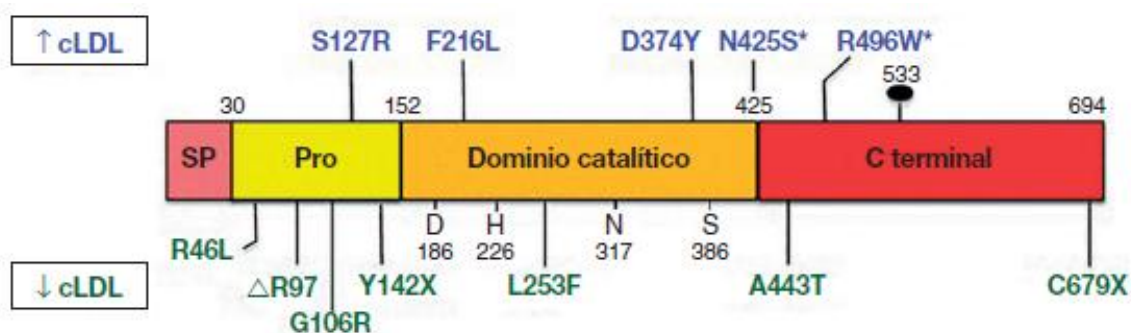
### **3.1.3 PCSK9**

En la década pasada la búsqueda de nuevas variables genéticas causales de HF junto con la investigación en la estructura y función de las proteínas de la familia de las proteín-convertasa permitió el descubrimiento de la proteína PCSK9 en 2001 por científicos de *Millenium Phamarceuticals* en estudios de apoptosis neuronal del cerebelo (125). En paralelo y de forma independiente, la *French Network for Autosomal Dominant Hypercholesterolemia* junto con la Universidad de Utah, identificaron *PCSK9*, como un tercer *locus* involucrado en la etiopatogenia

de la HF (126). Finalmente, en 2003, Abifadel y cols reportaron por primera vez mutaciones en el gen *PCSK9* como causantes de HF.

La PCSK9 es una proteína de 692 aminoácidos con una peso molecular de 72 kDa, que consta de una región prodominio, un dominio catalítico y un dominio rico en histidina y cisteína C-terminal (127), que se expresa principalmente en hígado, intestino, riñón y sistema nervioso central (Figura 15).

**Figura 15: Estructura de PCSK9**



Adaptada de Botet-Pedro y cols (128). Las mutaciones asociadas con concentraciones elevadas de cLDL están representadas en la parte superior (azul) y las mutaciones vinculadas a niveles bajos de cLDL en la parte inferior (verde).

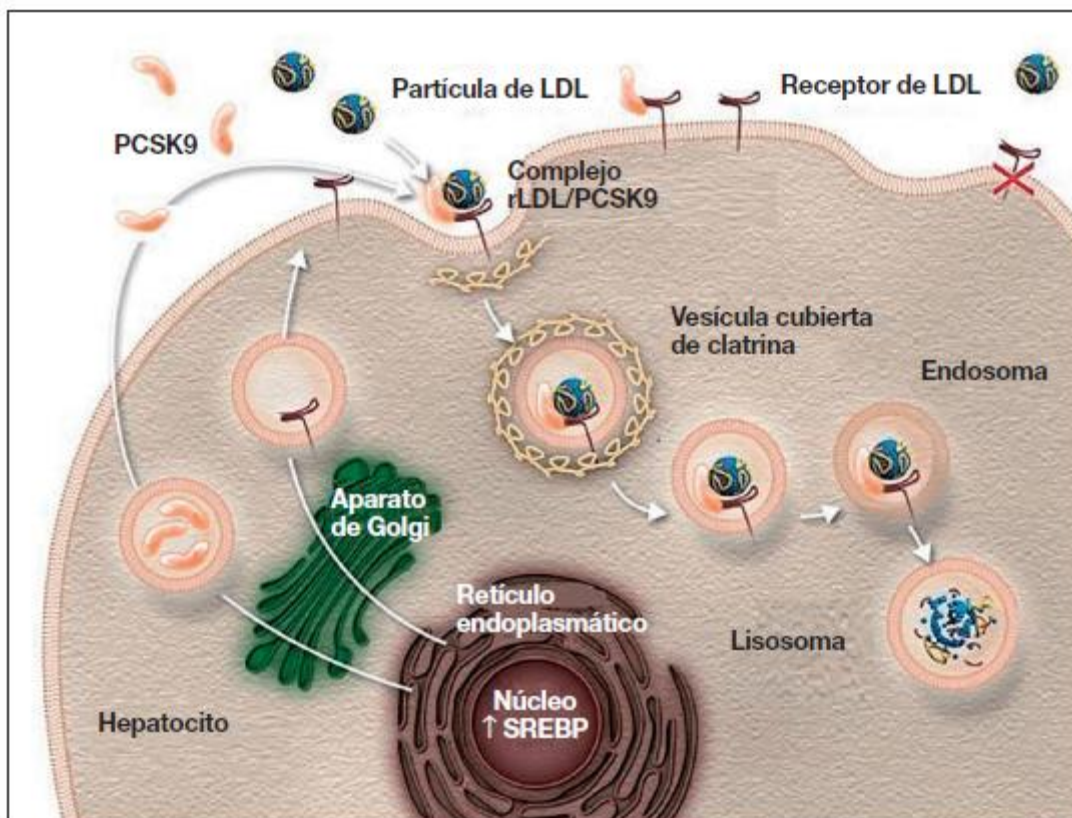
La pro-PCSK9 se sintetiza en el retículo endoplasmático al igual que el precursor del rLDL, y la unión de ambos facilita el transporte de colesterol desde el retículo endoplasmático al complejo Golgi, donde completan la maduración. El tráfico de pro-PCSK9 al aparato de Golgi depende de la presencia de Sec24A (129). En el aparato de Golgi, la región prodominio de la pro-PCSK9 se escinde autocatalíticamente, pero continúa unida de forma no covalente a la PCSK9 madura para facilitar el plegamiento de la proteína y el bloqueo de su actividad catalítica. La unión de pro-PCSK9 a la forma precursora del rLDL promueve la escisión catalítica de PCSK9 (130).

La principal vía de eliminación de cLDL circulante a nivel hepático es por endocitosis, proceso mediado por la unión del cLDL al rLDL en la membrana celular de los hepatocitos (Figura 15). Dado que la vida media del rLDL es de aproximadamente 20 horas y que en el reciclado se emplean de 10 a 15 minutos, el rLDL es capaz de recircular de nuevo a la superficie celular hasta 150 veces, lo que indica el papel fundamental que juega PCSK9 en el metabolismo de la rLDL. La subunidad catalítica de PCSK9 se une al dominio epidérmico de rLDL y a continuación acompaña al receptor a su degradación en el interior del lisosoma (128).

A nivel intracelular, PCSK9 juega un papel en la regulación de la expresión de rLDL maduro mediante la inducción de la degradación intracelular del receptor previo a su transporte a la

membrana de la superficie celular. Esta degradación del receptor se produce en el aparato de Golgi y gracias a la actividad catalítica de PCSK9 (131). Si el rLDL no es degradado intracelularmente se transporta a la superficie celular, en las fosillas recubiertas de clatrina, gracias a su interacción con la proteína adaptadora 1 del rLDL (LDLRAP1). El rLDL sufre endocitosis en presencia o ausencia de su ligando, entrando así en el compartimento de reciclado. Un cambio de pH dentro de este compartimento permite la disociación del rLDL de su ligando, que luego se degrada en el lisosoma, mientras que el rLDL se recicla (128) (Figura 16).

**Figura 16: Papel de PCSK9 en la degradación de los receptores de cLDL**



Adaptada de Botet-Pedro y cols.(128).

El papel del PCSK9 extracelular es la regulación postranslacional del número de rLDL en la superficie celular. La PCSK9 secretada se une a la región homóloga al factor de crecimiento epidérmico A del rLDL. El complejo PCSK9-rLDL se internaliza de nuevo por endocitosis mediada por clatrina (132) y el complejo se dirige al endosoma/lisosoma a través de un mecanismo que no requiere ubiquitinación. A pH ácido en el endosoma/lisosoma tiene lugar una interacción adicional entre el dominio de unión del ligando del receptor y el dominio C-terminal de PCSK9 (133). Como consecuencia de esta unión, la PCSK9 permanece unida al receptor y el este no adopta la configuración cerrada requerida para su reciclaje. Por lo tanto, mediante esta unión al

rLDL, PCSK9 interrumpe el reciclado de rLDL y lo conduce a la degradación, lo que conlleva una disminución significativa del número de rLDL disponibles en la superficie celular.

Varios factores de transcripción o cofactores regulan la expresión del gen *PCSK9*, incluyendo las proteínas de unión al elemento regulador de los esteroides (SREBP-1/2). Dado que el gen *PCSK9* está regulado por los niveles de esteroides a través de SREBP2, las dietas con bajo contenido en colesterol suprimen potentemente sus valores de expresión y disminuyen la concentración de PCSK9 durante el ayuno y, por el contrario, aumentan en situación postprandial (134).

PCSK9 mediante un proceso de autoensamblaje, forma dímeros o trímeros de PCSK9, que tienen la mayor actividad degradante del rLDL. En este sentido, una de las mutaciones con ganancia de función de *PCSK9* (p.Asp374Tyr) se caracteriza por un autoensamblaje intensificado (135). Las mutaciones con ganancia de función en *PCSK9* (p.Asp374Tyr) y su correspondiente sobreexpresión comportan un menor número de rLDL funcionantes y mayores concentraciones de cLDL. Por el contrario, las mutaciones con pérdida de función en *PCSK9* dan lugar a valores más bajos de cLDL. El descenso de la concentración de cLDL, aunque modesto (del 15 al 28%), es para toda la vida y confiere una protección cardiovascular considerable (136).

El descubrimiento de PCSK9 ha permitido el desarrollo en la última década de nuevos tratamientos altamente eficaces, como los anticuerpos monoclonales anti-PCSK9, comercializados en España desde inicios del 2017, que consiguen reducciones de los niveles de cLDL superiores al 50%. Sin embargo, todavía existen lagunas en la cinética, dinámica y función fisiológica completa de PCSK9.

#### **3.1.4 APOE**

La apo E, codificada por el gen *APOE*, es una proteína multifuncional con funciones centrales en el metabolismo lipídico, neurobiológico y enfermedades neurodegenerativas. Apo E es una glicoproteína de 299 aminoácidos, que fue descubierta en 1970 con un papel clave en el metabolismo lipídico, donde en plasma media el aclaramiento de lipoproteínas remanentes; mientras que a nivel del endotelio vascular, la apo E secretada por macrófagos, participa el flujo de colesterol hacia la placa de ateroma (137,138). La importancia de apoE en el metabolismo lipídico ha sido reconocida hace décadas. En modelos animales, la deficiencia de apoE está asociada con el desarrollo de la arteriosclerosis. Debido a su alta afinidad con los miembros de la familia de los rLDL, apo E facilita la captación hepática y extrahepática de las lipoproteínas plasmáticas. La lipídación de apo E y apo A1 dirige la generación de nuevo de partículas HDL. Además, la unión de varias proteínas a las partículas HDL depende del contenido de esta apo E de las mismas (137).

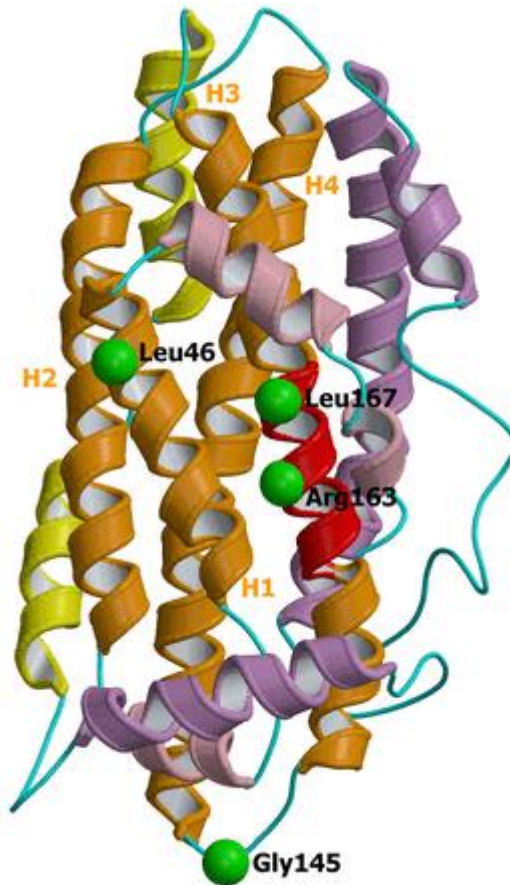
La apo E está compuesta por dos dominios funcionales y estructurales diferentes, un dominio N-terminal, que comprende los aminoácidos 1-191, y un dominio C-terminal, con aminoácidos del 206 al 299, unidos por un bucle sensible a proteasa (Figura 17). El dominio N-terminal está formado por 4  $\alpha$ -hélices antiparalelas que contienen la región de unión al receptor (entre los aminoácidos 136 a 150 y el aminoácido Arg172) y la región de unión a los HSPG, con una capacidad débil de unión al lípidos (139,140). El dominio C-terminal está formado por  $\alpha$ -hélices anfipáticas que contiene la región de alta afinidad de unión a lípidos, entre los aminoácidos 244 a 272, y la región responsable de la auto asociación de apo E entre los aminoácidos 267 a 299 (141). Se ha determinado que las regiones altamente conservadas están vinculadas a las funciones primarias de apo E, como la unión al ligando y se ha encontrado una menor conservación en aminoácidos en los extremos de la proteína (137).

Los humanos presentan tres isoformas de apo E, denominadas apo E2, apo E3, apo E4, que son productos de los alelos  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 y  $\epsilon$ 4 (142). El alelo  $\epsilon$ 3, es el alelo más común, con una prevalencia del 77% en población general, mientras que el alelo con menor frecuencia es el alelo  $\epsilon$ 2, con una prevalencia del 8% en población general y finalmente el alelo  $\epsilon$ 4 tienen una frecuencia en la población del 15% (143). Las tres isoformas difieren en los aminoácidos en las posiciones 112 y 158. La isoforma apo E3, la isoforma más prevalente en la población normolipémica, tiene el aminoácido cisteína en la posición 112 y una arginina en la posición 158. Manteniendo los niveles homeostáticos lipídicos, apo E3 juega un papel protector en las enfermedades cardiovasculares. La isoforma apo E2 tiene dos cisteínas en las posiciones 112 y 158 y se asocia con la disbetalipoproteinemia. La isoforma apo E4 tiene dos residuos arginina en las posiciones 112 y 158 y representa un factor de riesgo para el desarrollo del Alzheimer. En la isoforma apo E4, el residuo arginina 61, localizado en la segunda  $\alpha$ -hélice y el residuo ácido glutámico 255 son responsables de la interacción del dominio. La isoforma apo E4 presenta una mayor afinidad por el rLDL, mayor asociación con las partículas VLDL y mayor capacidad para convertir más rápidamente los restos de VLDL a LDL. Sin embargo, cuando la unión Arginina61-ácido glutámico 255 se rompe, la isoforma apo E4 tiene una mayor preferencia de unión por partículas HDL en vez de por partículas VLDL, presentando un función similar a la isoforma apo E3 (144).

En 2012, Solanas-Barca y colaboradores describieron una delección en apo E causante de hiperlipemia mixta y de hipercolesterolemia aislada (145). Marche y colaboradores describieron, posteriormente una amplia familia francesa compuesta por 14 miembros con HF sin mutación en los genes *LDLR*, *APOB* y *PCSK9*. Estos pacientes eran portadores de una variante rara, una delección de tres pares de bases, en el gen de *APOE*, que generaba una delección de una leucina en la posición 167 (146). Una observación similar fue reportada por Awan y colaboradores (147)

en un paciente con fenotipo de HF portador de la variante p.(Leu167del) en heterocigosidad. Esta variante había sido previamente descrita en sujetos con fenotipo de HTG asociada con histiocitosis (145).

**Figura 17: Representación de la proteína apo E**



Adaptada de Wintjens y cols (148). Los residuos mutados encontrados por Wintjens y colaboradores están representados y etiquetados para su localización en la estructura de la proteína 3D. Las hélices N-terminales adicionales están coloreadas en salmón, el dominio N-terminal en naranja, el dominio de bisagra (es decir, la región entre los dos dominios funcionalmente distintos) en amarillo, y el dominio C-terminal en púrpura. La región putativa de unión a rLDL (residuos 158-168) se muestra en rojo. Las cuatro hélices  $\alpha$  del dominio N-terminal están marcadas como H1 a H4.

Recientemente, nuestro grupo (58) realizó un estudio sistemático para determinar la frecuencia de la variante p.(Leu167del) en pacientes HF sin mutación en los genes candidatos y encontraron 9 pacientes (3,1%) de 288 pacientes HF-, portadores de la mutación. Analizaron también todos los familiares disponibles de los probandos, de ellos 10 fueron portadores de la variante, de los cuales, 6 presentaron una hipercolesterolemia aislada, tres presentaron una hiperlipemia mixta y solo uno tenía niveles de colesterol por debajo del percentil 90. Se encontró que la concentración de cLDL era aproximadamente 50 mg/dL menor en los portadores de la mutación



p.(Leu167del) que los sujetos portadores de mutaciones en el *LDLR*. Esta hipercolesterolemia más ligera se asoció con la ausencia de xantomas tendinosos y una menor prevalencia de ECV. Wintjens y colaboradores (148) secuenciaron el gen completo de *APOE* en una cohorte de 106 pacientes, sin mutación en los genes candidatos y reportaron 4 pacientes (1,7%) portadores de 4 variantes raras en el gen de *APOE*: p.(Arg163Cys), previamente descrita en sujetos con disbetalipoproteinemia; p.(Leu167del), una delección previamente descrita en pacientes HF; un raro polimorfismo p.(Leu48Pro); y la variante p.(Gly145Asp), descrita en pacientes con disbetalipoproteinemia. Los tres pacientes portadores de las tres primeras mutaciones descritas presentaban una hipercolesterolemia aislada, mientras que el último presentaba una hiperlipemia mixta. Todas las mutaciones están situadas en el dominio N-terminal (Figura 16). El residuo Leu48 está localizado en la primera  $\alpha$ -hélice en el dominio N-terminal y la inserción de una prolina en esta región, genera una desestabilización de la estructura proteica. Muy recientemente, se ha descubierto a nivel experimental que esta variante desestabiliza la termodinámica de apo E, generando una isoforma más propensa a la proteólisis y afectando su unión a lípidos. El residuo Gly145 está ubicado dentro de una región de bucle que conecta las  $\alpha$ -hélices H3 y H4. Por el contrario, los residuos Arg163 y Leu167 están en el medio de la  $\alpha$ -hélice H4, precisamente en el sitio de unión de rLDL putativo (región 158-168). Por lo tanto, se cree que los mutantes p. (Arg163Cys) y p. (Leu167del) afectan a las propiedades de unión a rLDL de la proteína apo E (Figura 17).

### 3.1.5 *LDLRAP1*

En 1973 un estudio realizado en 52 HF homocigotos por Khachadurian y colaboradores (149) reportó una familia en la cual 4 niños habían sido diagnosticados como HF homocigotos a pesar de que nacieron de padres normolipémicos. Estos niños presentaban grandes xantomas y niveles de colesterol algo inferior a lo observada en los HF homocigotos. En 1974 Morganroth y colaboradores describieron el caso de dos niños no relacionados que presentaban un fenotipo similar a los HF homocigotos, con niveles plasmáticos de LDL muy elevados junto xantomas planos y acuñaron por primera vez el término “hiperlipemia tipo II pseudo-homocigota” para diferenciarla de HF homocigota clásica (150). En 1991 Harada-Shiba y colaboradores reportaron dos pacientes con características clínicas de HF homocigóticos nacidos de padres consanguíneos normolipémicos. Los probandos presentaban una actividad del rLDL normal, por lo que los autores sugirieron un defecto en el catabolismo del colesterol (151). Un estudio posterior, llevado a cabo por Zuliana y colaboradores en 1995, presentó el caso de dos hermanos con un claro fenotipo del HF homocigoto sin antecedentes previos de colesterol familiar, provenientes de un pequeño pueblo del interior de la isla de Cerdeña, caracterizado por el aislamiento

geográfico. Un amplio estudio familiar, permitió construir un enorme pedigrí, donde se confirmó la presencia de otros familiares afectos y la transmisión recesiva de este trastorno (152).

Estudios posteriores con los fibroblastos de estos sujetos confirmaron que la etiología de la esta HF recesiva se debía a una reducción del catabolismo LDL causada por un defecto selectivo en el absorción hepática de LDL (153). Esta hipótesis fue confirmada por medio del estudio de ratones con hipercolesterolemia autosómica recesiva, donde encontraron una gran proporción de rLDL localizado en la superficie sinusoidal de los hepatocitos. Lo que sugería un defecto en el proceso de internalización del rLDL, y confirmó que la ausencia de la proteína, que denominaron ARH, causaba la incapacidad del rLDL para ingresar en el ciclo endocítico. Estos datos sugieren que la proteína ARH era una proteína adaptadora de selección endocítica que participaba activamente en la internalización del complejo LDLR / LDL en los hepatocitos (Figura 16) (154).

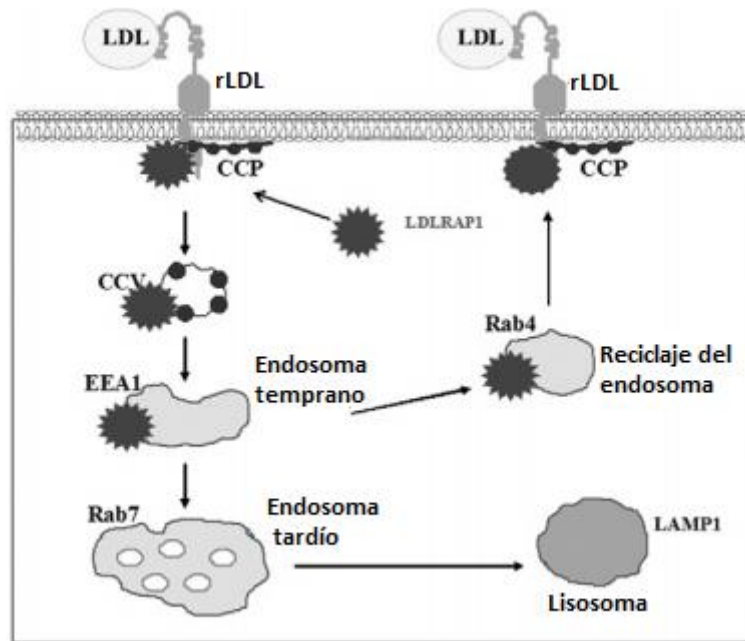
Para intentar localizar el gen responsable de la HF recesiva el profesor Soutar y colaboradores (155) genotiparon más de 500 SNVs en una familia con hijos afectos de padres consanguíneos, previamente caracterizados, asumiendo que los individuos afectos debían de ser homocigotos para una región del genoma que albergara el mismo alelo genético defectuoso heredado de un ancestro común. Dicho genotipado indicó que en esta familia el gen putativo de hipercolesterolemia recesiva se localizaba en una sola región cromosómica en el cromosoma 1. Un posterior mapeo fino del cromosoma 1 les permitió identificar el gen responsable del desorden que abarcaba 29 kb y codificaba nueve exones.

En vista de la función establecida de una proteína adaptadora desde 2005, la proteína ARH fue designada como Proteína Adaptadora del Receptor de Lipoproteína de Baja Densidad 1, LDLRAP1 y el gen correspondiente se designó *LDLRAP1* (156). La proteína LDLRAP1 contiene un dominio ácido compuesto por 170 de que comparte similitud de secuencia considerable con el dominio de unión a fosfotirosina (PTB) de muchas proteínas adaptadoras. Los dominios PTB se unen a la secuencia consenso NPXY, que está presente en las colas citoplásmicas de varias células de la superficie receptores, incluido el rLDL (157) (Figura 18).

Tras el descubrimiento del gen *LDLRAP1*, otros pacientes con HF recesiva fueron caracterizados a nivel molecular, lo que ha permitido identificar más de una docena de mutaciones, cuya característica común es la producción de proteínas truncadas que carecen de función. Recientemente, se han reportado algunos heterocigotos dobles para mutaciones en *LDLR* y *LDLRAP1* en sujetos con fenotipo de HF autosómica recesiva. Tada y colaboradores describieron a tres pacientes japoneses, pertenecientes a la misma familia, que eran heterocigotos para una

mutación sin sentido del gen *LDLR* p. (Lys790\*) y un cambio de marco de lectura en el gen *LDLRAP1* p. (Lys204Glufs\*17) (158).

**Figura 18: Representación esquemática de la función de la proteína LDLRAP1**



Adaptada de Fellin y cols (159). Tras la unión de LDL al rLDL superficial, LDLRAP1 es reclutada por fosas recubiertas de clatrina (CCP) y promueve la internalización del complejo LDL-rLDL y recicla proteínas asociadas al compartimento del endosoma temprano (EEA1, Rab4). Abreviaturas no descritas anteriormente, que aplican en esta figura: vesículas recubiertas de clatrina (CCV), antígeno endosómico temprano 1 (EEA1), proteína de membrana 1 asociada a lisosomas (LAMP1), pequeña proteína asociada de GTPasa (Rab4).

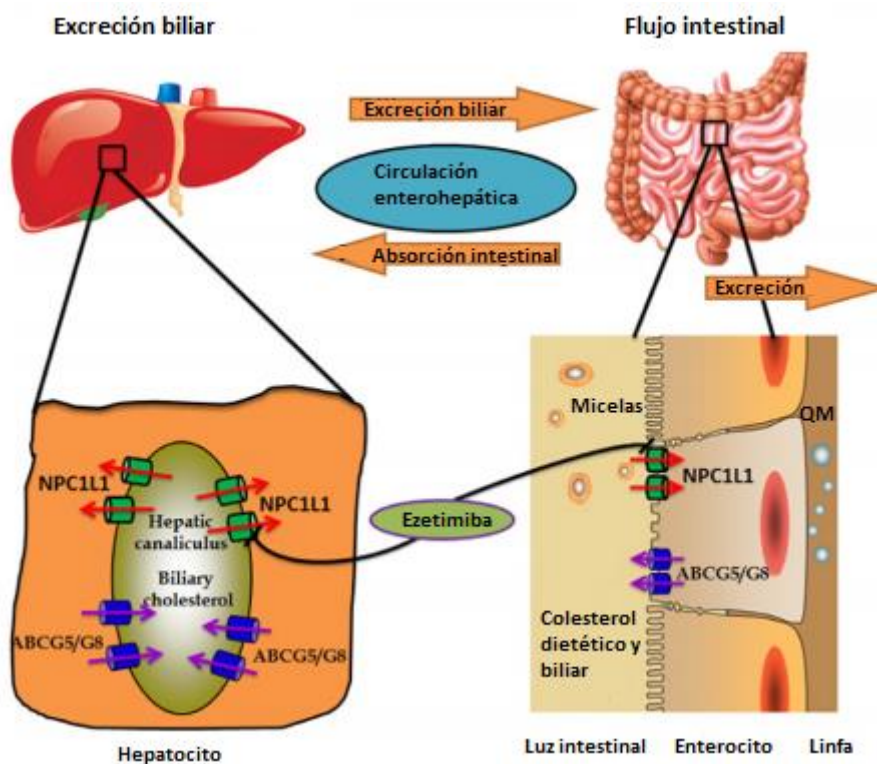
### 3.1.6 ABCG5/G8

La homeostasis del colesterol se mantiene principalmente por la síntesis de *novo*, absorción intestinal y la excreción fecal y biliar. NPC1L1 media la absorción intestinal de colesterol y la reabsorción de colesterol biliar. En oposición directa a NPC1L1, el heterodímero ABCG5/G8, localizado en la membrana del enterocito y de los hepatocitos, inhibe la absorción de colesterol y esteroides vegetales de la dieta mediante la salida de esteroides de los enterocitos a la luz intestinal y promoviendo la secreción de colesterol y esteroides vegetales en los hepatocitos por medio de la bilis (160). Por lo tanto, el heterodímero ABCG5/G8 constituye el sistema de defensa frente a la acumulación de esteroides derivados de la dieta.

Los genes *ABCG5* y *ABCG8*, codifican el heterodímero ABCG5/G8, localizado en el cromosoma 2. Ambos genes están separados por 140 pares de bases, compartiendo la región promotora, ya que se transcriben en direcciones opuestas. Cada uno de ellos está compuesto por 13 exones y

12 intrones. Cada proteína tiene un *cassette* de unión al ATP cerca del extremo N terminal, un dominio transmembrana que contiene 6  $\alpha$ -hélices y un dominio de unión a nucleótidos, que contiene dos dominios peptídicos conservados (161). ABCG5 o ABCG8 actúan como un transportador no funcional cuando se expresan solos, deben de formar un heterodímero para obtener la funcionalidad en el transporte de esteroides. ABCG5/G8 heterodimerizan en el RE y se transfieren juntos al aparato de Golgi y finalmente pasan a subdominios apicales de la membrana plasmática (162).

Figura 19: Papel de ABCG5/G8 en el flujo de colesterol



Adaptada de Yu y cols (163). El heterodímero ABCG5/G8 se localiza en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos y la membrana canalicular de los hepatocitos. ABCG5/G8 secretan esteroides que incluyen fitoesteroides y colesterol de los hepatocitos a la bilis. Los esteroides de la bilis representan más de dos tercios de la cantidad total de esteroides en la luz intestinal. Debido a que los esteroides son hidrofóbicos, se transfieren a la membrana del borde en cepillo de los enterocitos a través de micelas. ABCG5/G8 median el flujo de salida de los esteroides biliares y absorbidos en la dieta desde la membrana del borde en cepillo excreta de nuevo a la luz intestinal. NPC1L1, presente en la membrana apical de los enterocitos y hepatocitos, facilitan la absorción de colesterol a nivel intestinal y biliar. La mayoría de colesterol absorbido en los enterocitos por NPC1L1 se empaqueta en quilomicrones y posteriormente se secreta a la linfa. El fármaco Ezetimiba suprime la absorción de colesterol dependiente de NPC1L1 en el intestino delgado e hígado.

El heterodímero ABCG5/G8 está localizado en el borde en cepillo de los enterocitos y en borde apical de los hepatocitos. A nivel hepático, ABCG5/G8 promueven la eliminación de colesterol y esteroides vegetales por la secreción hepatobiliar. A nivel intestinal, ABCG5/G8, transportan colesterol y esteroides vegetales desde los enterocitos a la luz intestinal para su eliminación fecal (Figura 19). Los ratones con sobreexpresión de *ABCG5/G8* exhiben una disminución del 50% en la absorción de colesterol proveniente de la dieta (164). Un estudio reciente de Wang y colaboradores encontró una correlación negativa entre la eficiencia de la absorción de colesterol y la abundancia de ABCG5/G8 en el yeyuno y el íleon, pero no en el duodeno, lo que sugiere que el heterodímero ABCG5/G8 localizados en el yeyuno y el íleon son determinantes de la absorción de colesterol intestinal. En sentido contrario, los ratones deficientes en *ABCG5/G8* tienen una absorción de esteroides vegetales 2-3 veces superior a la absorción normal, lo que genera unos niveles plasmáticos de esteroides 30 veces por encima de los niveles plasmáticos normales (163).

Los esteroides vegetales son el componente no saponificable de los aceites vegetales y tienen una estructura química similar al colesterol, excepto por la adición de un grupo extra metilo o etilo. La ingesta dietética de esteroides vegetales puede disminuir los niveles plasmáticos de CT o LDLc debido a su capacidad para desplazar el colesterol a partir de las micelas mixtas en el intestino delgado superior reduciendo la absorción de colesterol (165).

La expresión de *ABCG5/G8* está regulada principalmente a nivel transcripcional por medio del receptor hepático X  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ), que es un factor de transcripción nuclear implicado en el control del metabolismo lipídico. Además de LXR $\alpha$ , la hormona tiroidea es un importante regulador del metabolismo del colesterol junto con el factor nuclear de los hepatocitos 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) y la proteína 4 de unión GATA (GATA4) estimulan la transcripción de los genes ABCG5/G8 en las células hepáticas (166,167).

Recientemente, una variedad de estudios se han centrado en estudiar la implicación de polimorfismos genéticos de *ABCG5/G8* en las hipercolesterolemias de origen genético. Renner y colaboradores encontraron que los individuos portadores de la variante p.(Asn19His) en *ABCG8* presentaban una absorción de colesterol aproximadamente 24% más baja que los sujetos *wild-type* (168). Otro estudio reciente reportó que los sujetos portadores de la variante p.(Thr400Lys) del gen *ABCG8* tienen un mayor riesgo cardiovascular (169). García-Ríos y colaboradores reportaron que los portadores del alelo menor G en el SNV p.(Gln604Glu) en el gen *ABCG5* mostraron menores concentraciones de VLDL-C y de TG en pacientes con HF (170). Ahondando en esta línea, se encuentra el artículo que presentamos como parte de esta tesis, en el que reportamos sujetos con hipercolesterolemia autosómica dominante sin mutación en los genes clásicos, pero que son portadores de mutaciones raras en *ABCG5/G8*, descritas como

patogénicas, presentan significativamente mayores niveles de los marcadores de la absorción intestinal de colesterol, lo que sugiere que estos *loci* contribuyen a la hipercolesterolemia de estos sujetos, por medio de la elevación de absorción intestinal de colesterol.

El descubrimiento de *ABCG5/G8* ha supuesto un resultado emocionante en la investigación cardiovascular. En contraste con *NPC1L1*, el heterodímero *ABCG5/G8* es una ruta importante para facilitar el exceso de eliminación de colesterol del cuerpo. Los defectos en *ABCG5/G8* se han demostrado causales de sitosterolemia. A la inversa, la regulación positiva de los niveles de *ABCG5/G8* puede promover el retroceso el transporte de colesterol y reducir la aterosclerosis. Sin embargo, aún es necesario identificar cómo el heterodímero es transportado desde el RE a la membrana plasmática y, la unión de esos heterodímeros a sus sustratos. Conocer la funcionalidad completa del heterodímero, permitirá identificar si este heterodímero podría ser una posible diana terapéutica.

### **3.1.7 STAP1**

El gen *STAP1* fue descubierto por Fouchier y colaboradores (59) en 2014 por medio de la secuenciación del exoma y del análisis de ligamiento en sujetos afectados y no afectados pertenecientes a una familia con un fenotipo claro de HF. El análisis de ligamiento paramétrico les permitió identificar tres regiones cromosómicas vinculadas en los cromosomas 4, 11 y 13. Posteriormente se llevó a cabo la secuenciación del exoma de 3 miembros de la familia afectados con haplotipos compartidos en las 3 regiones cromosómicas previamente identificadas y 3 familiares no afectados. Todos estos pasos, les permitieron identificar la variante p.(Glu97Asp) en el gen *STAP1*, que no había sido previamente descrita, no estaba presente en 400 controles y que fue predicha como patogénica tras el análisis bioinformático. A continuación, los autores secuenciaron todas las regiones codificantes del gen *STAP1* en 400 pacientes HF sin mutaciones en los genes candidatos (HF-), esto les permitió encontrar otro paciente HF- portador de la variante p.(Glu97Asp) y 3 nuevas variantes patogénicas que generaban cambio de aminoácido en 3 pacientes diferentes p.(Leu69Ser), p.(Ile71Thr) y p.(Asp207Asn). Todas las variantes estaban localizadas en el exón 3, excepto la variante p.(Asp207Asn) localizada en el exón 6, y todas las variables alteran residuos de aminoácidos altamente conservados. Ninguna de estas variantes está presente en ninguno de los 400 controles secuenciados.

Las familias de los 4 sujetos HF- que presentaron alguna variante en *STAP1* fueron analizadas también y los autores reportaron que los sujetos portadores de las variantes presentaban mayores niveles de CT y cLDL que sus parientes no portadores de las variantes *STAP1*. Los niveles lipídicos de pacientes con mutaciones en *STAP1* son significativamente menores que los

pacientes con mutación en heterocigosidad en el *LDLR*, pero muy similar al perfil lipídico de los pacientes portadores de mutaciones en *APOB*.

La función de *STAP1*, que es una proteína adaptadora de células madre, es desconocida a día de hoy. Sin embargo, un dominio con varios sitios de fosforilación de tirosina, que le permite interactuar con la membrana o con proteínas de membrana. Por lo que los autores plantean que el efecto de *STAP1* sobre los niveles de colesterol sea por medio de la interacción con proteínas de membrana.

Estudios posteriores reportaron un sujeto con la mutación p.(Glu97Asp) en *STAP1*, con un fenotipo de HF- y EVC prematura (171). Otro estudio, con selección de 255 individuos con ECV y antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, se encontró un paciente con portador de la mutación p.(Thr47Ala) del gen *STAP1* (172).

Actualmente el gen *STAP1* se incluye en las plataformas de secuenciación para el diagnóstico de la HF, lo que permitirá la obtención de mayor número de mutaciones identificadas en sujetos HF (173). Por otro lado, deben de ponerse en marcha estudios a nivel celular, que permitan identificar el efecto de la proteína *STAP1* sobre el metabolismo del colesterol.

### **3.2 GENES CAUSALES DE HIPERTRIGLICERIDEMIA**

Junto con las influencias ambientales, variantes genéticas comunes y raras pueden determinar las concentraciones de TG en plasma. Por tanto, identificar genes y variantes genéticas asociadas con la concentración de TG en plasma permite mejorar el entendimiento sobre las vías metabólicas de las lipoproteínas ricas en TG e identificar a los sujetos con alta susceptibilidad al desorden metabólico, lo que permite desarrollar intervenciones terapéuticas para mejorar los niveles de TG, su concentración, disminuyendo así el riesgo de ECV (174).

#### **3.2.1 LPL**

La existencia de la enzima LpL fue descubierta por primera vez en 1943 por Paul y colaboradores, tras encontrar que inyección intravenosa de heparina causaba un aclaramiento de la lipemia alimentaria asociada con la absorción de comida grasa (175). Estudios posteriores revelaron que este efecto de limpieza hepática activada por heparina era debido a una enzima lipolítica con características antiquilomicronémicas (176). A partir de este momento, numerosos estudios se centraron en estudiar el papel de la LpL en el metabolismo y transporte de lípidos y se identificó gradualmente la estructura del gen, la síntesis, la regulación y la función enzimática.

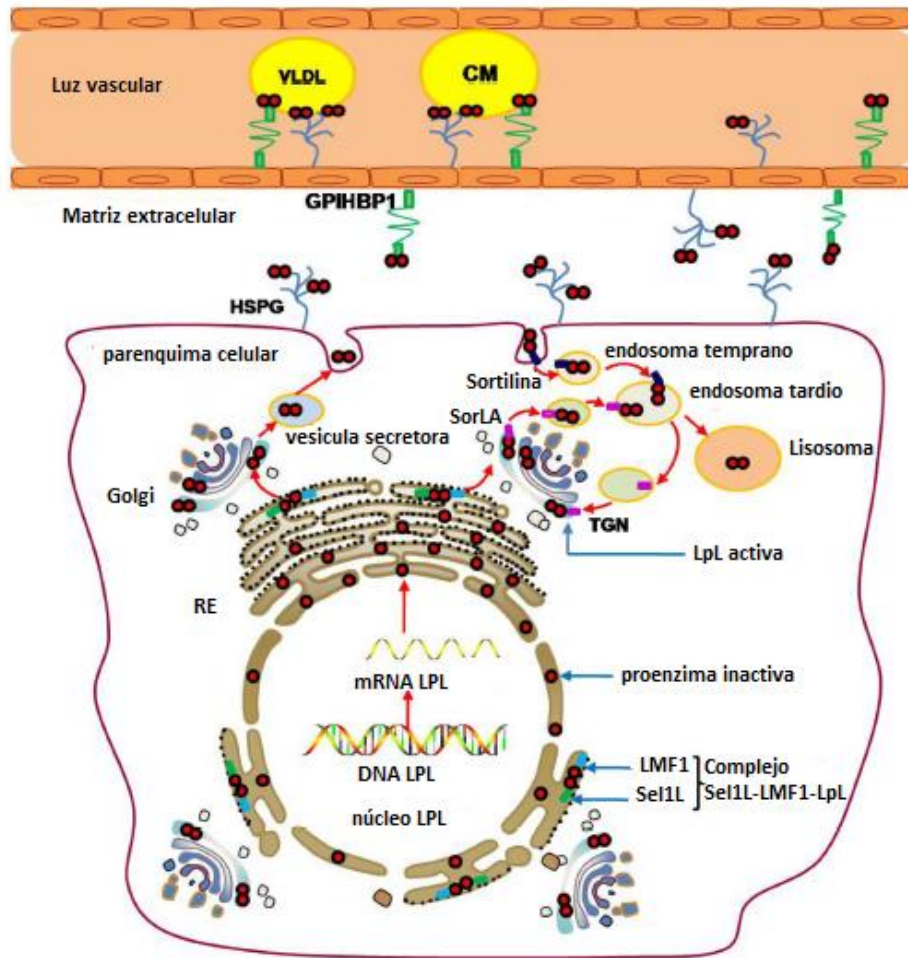
El gen *LPL* se encuentra en el cromosoma 8, codifica 488 aminoácidos, se extiende 30 kb y contiene 10 exones (177). El primer exón codifica una larga región 5'UTR de 188 nucleótidos,

todo el péptido señal y los 2 primeros aminoácidos de la proteína madura. El segundo exón codifica el dominio proteico que se une a la lipoproteína. El cuarto exón contiene la serina y residuos flanqueantes que se han identificado previamente como la región de unión a lípidos (178). El quinto exón codifica la secuencia de Gly154-Gly231 de la proteína madura, que está involucrada en el proceso de catabolismo. El sexto y noveno exones codifican regiones proteicas ricas en aminoácidos básicos y que se cree que están involucrados en el anclaje de la enzima al endotelio capilar por medio de la interacción con la heparin sulfato. El gen LPL codifica una proteína de 55 kb, dimérica, que solo será funcionalmente activa al formar un homodímero. La disociación de los homodímeros, dará lugar a una pérdida de su función catalítica (179).

La LpL se sintetiza y secreta principalmente en el RE de una variedad de células parenquimatosas, incluyendo miocitos, adipocitos, células del músculo esquelético y macrófagos. En el RE la LpL es una proenzima monomérica inactiva, que por medio de la proteína LMF1, proteína en ubicada en la membrana del RE, conseguirá la maduración postraducciona de la LpL, logrando un su correcto pliegue terciario y el ensamblaje de los homodímeros (180). Las LpL con un plegamiento parcial o incorrecto serán degradadas en el RE. La proteína Sel1L, es una proteína adaptadora esencial involucrada en el sistema de degradación del RE. Estudios recientes han demostrado que Sel1L, forma un complejo funcional con LpL-LMF1 en la membrana del RE indispensable en el plegamiento y secreción de LpL. Sin presencia de Sel1L en el RE, los dímeros de LpL, son inestables y quedarán atrapados en el RE, formando agregados que serán degradados parcialmente por autofagia (181). La mayoría de los homodímero de LpL con un plegamiento correcto y con actividad enzimática, saldrán del RE hacia el aparato de Golgi. La LpL puede enlazar con el receptor relacionado con la sortilina (SorLA), que media la actividad endocítica y el tráfico entre vesículas intracelulares (182). Alternativamente, la LpL puede secretarse desde el parénquima celular en una vía constitutiva (183). Tras ser secretada, la LpL activa se une a los proteoglicanos de heparan sulfato, este paso es clave, ya que las cadenas laterales del heparan sulfato son cruciales para mantener la actividad de la proteína. Recientemente, se ha descubierto que el anclaje de LpL a la superficie endotelial se produce por medio de la glicoproteína GPIHBP1, que es la responsable también del transporte de LpL desde el espacio intersticial a la superficie de la célula endotelial y se estudiará con más detalle más adelante en este mismo capítulo (15) (Figura 20).



Figura 20: Biosíntesis, secreción y transporte de LpL.



Adaptada de He PP y cols (184). Después de sintetizarse y secretarse como una proenzima monomérica e inactiva en el RE rugoso de células parenquimatosas, la LpL se ensambla en homodímeros gracias a la ayuda de LMF1. Sel1L forma un complejo funcional con LpL-LMF1 en la membrana del RE, que ayuda a regular las LpL nacientes y permite su salida del RE. Por un lado, LpL se une a SorLA y luego se introduce en endosomas tardíos, gracias a la acción de SorLA. Por otro lado, otra parte de LpL puede secretarse fuera de las células parenquimatosas en una vía constitutiva. La LpL se une a los proteoglicanos de heparan sulfato en la superficie de las células del parénquima y se transloca por acción de GPIHBP1, que transporta LpL desde el espacio intersticial hasta la luz endotelial, donde se unirá a QM y VLDL y provocará la hidrólisis de los TG que contienen. Posteriormente la enzima se transmite a la superficie apical para facilitar la hidrólisis de las lipoproteínas. Finalmente, la sortilina puede transferir exceso de LpL a endosomas tempranos o tardíos, donde sufrirán su degradación lisosomal.

La LpL se expresa principalmente en corazón, músculo esquelético, tejido adiposo, sistema nervioso, hígado, glándula mamaria, riñón, glándulas suprarrenales, células pancreáticas, pulmón y bazo (185,186). La producción de LpL está altamente regulada en la transcripción, post-transcripción y mecanismos postraduccionales (179). La síntesis, procesamiento

(glicosilación) y secreción de LpL está bajo control hormonal. Se ha demostrado en estudios con ratas que la adición de insulina, genera un aumento de la actividad de LpL. En humanos, el aumento de la ingesta de carbohidratos genera un incremento de LpL de 3 a 6 h después, aunque el papel de la insulina todavía no es claro (187). También se ha demostrado que el sistema adrenérgico disminuye la actividad de LpL en tejido adiposo y aumenta la síntesis de LpL en el músculo. La LpL hidroliza los TG de QM y VLDL liberando AGL, que podrán ser usados para re-sintetizar de nuevo TG en tejido adiposo o ser oxidados en el músculo. La acción de LpL es dependiente de apo C-II, un cofactor esencial para su activación. Sin embargo, la apo C-III puede inhibir la lipólisis mediante inactivación de LpL. A nivel post-transcripcional, estudios recientes han descubierto diferentes microRNA (miR), como los miR-467b, miR-29a, que son reguladores de LpL en hepatocitos inducidos por esteatosis y células dendríticas respectivamente (188,189).

La LpL y su cofactor, apo C-II, se expresan en el cerebro y SNC de diferentes mamíferos. Además, la LpL es un importante regulador de la homeostasis lipídica neuronal, por lo que la deficiencia de LpL es probable que esté asociada con un deterioro del aprendizaje y la memoria. En este mismo sentido, existen diferentes polimorfismos como p.(Asn291Ser) y p.(Ser447\*) de LpL asociados con un mayor riesgo de padecer Alzheimer (190,191). Dado el vínculo de LpL con el metabolismo de las lipoproteínas, diferentes estudios han evaluado el papel de LpL como factor de riesgo de ECV y en esa línea Jensen y colaboradores encontraron que la variante p.(Ser447\*) se encuentra asociada con un menor riesgo de ECV (192).

La LpL juega un papel fundamental en el metabolismo de lipídico y está asociado con numerosas enfermedades, por lo que se ha establecido como una posible diana terapéutica. Fármacos con Orlistat, Lipstatin y Cetilistat de amplio uso en el tratamiento enfermedades asociadas a la obesidad, arteriosclerosis y ECV, pueden inhibir la expresión de LpL (193,194). Recientemente, se ha desarrollado un sintetizador químico de LpL, NO-1886, que suprime la acumulación de lípidos y aumenta la expresión de LpL a nivel renal, mejorando la proteinuria y ejerciendo efectos reno-protectores. NO-1886 también aumenta la expresión de NPC1L1 en los macrófagos, lo que indica el potencial efecto que puede tener LpL en el manteniendo del colesterol intracelular. Vale la pena señalar que la LpL juega un papel pro o antiaterogénico en función del tejido que deriva y del entorno local (195).

La LpL es un atractivo objetivo terapéutico para la intervención farmacológica y clínica. La mayor comprensión de su biosíntesis, secreción y transporte ha permitido en los últimos años la identificación de varias proteínas reguladoras como LMF1, GPIHBP1, que también podrán ser objetivos terapéuticos. Sin embargo, la relación entre la arteriosclerosis, enfermedades

neurodegenerativas y LpL es compleja y requiere de nuevos estudios, que permita el desarrollo de nuevas perspectivas terapéuticas.

### 3.2.2 APOA5

La apo A-V es un miembro de la familia de las apos plasmáticas asociadas con VLDL, HDL y en menor medida QM. El gen que codifica para la apo A-V (*APOA5*) fue identificado bioinformáticamente dentro de la agrupación génica *APOA5-APOA4-APOC3-APOA1* en el cromosoma 11 en 2001 (196). El gen *APOA5* de 1,9 Kb está formado por 4 exones que codifican 366 aminoácidos. Se expresa exclusivamente en el hígado, particularmente en zonas de regeneración hepática. El 80% de apo A-V está asociado con QMs, VLDLs y HDLs, mientras que aproximadamente el 20% es retenido a nivel intrahepático asociado con gotas lipídicas. La apo A-V en plasma afecta, probablemente, a la distribución de moléculas de apo C-III en VLDL, aunque el papel intracelular de apo A-V no está claro. Presumiblemente, apo A-V afecta directamente al ensamblaje intracelular de VLDL o a su secreción a nivel hepático (197).

La concentración plasmática de apo A-V es muy baja, con rangos entre 0,1 a 0,4 µg/mL. El papel de apo A-V todavía debe ser dilucidado. Ensayos celulares sugieren que el complejo QM/apo A-V, pero sin partículas de apo E y apo C-III está ávidamente unido al dominio ácido de GPIHPB1, aunque apo A-V puede no competir con el LpL unido. Por otro lado, los QM unidos requieren tanto de Ly6, como del dominio ácido. Así los QMs se unen a GPIHPB1 en presencia tan solo de LpL, y apo A-V no parece desempeñar un papel esencial en este proceso. Otros estudios sugieren que el efecto de apo A-V en LpL podría ser por acción directa sobre los proteoglicanos enlazados a LpL o la unión a la lipoproteína HDL (198).

Se ha observado en ratones que la sobreexpresión de *APOA5* disminuye marcadamente la concentración de TG plasmáticos, mientras que en ratones KO para *APOA5* se observa una HTG grave (los TG se ven multiplicados por cuatro, respecto a concentraciones basales) (93,197). La expresión de *APOA5* está regulada por factores transcripcionales, que están involucrados en las lipoproteínas plasmáticas y en la homeostasis de la glucosa, sugiriendo que responde a múltiples señales ambientales (199). La apoA-V es claramente crucial en el metabolismo de las lipoproteínas ricas en TG tanto en ratones como en humanos, aunque su regulación y funciones moleculares son todavía desconocidas. Algunas variantes comunes de *APOA5* se han asociado con los niveles de TG en plasma en numerosas etnias.

Los análisis funcionales realizados en las mutaciones en *APOA5* que se asocian con HTG, han revelado generalmente una pérdida de la actividad de LpL, particularmente cuando existe mutaciones en el extremo C-terminal, que interfiere con la capacidad de apo A-V para

interactuar con lípidos y lipoproteínas (200). Mutaciones en *APOA5* de los aminoácidos Gly255, Leu231 y Cys185 han demostrado tener efectos parciales sobre LpL, sin embargo, las mutaciones que afectan a los aminoácidos Cys271, X139, X148, Delta149 y Delta147 presentan un escaso efecto sobre la actividad de LpL. La mutación p.(Gly185Cys) juega un papel importante en la hidrólisis mediada por LpL, produciendo una disminución de la actividad de LpL y una modulación concomitante de TG. Se han encontrado además tres mutaciones causales de HTG, como p.(Ser232\_Leu235), p.(Leu234Pro) y p.(Asp332Valfs\*4). Un estudio reciente reveló el papel de la mutación p.(Gly185Cys) en el desarrollo de una HTG severa durante el desarrollo de la gestación. Tonelero y colaboradores demostraron nuevas mutaciones que generaban una pérdida de función de *APOA5* en pacientes con HTG grave, como son las mutaciones de p.(Leu155Pro) de *LPL* y la mutación p.(Gln275\*) en *APOA5*.

El papel de *APOA5* en el metabolismo de TG es notable, sin embargo, son necesario nuevos estudios que expliquen el mecanismo molecular de apo A-V.

### 3.2.3 LMF1

Las proteínas LpL, LH y lipasa endotelial son enzimas lipolíticas involucradas en el metabolismo lipídico. En 1983 fue descrita por primera vez una mutación en ratón denominada deficiencia combinada de lipasa (*cl*) que cursaba con deficiencia tanto de LpL como de LH (201). Los ratones homocigotos para la mutación *cl* desarrollaban hiperquilomicronemia postparto y morían por isquemia y cianosis debida a un aumento de la viscosidad sanguínea (13). El fenotipo *cl* fue mapeado en el cromosoma 17 usando análisis de ligamiento, y posteriormente se identificó el gen *Tmen112*, renombrándolo como *Lmf1* (factor 1 de maduración de la lipasa) (13). Estudios posteriores han demostrado que *Lmf1* está localizado en tejidos que expresan LpL o HL. La proteína *Lmf1* se localiza en la membrana del RE estimulando la maduración tanto de LpL como de HL (202).

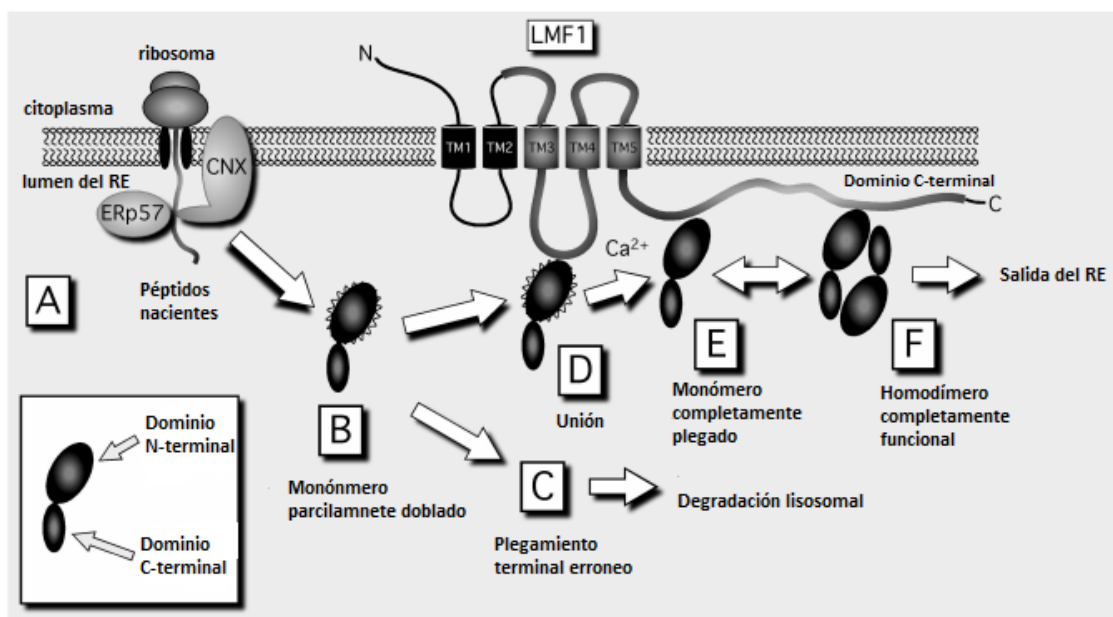
La mutación *cl* produce un truncamiento prematuro de *Lmf1* que afecta a un dominio conservado de función incierta, que impide la maduración de las lipasas, independientemente de la localización subcelular y sin requerir ninguna intervención directa (202). Se ha demostrado, en estudios, *in vitro* que mutaciones en *Lmf1* comprometen la actividad de la proteína (203).

En humanos se ha identificado el gen *LMF1*, homólogo al de los ratones y, localizado en el cromosoma 16, como un candidato para el metabolismo de TG. En un estudio realizado con 11 pacientes con hiperquilomicronemia y un defecto en la actividad de LpL se identificó la mutación p.(Tyr439\*) que genera un codón de parada en el exón 9 de *LMF1* en un paciente que presentaba episodios de pancreatitis recurrente y una concentración de TG de 30 mmol/l. Además, se

identificó la mutación p.(Trp464\*) en pacientes con una actividad disminuida en LpL y HL en un 76% y un 27% respectivamente (13). Así, *LMF1* parece ser un gen clave que regula el metabolismo de TG (204).

Se cree que las mutaciones identificadas truncan el dominio C- terminal, que indica el papel esencial de esta región en la maduración de las lipasas (Figura 21). Mientras que la mutación p.(Tyr439\*) causa una pérdida completa de la funcionalidad, la mutación p.(Trp464\*) es menos severa, generando tan sólo una pérdida de la funcionalidad del 60% (205).

**Figura 21: Papel del factor de maduración de la lipasa 1 en el ensamblaje y maduración de la lipoprotein lipasa**

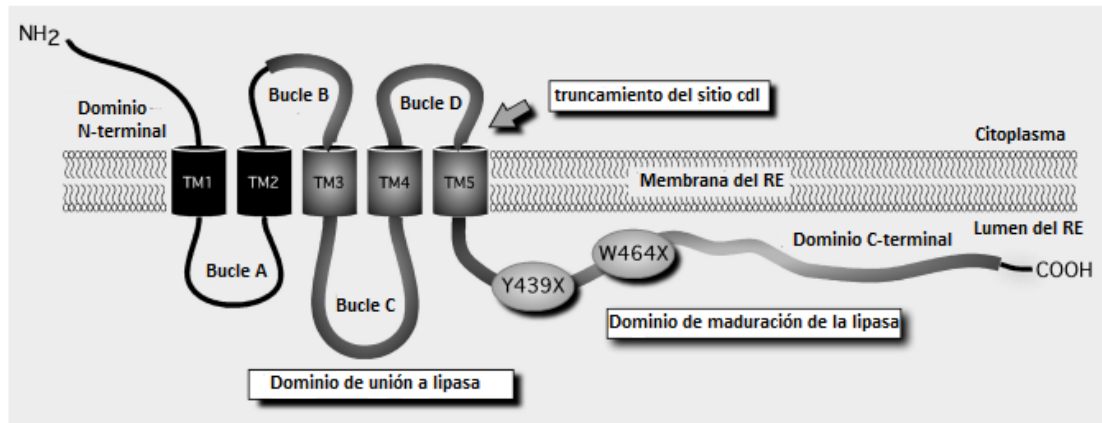


Adaptada de Doolittle y cols (180). Las chaperonas y factores de plegamiento ayudan al péptido naciente, tan pronto como los péptidos penetran en la luz del RE, el translocón Sec61 ayuda a su plegamiento. Esto proporciona vigilancia en la maduración de las proteínas, asegurando que todas las cadenas nacientes permanecen en el RE hasta su completo plegamiento. Por otra parte, las proteínas mal plegadas son dirigidas por diferentes vías de degradación del RE (denominada ERAD) a la degradación lisosomal, lo que proporciona garantías contra las proteínas mal formadas. Además, la maduración de la lipasa requiere de la chaperona Calnexina (CNX), que es un factor general que es requerida en la maduración eficiente de la lipasa. LMF1 probablemente promueve las etapas posteriores de plegamiento y ensamblaje en las lipasas, mientras CNX juega un importante papel en la estabilización de la salida de la porción N- terminal en las lipasas durante su plegamiento.

Lmf1 es una proteína transmembrana localizada en el RE. La proteína está formada por 5 segmentos transmembrana, que separan la proteína en 6 dominios, la mitad de los cuales dan al lumen del retículo endoplasmático y la otra mitad al citoplasma. LMF1 media el ensamblaje de los homodímeros de LpL y protege a las cadenas nacientes de LpL de interacciones inter o

intra cadenas. Los defectos en Lmf1 producen una deficiencia combinada de LpL y HL. Ambas, junto con la lipasa endotelial, son lipasas homodiméricas, pero no afecta a la lipasa pancreática, monomérica. Por tanto, la proteína Lmf1 interviene en la dimerización y maduración de estas lipasas, para convertirlas en enzimas activas (Figura 22) (206).

**Figura 22: Estructura del factor de maduración de la lipasa.**



Adaptada de Doolittle y cols (180), LMF1 puede unirse a las proteínas y estabilizar sus formas, en contraste, las lipasas malformadas no pueden asociarse con Lmf1 y terminarán en ERAD. De hecho, con la mutación en cld, los homodímeros de LPL disminuyen drásticamente, mientras que las lipasas malformadas se acumulan, así la disfuncionalidad de Lmf1 genera un plegamiento insuficiente.

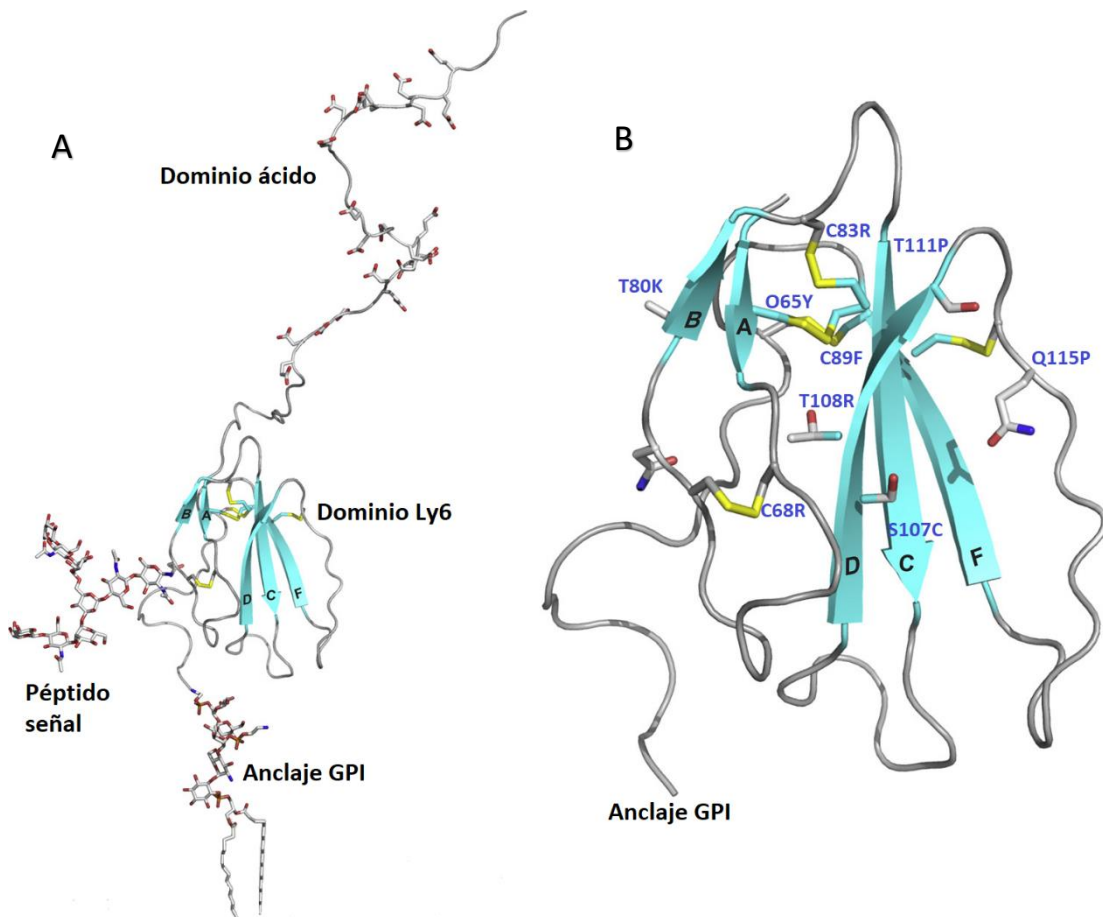
### 3.2.4 GPIHBP1

El gen *GPIHBP1* codifica una glicoproteína unida a glicosifosfatidilinositol, perteneciente a la familia linfocitaria Ly6, localizada en la superficie basolateral y apical de células endoteliales (15). *GPIHBP1* es el gen descubierto más recientemente involucrado en el metabolismo de los TG, siendo el responsable del transporte de LpL desde el espacio intersticial a la superficie endotelial de la cara luminal. La GPIHBP1 es una glicoproteína compuesta por 184 aminoácidos que contiene 4 dominios principales: el péptido señal, que se elimina dentro del RE; el dominio ácido, en el cual 21 de 26 aminoácidos son aspartatos o glutamatos; el dominio Ly6, que contiene 10 cisteínas; y el dominio de anclaje GPI, este dominio está compuesto por una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos que son eliminados en el RE y sustituidos por el anclaje GPI (figura 23A) (207).

Dos de estos dominios, el dominio Ly6 y el dominio ácido están involucrados en el tráfico de GPIHBP1 a la superficie de la célula y en la unión de LpL y QM (208). Aunque se han identificado mutaciones causales de quilomicronemia en todos los dominios, la mayoría se encuentran en el dominio Ly6. La mayoría de estas mutaciones causales de enfermedad, eliminan las cisteínas

conservadas del dominio Ly6, por ejemplo, p.(Cys65Tyr), p.(Cys68Arg), p.(Cys83Arg) y p.(Cys89Phe); o introducen una nueva cisteína, como por ejemplo p.(Ser107Cys).

**Figura 23: Características estructurales de GPIHBP1 y ubicaciones de las mutaciones clínicamente significativas en GPIHBP1**

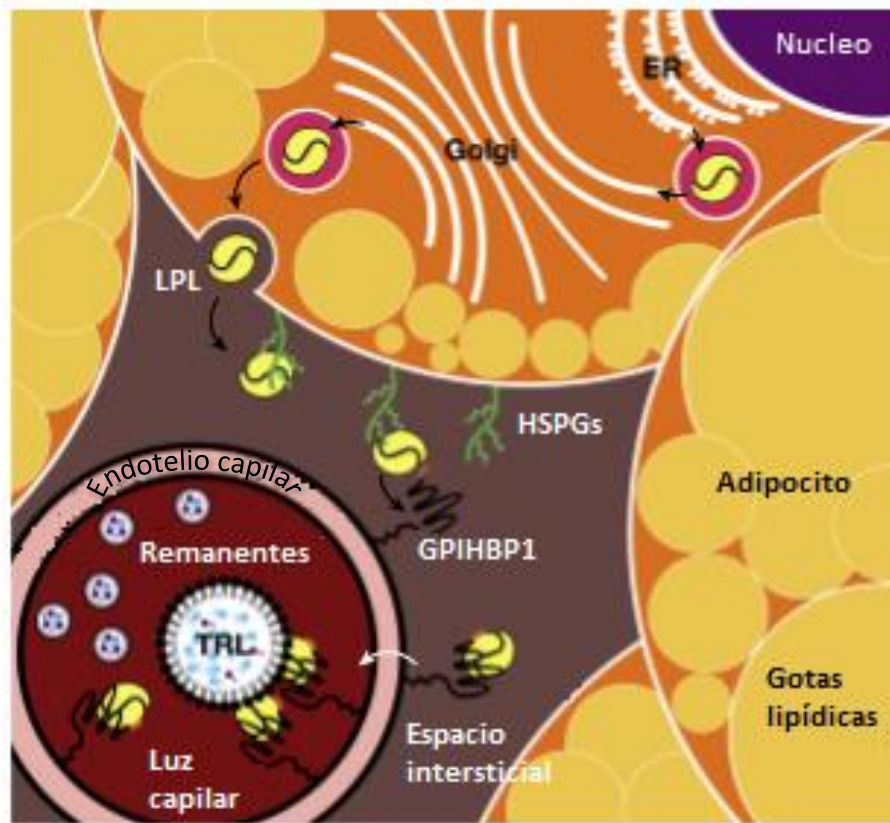


Adaptada de Fong y cols (207). Modelo molecular de GPIHBP1. GPIHBP1 tiene un dominio ácido altamente desordenado, un dominio Ly6 altamente ordenado y el anclaje GPI que se une a membrana plasmática. Los aminoácidos glutamato o aspartato del dominio ácido se encuentran señalizados con color rojo. Las hojas  $\beta$  del dominio Ly6 están coloreadas en azul y numeradas de la A-F, como se ha descrito anteriormente (209). Los enlaces disulfuro del dominio Ly6 están señalados en amarillo. La figura B muestra las mutaciones de identificadas actualmente como causales de quilomiconemia.

Todas estas mutaciones perjudican la formación del enlace disulfuro, dando lugar a la formación de dímeros y multidímeros de GPIHBP1 (210). Las mutaciones p.(Gln115Pro) y p.(Thr111Pro) introducen una prolina adyacente a una cisteína conservada. Mención especial merecen la mutación, p.(Thr80Lys), que elimina el sitio de glicosilación del dominio Ly6 y se espera que reduzca el tráfico de GPIHBP1 hacia la membrana plasmática (Figura 23B) (211); y la mutación p.(Gly175Arg), que introduce un cambio de aminoácido en el dominio C-terminal, que puede

interferir con la adición de anclaje GPI, aunque son necesarios más estudios para confirmar el efecto molecular de dicha mutación (212).

**Figura 24: Papel de GPIHBP1 en el metabolismo de los TG.**



Adaptada de Fong y cols. (207). La LpL es sintetizada en el RE y tras su maduración en el aparato de Golgi es expulsada al espacio intersticial, donde será capturada por los proteoglicanos heparán sulfato (HSPGs). Rápidamente serán captadas por la GPIHBP1 localizada en la superficie de las células endoteliales capilares. El dominio Ly6 de GPIHBP1 es el principal responsable de la unión de alta afinidad a LpL, pero el dominio ácido (marcado en naranja) juega un papel accesorio en la captura y vinculación de la LpL. El dominio ácido también estabiliza la actividad de LpL. La LpL unida a GPIHBP1 es internalizada al interior de la luz capilar, donde se encargará de la hidrólisis de TG de partículas ricas en TG (TRL), liberando partículas remanentes.

La proteína GPIHBP1 se encuentra expresada en todos los tejidos periféricos, pero se localiza en altas concentraciones en el tejido adiposo marrón y corazón, indicando los altos niveles de transcripción de LpL en estos tejidos (14). El primer estudio que demostró la necesidad de GPIHBP1 para la correcta localización de LpL en la luz capilar, se hizo con ratones *gpihbp1*<sup>-/-</sup> donde se demostró que en ratones *wild-type* la LpL se liberaba rápidamente tras una inyección venosa de heparina y muy lentamente en ratones *gpihbp1*<sup>-/-</sup> (213). Estudios posteriores mostraron que en ausencia de GPIHBP1, la LpL se localizaba en tejidos intersticiales



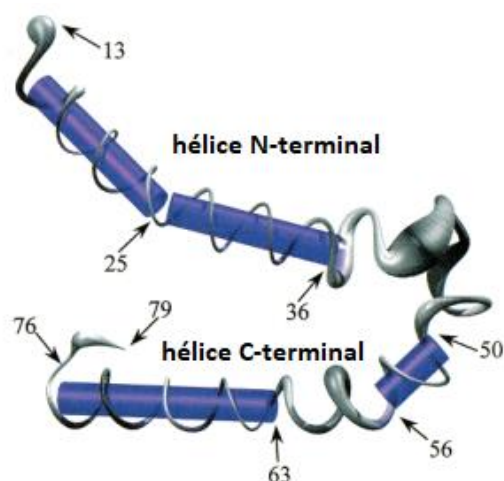
(presumiblemente unida a los proteoglicanos y alejada de la superficie endotelial) demostrando que GPIHBP1 era capaz de recoger LpL desde un lado de la monocapa de las células endoteliales e internalizarlo en la luz del capilar, siendo por tanto, la proteína responsable de la entrada de la LpL en el interior de los capilares (15) (Figura 24).

### 3.2.5 APOC-II

La apo C-II es un miembro de la familia de las apos que forman parte de QM, VLDL, LDL y HDL (214). El gen que codifica la apo C-II (*APOC2*) se identificó dentro de la agrupación génica *APOE-APOC1-APOC4-APOC2*. La apo C-II humana contiene 79 aminoácidos, un peso molecular de 8916 Da, 3  $\alpha$ -hélices anfipáticas, una región N-terminal de naturaleza anfipática, donde se localiza el dominio de unión a lípidos y un dominio C-terminal, que es el responsable de la activación de LpL (215). Las técnicas de resonancia magnética nuclear mostraron que los 12 primeros residuos de apo C-II son estructuralmente heterogéneos, mientras que el resto de la proteína forma una estructura helicoidal (216). La estructura de apo C-II comprende dos regiones  $\alpha$ -hélice, una en extremo N-terminal, que abarca los residuos del 14 al 38 y otra en el dominio C-terminal, que se extiende desde el residuo 50 a 76. Una región altamente desordenada vincula esos dominios helicoidales (Figura 25). Estudios estructurales de la apo C-II mostraron la importancia del aminoácido Leucina72 y otros aminoácidos hidrofóbicos ubicados en la  $\alpha$ -hélice de la región C-terminal para la activación de LpL. En este sentido, estudios de mutagénesis dirigida que generaban una sustitución de la Leu en la posición 72 por una alanina mostraron que este cambio no afecta a la afinidad de unión ni a su capacidad de activar LpL, lo que se puede explicar ya que ambos aminoácidos son hidrofóbicos y formadores de  $\alpha$ -hélice (217). Por el contrario, la sustitución de este residuo por una prolina, rompe la estructura  $\alpha$ -hélice del dominio C-terminal y genera una actividad reducida de LpL (218).

La apo C-II se expresa sobre todo a nivel hepático y en menor medida en intestino y páncreas (219). Además, se ha demostrado que la expresión a nivel hepático aumenta tras la ingesta de una dieta rica en ácidos grasos (220). Los factores que influyen en la disociación y el intercambio de las apo C-II entre las lipoproteínas no han sido bien definidos todavía. En sujetos normolipémicos, se encontró apo C-II principalmente distribuida en HDL, mientras que en sujetos con HTG se distribuye predominantemente en VLDL y LDL (221). Apo C-II en sujetos normolipémicos tiene una concentración de 4 mg/dL y juega un papel fundamental como activador de LpL (222).

**Figura 25: Estructura representativa calculada de apo C-II**



Adaptada de MacRaid y cols (216). En la apo c-II existen tres regiones hélice particularmente bien definidas, que comprenden los residuos 16-36, 50-56 y 63-76, representadas en esta imagen mediante cilindros.

La deficiencia de apo C-II se caracteriza por unos elevados niveles plasmáticos de TG, VLDL y QM y concentraciones disminuidas de LDL, IDL, HDL, apo B y apo A-1 (223). Estos pacientes también presentan LDL más densas y aterogénicas y sub-fracciones de HDL maduras disminuidas, esto último es debido a que la maduración de la HDL está mediada en parte por la acción de la LpL (durante el catabolismo de partículas ricas en TG, los componentes de superficie de estas partículas se transmiten a HDL) y por tanto es necesario la presencia de apo C-II para la maduración de las HDL (224). La deficiencia de apo C-II es un defecto autosómico recesivo, en el cual los sujetos heterocigotos presentan menores alteraciones del aclaramiento de TG, pero sin cambios significativos en los niveles plasmáticos en ayunas de lípidos totales, lipoproteínas y apos (225). Además, hay que destacar que altas concentraciones de apo C-II impiden la actividad de LpL en lugar de estimularla, generando una HTG grave. Este efecto posiblemente se deba a que el exceso de apo C-II se interpone en el acceso físico de LpL a las lipoproteínas ricas en TG impidiendo así el aclaramiento de QM y VLDL remanentes (226).

Se han descrito numerosas mutaciones (cambio de aminoácido, truncamiento de la proteína, región de *splicing*, incluso en el promotor) en el gen de *APOC2* que generan una síntesis deficiente o una producción no funcional de apo C-II, cursando con diferentes fenotipos clínicos, como HTG, quilomicronemia o dislipemia (227–229).

La apo C-II ha sido identificada en lesiones arterioscleróticas, donde se co-localiza con macrófagos, formando fibrillas de amiloide. Además, concentraciones elevadas de apo C-II conllevan un aumento de los niveles de TG y alteran la distribución de HDL, por lo que se ha

hipotetizado que los niveles de apo C-II pueden ser un factor de riesgo independiente en el desarrollo de ECV (230). En esta línea, un estudio llevado a cabo por Gerber y colaboradores con 352 sujetos con ECV y 395 controles, demostró que los sujetos con ECV presentaban mayores concentraciones de apo C-II en plasma. Sin embargo, son necesarios otros estudios epidemiológicos que confirmen el papel de apo C-II como factor de riesgo para el desarrollo de ECV (231).

### 3.2.6 APOC-III

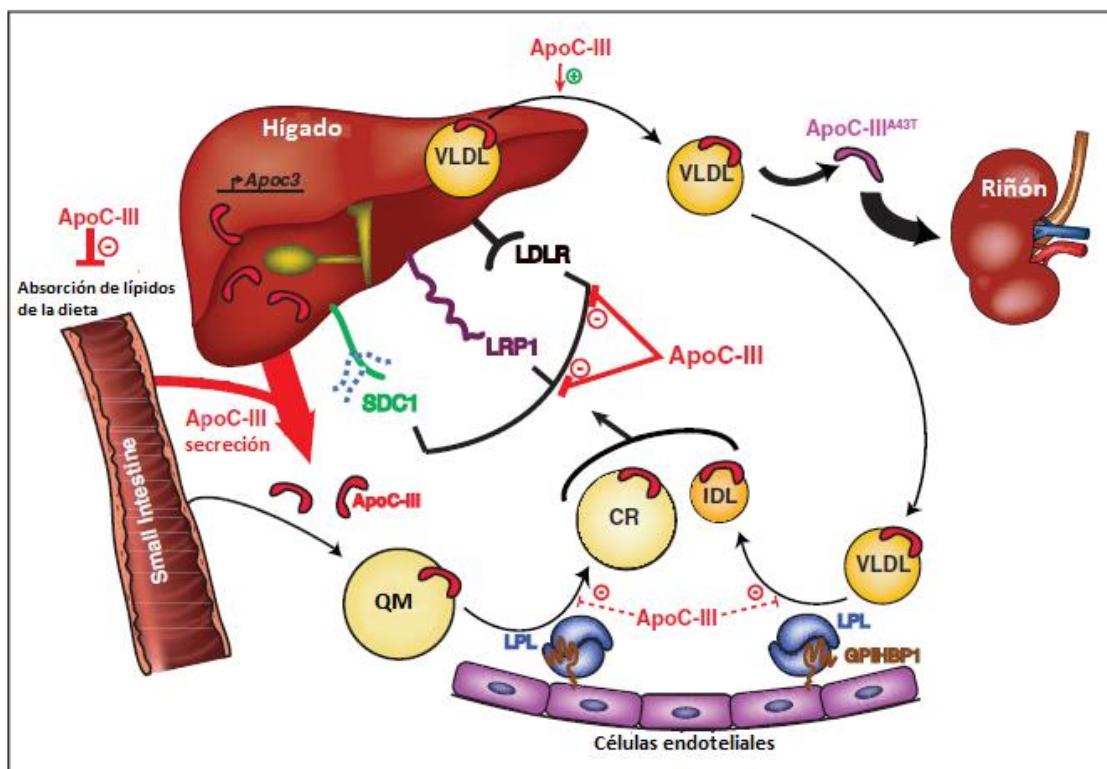
La apo C-III es una glicoproteína de 8,8 KDa secretada en el hígado y en menor medida en el intestino, asociada con partículas ricas en TG, HDL y LDL., y que correlaciona positivamente con los niveles de TG en plasma y riesgo de ECV (232). La apo C-III esta codificada por el gen *APOC3*, localizado dentro de la agrupación genética *APOA1-APOC3-APOA5-APOA4*, ubicada en el cromosoma 11. La expresión de apo C-III en hepatocitos está regulada por muchos componentes metabólicos y nutricionales, incluyendo la glucosa circulante, insulina y los ácidos grasos. Los niveles elevados de glucosa inducen la expresión de apo C-III en hígado a través de la activación del factor nuclear hepatocito 4 alfa (HNF4 $\alpha$ ). Además, individuos que presentan una mutación en heterocigosis que provoca el aumento de la expresión del gen HNF4 $\alpha$ , tienen los niveles plasmáticos de Apo C-III significativamente reducidos (233). Del mismo modo, niveles elevados de ácidos grasos saturados aumentan la los niveles plasmáticos de apo C-III por medio del receptor activado de proliferación de peroxisoma (PPAR) (234).

La mayoría de estudios se centran en evaluar el efecto de los defectos genéticos de *APOC3* sobre el metabolismo de las Partículas ricas en TG. La sobreexpresión de apo C-III genera QM más pequeños, debido a una reducción de la absorción de lípidos en la dieta y la esterificación de ácidos grasos a nivel intestinal (235). La relevancia clínica de apo C-III fue indicada hace una década en estudios realizados en la comunidad Amish del condado de Lancaster, donde una rara mutación nula de *APOC3* correlacionaba con niveles negativamente con niveles de TG y menor riesgo de ECV (236). Con la llegada de los sistemas de secuenciación masiva, se encontraron nuevas mutaciones nulas o de pérdida de función en *APOC3*, como la mutación p.(Ala43Thr), que reduce la inhibición de LpL, sin alterar la producción de VLDL, mejorando la el aclaramiento de partículas ricas en TG, en sujetos con una fenotipo de hipotrigliceridemia y un menor riesgo cardiovascular (237). En sentido contrario, pacientes con mutaciones de ganancia de función en *APOC3*, como la mutación p.(Gln38Lys), presentan un aumento significativo de sus niveles lipídicos junto con un aumento del riesgo cardiovascular. De hecho, el estudio Framingham demostró que los niveles de apo C-III son un factor de riesgo independiente para el desarrollo

de ECV, indicando que por cada unidad, en mg/dL, de aumento de apo C-III se elevaba el riesgo cardiovascular un 4% (238).

El mecanismo por el cual apo C-III regula los niveles de TG es bastante controvertido. Apo C-III se estableció inicialmente como un inhibidor de LpL, pero también se encontró que promueve la producción de VLDL y obstaculiza la eliminación de partículas ricas en TG a nivel hepático (Figura 18). Apo C-III lleva a cabo la inhibición de LpL compitiendo a por la unión a lípidos. Los residuos aromáticos del dominio C-terminal de apo C-III median la unión a lipoproteínas ricas en TG, impidiendo así la unión de LpL con estas lipoproteínas. Es importante destacar que apo C-III tiene efecto sobre la actividad de LpL solo cuando su concentración es 5 veces superior a la concentración de apo C-II, condiciones que casi si nunca se observan en situaciones fisiológicas (239) (Figura 26).

Figura 26: Descripción general del papel de apo C-III sobre el metabolismo de los TG.



Adapta de Ramms y cols.(240). Apo C-III se produce en el hígado y en menor medida en el intestino. Tras su secreción, apo C-III se une a QM, VLDL, LDL y HDL y afecta a su metabolismo.

Un estudio clínico realizado en pacientes con quilomicronemia, con mutaciones funcionales en los genes causales de HTG (*LPL*, *APOA5*, *LMF1*, *GPIIIBP1* y *APOC2*) y con niveles de TG >2000 mg/dL, a los cuales se les administro un fármaco, denominado Volanesorsen que inhibe la expresión de *APOC3*, presentaron reducciones drásticas de sus niveles de TG, llegando a 265

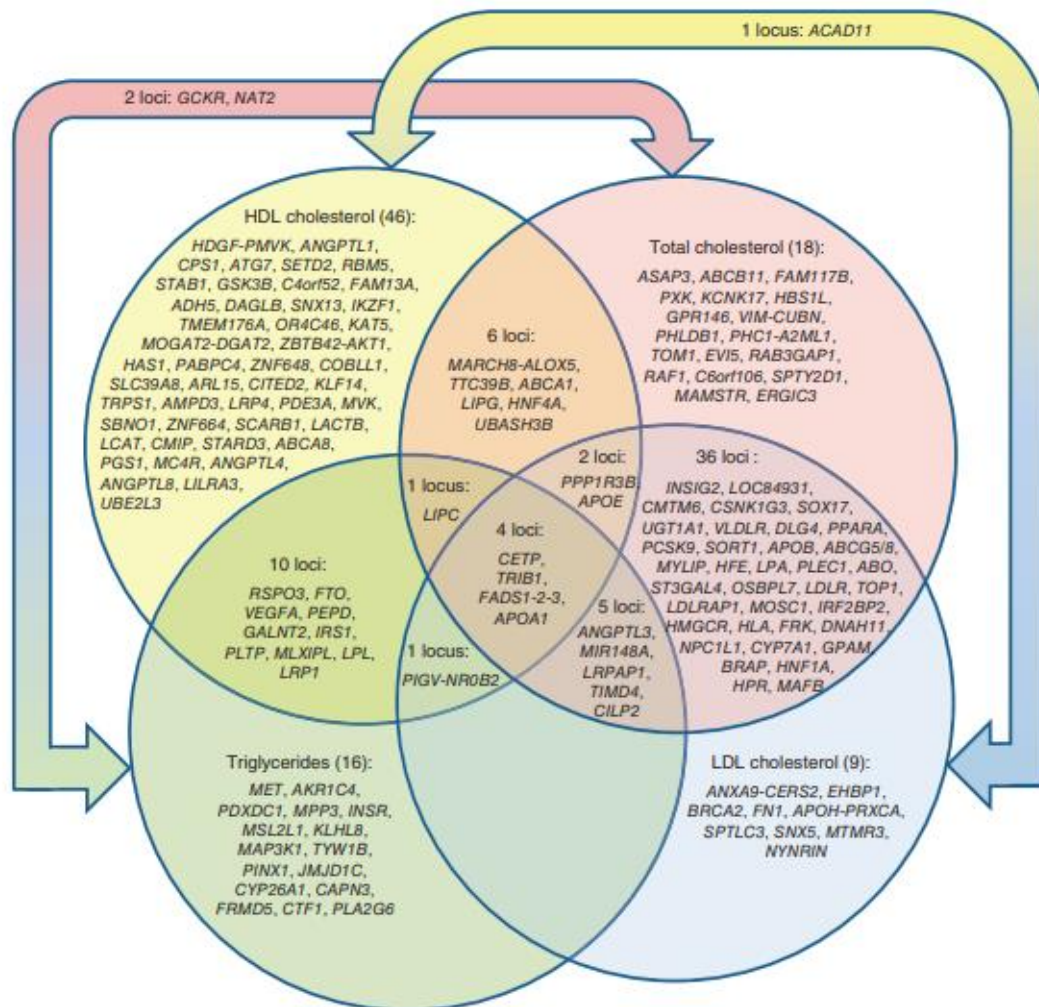
mg/dL. Estos datos, siguieron que apo C-III podría actuar de forma independiente sobre el metabolismo de los TG (241).

### 3.3 OTROS *LOCI* ASOCIADOS A DISLIPEMIAS

Los estudios de asociación de la variabilidad genética humana con los niveles lipídicos permiten identificar nuevas dianas terapéuticas para el diagnóstico, tratamiento y prevención de las enfermedades del corazón. El entendimiento de la arquitectura genética, mediante el estudio de todas las variantes genéticas que puedan tener efecto sobre las concentraciones plasmáticas de TG, CT, cLDL o cHDL se ha visto incrementado substancialmente mediante el estudio de los GWAS (*Genome Wide Association Study*). Los GWAS muestran asociaciones entre SNVs con frecuencias superiores al 1% y otros rasgos cualitativos y discretos (96,242). Gracias a estos estudios se han identificado nuevas regiones genómicas que pueden relacionarse con los TG, CT, cHDL o cLDL para estudios posteriores (243).

Los GWAS permiten identificar nuevos loci, mediante el análisis de asociación de variaciones genéticas en individuos no relacionados o por medio de la investigación de formas mendelianas en familias con dislipemias primarias. Los primeros estudios GWAS realizados por Kathiresan y colaboradores (245), secuenciaron el genoma completo de 1049 sujetos procedentes del estudio Framingham e identificaron de 94 a 149 SNV ( $p < 0,001$ ) asociados con los niveles lipídicos. En esta misma línea, Willer y colaboradores (246) realizaron la secuenciación de 8816 individuos, en el cual identificaron 11 genes, previamente asociados con el metabolismo lipídico y 11 genes con mayor frecuencia en los pacientes con ECV que los sujetos controles. En 2010, Teslovich y cols (96) identificaron 95 *loci* asociados ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) en más de 100.000 individuos de ascendencia europea, de los cuales 59 muestran asociación significativa con los niveles lipídicos. En 2013, Willer y colaboradores (244) reclutaron 94.595 sujetos pertenecientes a 23 GWAS y 93.982 sujetos incluidos en 37 estudios de genotipado y evaluaron el efecto de cada SNV sobre los niveles lipídicos ajustados por sexo y edad. Encontraron 157 loci asociados con los niveles lipídicos en sangre ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ), de los cuales 62 de ellos aparecían relacionados con los lípidos por primera vez (Figura 27).

Figura 27: Superposición de loci asociados con diferentes rasgos lipídicos.



Adaptada de Willer y cols (244). El diagrama de Venn ilustra el número de loci que se encuentran asociados con múltiples rasgos lipídicos. El número de loci asociados con cada rasgo se indica entre paréntesis. Los loci que muestran su asociación con dos o más rasgos se muestran en el segmento apropiado.

Son numerosos los genes asociados con los niveles de lípidos, mención especial, merece el gen *SORT1*, ya que forma parte de uno de los artículos que componen esta tesis. El gen *SORT1* codifica la sortilina que está implicada en la homeostasis del colesterol en humanos. La sortilina aumenta la producción hepática de VLDL que actúa como un precursor de LDL en plasma. Esta proteína también mejora la secreción de PCSK9 de los hepatocitos, lo que provocará la degradación del receptor de LDL. Ambas acciones de la sortilina conducen a una elevación del nivel de cLDL en plasma (72). Más recientemente, también se demostró que la sortilina reduce la secreción de apo B por el hígado (247). Varios estudios han identificado una asociación significativa de variantes del gen *SORT1* con el nivel de cLDL en diferentes poblaciones (248,249). Otros dos genes, como *CELSR2* y *PSRC1* están mapeados en el mismo locus que el gen *SORT1* en

el cromosoma 1. La asociación de los SNVs en este locus con los rasgos lipídicos plasmáticos, especialmente con los niveles de cLDL-C y colesterol total se vio reforzada por varios GWAS (96,96,245,250,251). Un estudio funcional en variantes de *SORT1* ha sugerido que rs12740374 afecta la expresión hepática del gen, ya sea al crear (alelo minoritario) o al alterar (alelo principal) un sitio de unión para CCAAT / factores de transcripción de unión potenciadora

Los estudios GWAS muestran la asociación de diferentes SNVs con los niveles lipídicos en plasma, sin embargo, se requieren experimentos complementarios para establecer totalmente la arquitectura genómica de las concentraciones de TG, CT o cLDL en plasma, incluyendo secuenciación, estudio con modelos animales, estudios familiares de cosegregación, funciones celulares y experimentos bioquímicos (252).

#### **4. FACTORES AMBIENTALES Y GENÉTICOS RELACIONADOS CON LA OBESIDAD Y SOBREPESO**

La etiología de la arteriosclerosis es multifactorial incluyendo factores de riesgo como la edad, el consumo de tabaco, la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y la obesidad, entre otros (253). El exceso de peso constituye el sexto factor de riesgo más importante en la carga global de enfermedad en todo el mundo. La OMS describe la obesidad como uno de los mayores problemas visibles de salud pública que amenaza tanto a países desarrollados como a no desarrollados (254).

##### **4.1 FACTORES AMBIENTALES**

La obesidad, considerada como muchos como la epidemia del siglo XXI, se define como un exceso de peso corporal desproporcionado para la altura del individuo con una acumulación excesiva de tejido adiposo, que es usualmente acompañado de una inflamación sistémica crónica leve. La obesidad está asociada con el desarrollo de la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y otras condiciones patológicas adversas (255). El aumento de la deposición de grasa, resulta del desequilibrio entre la ingesta calórica y la energía gastada. Sin embargo, la etiología de la obesidad es más compleja y depende de circunstancias como el estado socioeconómico, el medio ambiente y el comportamiento personal y las interacciones genotipo-fenotipo (256). El control del peso y la composición corporal tienen en cuenta la ingesta de energía, el gasto energético y la deposición de grasa, que están interconectadas y reguladas por los sistemas neuronales y endocrinos, donde participan diferentes neuropéptidos y hormonas. Varios agentes modifican estos procesos regulatorios: factores ambientales, nivel de actividad física, la microbiota intestinal, las sustancias que interfieren a la regulación endocrina, factores reproductivos y efectos epigenéticos (257).

Según la OMS, se estimó que en 2014 más de 2100 millones de adultos presentan sobrepeso u obesidad. La prevalencia de obesidad en 2014 fue del 10,8% en hombres y 14,9% entre mujeres adultas. Estos datos indican que el sexo femenino está asociado con un mayor riesgo de obesidad, mientras que el sobrepeso es más frecuente entre los hombres. Respecto a la distribución geográfica, los estadounidenses exhibieron una mayor prevalencia de extrema obesidad, sin embargo, las poblaciones asiáticas tienen valores de IMC más bajos que los individuos blancos, pero han demostrado ser propensos a la deposición de grasa visceral, lo que hace que las poblaciones asiáticas sean más susceptibles al desarrollo diabetes mellitus tipo 2 con niveles de IMC más bajos que individuos blancos (258,259).



Entre 1980 y 2008, el estándar mundial de la edad la media del IMC aumentó de 0,4 kg/m<sup>2</sup> en hombres a 0,5 kg/m<sup>2</sup> en mujeres por cada década. El porcentaje de adultos con un IMC  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> ha aumentado entre 1980 y 2013 del 28,8% al 36,9%, y del 29,8% al 38% en hombres y mujeres, respectivamente. Para 2030, las estimaciones pronostican que el 57,8% (3300 millones de personas) de la población adulta mundial tendrá un IMC  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>. Sin embargo, esta tendencia se ha revertido en los últimos años, ya que en 2016 se ha estimado que 1900 millones de adultos presentan sobrepeso, de los cuales 650 millones eran obesos (257,260).

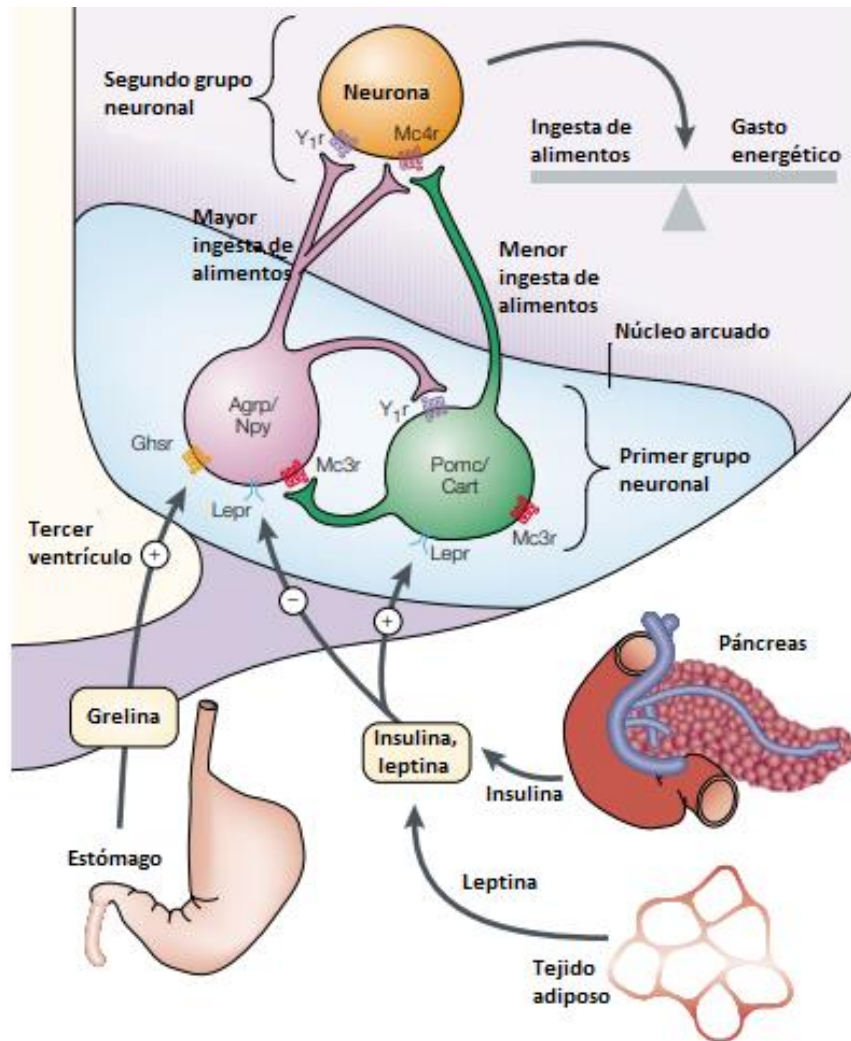
Existen periodos críticos en el desarrollo de la obesidad, como son el periodo prenatal, la infancia y la adolescencia. La impresión metabólica, que se define como la programación del metabolismo durante los períodos prenatales y neonatales a nivel genómico y epigenómico, podría permanecer constante durante toda la vida del individuo y afectar al riesgo de padecer obesidad y sobrepeso en el futuro. En el periodo prenatal, un exceso de la ingesta calórica, especialmente al principio del embarazo (las primeras 20 semanas), es un factor de riesgo para el desarrollo de sobrepeso en niños. Tanto la sobrenutrición como la desnutrición durante la vida fetal pueden desencadenar vías que son responsables de la obesidad más adelante en la vida. Un alto peso al nacimiento se ha asociado con un mayor riesgo de obesidad en los adultos. Sin embargo, un bajo peso al nacer también se ha relacionado con un mayor porcentaje de grasa corporal, independiente del IMC, y obesidad abdominal en adolescentes. En los bebés, un rápido aumento de peso también se ha asociado con un alto riesgo de sobrepeso más adelante en la vida (261,262).

La regulación del control del hambre y de la saciedad está controlado por complejas interacciones entre el sistema nervioso, nutrientes, detección mecánica, ritmo circadiano y múltiples hormonas. La ingesta de alimentos desencadena señales gastrointestinales mediadas por distensión mecánica u hormonas paracrinas, y señales de nutrientes que modulan el apetito involucrando diferentes neurotransmisores, péptidos del cerebro, aminoácidos y neuropéptidos.

A nivel del sistema nervioso central (SNC) hay dos grupos neuronales localizados en el núcleo arcuado: *Agrp/Npy* y *Pomc/Cart*, que están regulados por hormonas circulantes. El primer grupo neuronal está formado por *Agrp* (proteína relacionada con aglutí) y *Npy* (neuropéptido Y) que son neuropéptidos que estimulan la ingesta de alimentos y disminuyen el gasto de energía. El segundo grupo neuronal está formado *Pomc* (un derivado postraduccional de la proopiomelanocortina) y *Cart* (proteína de transcripción regulada por cocaína y anfetamina), que son neuropéptidos que inhiben la ingesta de alimentos y aumentan el gasto energético (Figura 28). La insulina y la leptina son hormonas que circulan en función de las reservas adiposas corporales,

inhibiendo las neuronas Agrp/Npy y estimulan las neuronas Pomc/Cart adyacentes. La grelina es un péptido circulante secretado por el estómago que puede activar las neuronas Agrp/Npy, estimulando así la ingesta de alimentos; esto proporciona un mecanismo molecular potencial para la integración señales de balance de energía a largo plazo dependientes a corto plazo (263).

Figura 28: Control de la homeostasis energética por neuronas del núcleo arcuado.

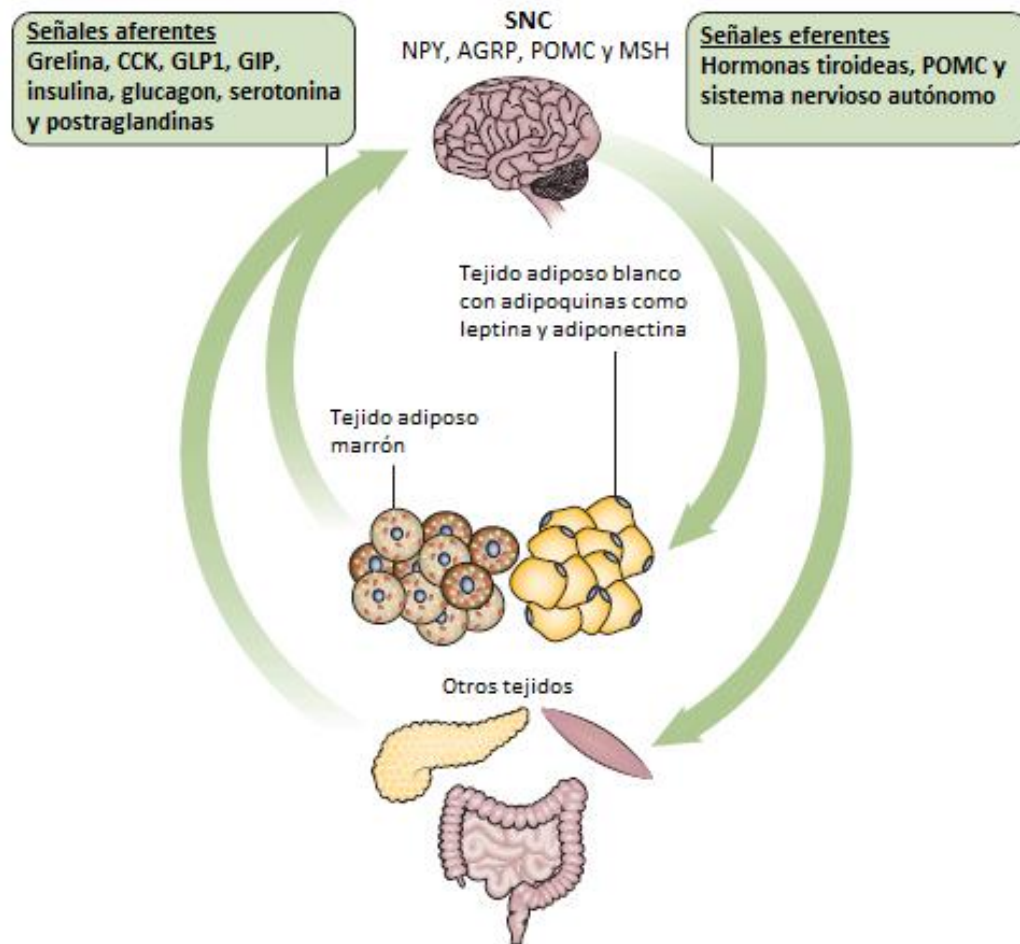


Adaptada de Barsh y cols (263). Abreviaturas no descritas previamente, que aplican en la figura: Ghcr: receptor de la hormona del crecimiento; Lepr: receptor de la hormona de la leptina; Mc3r/Mc4r: receptor de la melanocortina 3/4; Y1r: receptor del neuropéptido Y1.

Las señales eferentes generadas por el SNC son transmitidas por hormonas tiroideas (triyodotironina y tiroxina) que están involucradas en varios procesos fisiológicos, incluida la regulación de la tasa metabólica basal y la temperatura corporal o por el sistema nervioso autónomo entre otros. Todas estas señales actúan sobre el tejido adiposo, páncreas o intestino. Hay que diferenciar entre dos tipos de tejidos adiposo: el tejido adiposo blanco, considerado un endocrino que se encarga de la secreción de adipocinas; y el tejido adiposo marrón, que se

encarga sobre todo del mantenimiento de la termogénesis, es fundamental en la infancia e involuociona con la edad. El tejido adiposo blanco secreta una serie de sustancias denominadas adipoquinas (como la leptina, adiponectina, resistina, interleukina 6, RBP4, TNF $\alpha$ ...), las cuales junto con el sistema gastrointestinal y pancreático realizan un *feedback* sobre el SNC y pueden mediar el apetito, la termogénesis, la inflamación y el depósito de grasa (Figura 29).

**Figura 29: Control del hambre y de la saciedad**



Adaptada de Gonzalez-Muniesa y cols (257).

La leptina se conoce como la hormona de la saciedad, regula el balance energético, al inhibir el hambre y se opone a la acción de la grelina, secretada a nivel gástrico. La adiponectina regula varios procesos metabólicos (incluida la homeostasis de la glucosa y la oxidación de los ácidos grasos) y tiene un poder propiedades antiinflamatorias, antidiabéticas y anti-aterogénicas. A nivel gastrointestinal y pancreático también se secretan hormonas como la grelina, colecistoquinina (CCK), péptido similar al glucagón 1 (GLP1), péptido insulínico dependiente de glucosa (también conocido como polipéptido inhibidor gástrico) (GIP), insulina, glucagón y serotonina) que están involucrados en la absorción de alimentos, metabolismo y el

control del hambre. Algunas de estas hormonas aumentan la ingesta de alimentos (por ejemplo, grelina) y otros disminuyen la ingesta de alimentos (como GLP1, serotonina, CCK e insulina) (Figura 29).

## 4.2 FACTORES GENÉTICOS

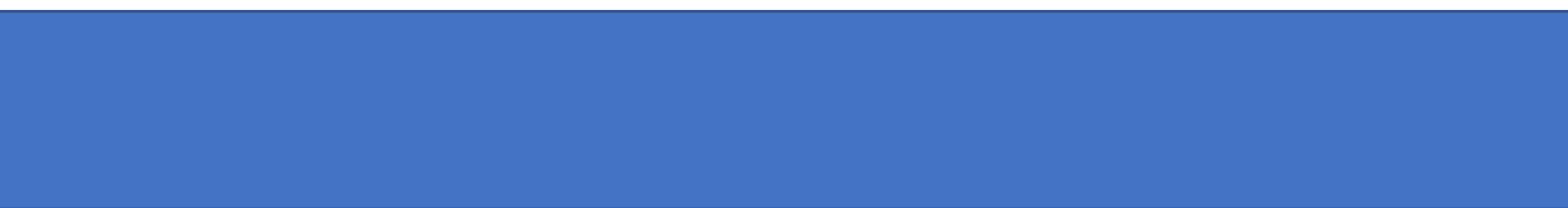
La contribución ambiental al desarrollo de la obesidad es evidente. Sin embargo, el fuerte componente genético de la obesidad se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios (264,265). Un meta-análisis sugiere que aproximadamente el 50-70% de variación en el IMC es atribuible a diferencias genéticas (266). Los primeros estudios se basaron en la búsqueda de defectos genéticos implicados en formas monogénicas y síndromes de obesidad extrema, centrando su atención en la disfunción de la vía leptina-hipotálamo. Los genes clásicamente asociados con el fenotipo extremo de obesidad monogénica son: gen de la leptina (*LEP*), proopiomelanocortina (*POMC*), prohormona convertasa 1 (*PCSK1*) y melanocortina 4 receptor (*MC4R*). Los avances posteriores y el desarrollo de los estudios de asociación del genoma completo han permitido identificar nuevos *loci* involucrados en las formas más comunes de obesidad y ayudando a identificar nuevos genes involucrados en el desarrollo de la obesidad. Entre estos genes destaca el gen asociado a masa grasa y obesidad (*FTO*), la proteína transmembrana 18 (*TMEM18*), *GALNT10* (UDP-N- acetilgalactosaminiltransferasa 10) y *MIR148A* (microRNA148A) (267).

Hasta la fecha se han asociado más de 835 *loci* y 317 SNVs con la obesidad (268,269). Entre este grupo de genes, el gen *FTO* se considera el primer gen y el que presenta una mayor asociación al desarrollo de la obesidad en numerosas poblaciones de diferentes países (270). La asociación de *FTO* con la obesidad ha sido inequívocamente confirmado por la existencia de numerosos SNVs (rs9939609, rs17817449, rs3751812, rs1421085, y rs9930506, rs7202116) involucrados en el desarrollo de la obesidad tanto en poblaciones adultas como infantiles (271). Sin embargo, los mecanismos moleculares exactos responsables del efecto de *FTO* sobre la obesidad siguen siendo en gran medida desconocidos. Análisis recientes de estudios asociados a todo el genoma revelan que las variantes genéticas en el gen *FTO* están asociadas no solo con la adiposidad humana y trastornos metabólicos, sino también con cáncer. El gen *FTO* se expresa de forma ubicua en los tejidos humanos, pero alcanza su mayor expresión en la región hipotalámica del tejido cerebral que controla la ingesta de alimentos y modelos celulares han demostrado que la perturbación de la actividad enzimática de *FTO* desregula los genes relacionados con el metabolismo energético, generando una desregulación de la homeostasis del tejido adiposo (271).





# JUSTIFICACIÓN





Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte tanto en España como en el resto de países occidentales, constituyendo además la principal causa de invalidez y de consumo de los recursos sanitarios. Las enfermedades cardiovasculares son, en su mayoría de origen vascular siendo la aterosclerosis la principal causa de desarrollo de las mismas. La etiología de la placa de ateroma es multifactorial incluyendo la edad, el índice de masa corporal, la hipertensión arterial, el hábito tabáquico, la diabetes y la dislipemia fundamentalmente.

Las hiperlipemias primarias son un grupo heterogéneo de trastornos del metabolismo lipídico que se caracterizan por un elevado riesgo cardiovascular. Las formas clínicas más importantes se acompañan de aumentos en la concentración plasmática de colesterol, triglicéridos o de ambos. Aunque la concentración de colesterol y triglicéridos depende de múltiples mecanismos genéticos y ambientales, los sujetos que presentan concentraciones extremas de hipercolesterolemia o de hipertrigliceridemia suelen tener trastornos genéticos como responsables de su etiopatogenia.

A pesar de los importantes avances en el campo de la genética que han permitido identificar numerosos *loci* responsables de diferentes dislipemias, todavía existe un porcentaje elevado de dislipemias genéticas cuyo origen es desconocido. Básicamente las dislipemias se pueden producir por un aumento de absorción a nivel intestinal, por un aumento de su síntesis a nivel hepática, por una disminución en su catabolismo o por una alteración en su eliminación a nivel biliar.

El objetivo principal de esta tesis es estudiar el papel de diferentes genes involucrados en la absorción y la síntesis hepática del colesterol y triglicéridos en la patogenia de las dislipemias hereditarias de las que desconocemos su gen responsable y su mecanismo de producción. Un problema clínico que existe en la actualidad en el diagnóstico de dislipemias primarias es solapamiento del fenotipo clínico que existe entre las dislipemias de origen poligénico u oligénico y en menor medida monogénico.

Este trabajo pretende, identificar el efecto de nuevos *loci*, estudiar su asociación con la etiopatogenia de las dislipemias primarias y evaluar el efecto sumatorio de la concentración de alelos de riesgo. Todo esto permitiría un mayor entendimiento sobre la arquitectura genética de las dislipemias y permitiría un abordaje clínico individualizado.



**COMPENDIO DE  
PUBLICACIONES:  
ESTUDIOS  
PRINCIPALES**





En los siguientes apartados se especificarán los objetivos, metodología, resultados (mediante la inclusión de manuscritos publicados o pendientes de hacerlo) y conclusiones de los trabajos principales que constituyen la Tesis Doctoral. Se referenciarán los trabajos de acuerdo a la numeración abajo expuesta para simplificar su exposición:

#### 1. ESTUDIO 1

---

Lamiquiz-Moneo I, Bea AM, Mateo-Gallego R, Baila-Rueda L, Cenarro A, Pocoví M, Civeira F, De Castro-Orós F. **Identification of variants in LMF1 gene associated with primary hypertriglyceridemia.** Clin Investig Arterioscler. 2015 Sep-Oct;27(5):246-52.

#### 2. ESTUDIO 2

---

Lamiquiz-Moneo I, Blanco-Torrecilla C, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Baila-Rueda L, Cenarro A, Civeira F, De Castro-Orós I. **Frequency of rare mutations and common genetic variations in severe hypertriglyceridemia in the general population of Spain.** Lipids Health Dis. 2016 Apr 23;15:82.

#### 3. ESTUDIO 3

---

Lamiquiz-Moneo I, Pérez-Ruiz MR, Jarauta E, Tejedor MT, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Baila-Rueda L, Marco-Benedí V, De Castro-Orós I, Cenarro A, Civeira F. **Single Nucleotide Variants Associated With Polygenic Hypercholesterolemia in Families Diagnosed Clinically With Familial Hypercholesterolemia.** Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2018 May;71(5):351-356.

#### 4. ESTUDIO 4

---

Lamiquiz-Moneo I, Baila-Rueda L, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Martín-Navarro A, Ros E, Cofán M, Rodríguez-Rey JC, Pocovi M, Cenarro A, Civeira F. **ABCG5/G8 gene is associated with hypercholesterolemias without mutation in candidate genes and noncholesterol sterols.** J Clin Lipidol. 2017 Nov - Dec;11(6):1432-1440.

5. ESTUDIO 5

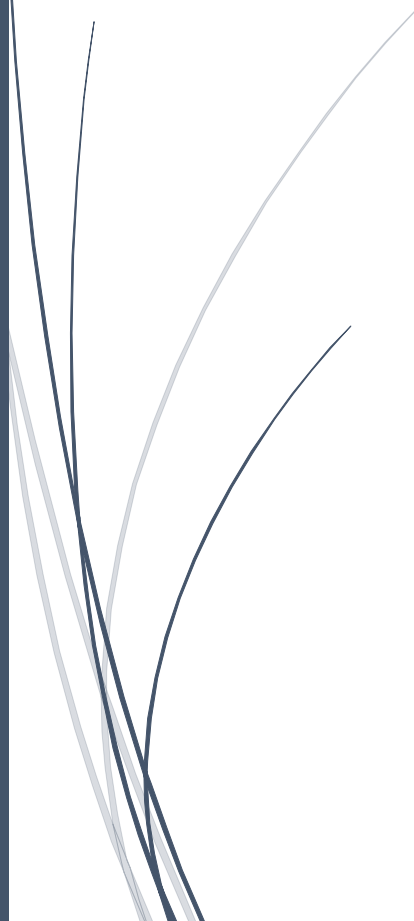
---

Lamiquiz-Moneo I, Mateo-Gallego R, Bea AM, Dehesa-García B, Perez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Baila-Rueda L, Laclaustra M, Civeira F, Cenarro A. **Genetic predictors of weight loss in overweight and obese subjects**. Obesity. 2018. (Under review).

A dark blue vertical bar runs down the left side of the page. A blue arrow points to the right from the middle of this bar.

## ESTUDIO 1

Identificación de variantes  
en el gen *LMF1* asociadas  
con hipertrigliceridemia  
primaria

Several thin, curved lines in shades of blue and grey originate from the bottom left corner and sweep upwards and to the right, creating a decorative, organic feel.







ORIGINAL

## Identificación de variantes en el gen *LMF1* asociadas con hipertrigliceridemia primaria



Itziar Lamiquiz-Moneo<sup>a,\*</sup>, Ana M. Bea<sup>a</sup>, Rocío Mateo-Gallego<sup>a</sup>, Lucía Baila-Rueda<sup>a</sup>, Ana Cenarro<sup>a</sup>, Miguel Pocoví<sup>b</sup>, Fernando Civeira<sup>a</sup> e Isabel de Castro-Orós<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, Zaragoza, España

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón, Zaragoza, España

Recibido el 23 de diciembre de 2014; aceptado el 6 de febrero de 2015

Disponible en Internet el 26 de marzo de 2015

### PALABRAS CLAVE

Hipertrigliceridemia;  
Factor 1 de  
maduración de la  
lipasa;  
*LMF1*;  
Lipoproteína lipasa;  
Mutaciones

**Resumen** La mayoría de las hipertrigliceridemias (HTG) primarias graves se diagnostican en la edad adulta, y sus bases moleculares no se han dilucidado completamente.

Varios son los genes relacionados con este tipo de HTG, entre ellos el gen *LMF1*, que codifica la proteína Lmf1, la cual participa en la función de la lipoproteína lipasa (LpL). Teniendo en cuenta estos hechos, nuestro objetivo es identificar las variantes génicas comunes y no comunes en el gen *LMF1* en sujetos con HTG primaria.

Hemos secuenciado el promotor, los exones y las regiones exón-intrón del gen *LMF1* en 112 pacientes con HTG primaria grave, definida por triglicéridos por encima de 500 mg/dl, excluyendo causas secundarias. Cinco pacientes (4,46%) fueron portadores de 4 variantes raras en *LMF1* asociadas previamente a HTG. Además, se identificaron 2 variantes comunes con una frecuencia alélica diferente de la que se observa en población general: c.194-28 T>G y c.729+18C>G.

Se llevó a cabo un análisis bioinformático de las variantes encontradas, identificando las variantes p.Arg364Gln, p.Arg451Trp, p.Pro562Arg y p.Leu85Leu como potencialmente dañinas.

Nuestros resultados sugieren que el gen *LMF1* contribuye a la etiología de la HTG primaria grave en un porcentaje significativo de los pacientes, con una combinación de mutaciones de efecto entre moderado y agresivo y polimorfismos clásicamente asociados con esta dislipidemia.

© 2014 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [itziarlamiquiz@gmail.com](mailto:itziarlamiquiz@gmail.com) (I. Lamiquiz-Moneo).





## **ESTUDIO 2**

Frequency of rare mutations  
and common  
genetic variations in severe  
hypertriglyceridemia in the  
general population of Spain



RESEARCH

Open Access



# Frequency of rare mutations and common genetic variations in severe hypertriglyceridemia in the general population of Spain

Itziar Lamiquiz-Moneo<sup>1\*</sup>, Cristian Blanco-Torrecilla<sup>1</sup>, Ana M. Bea<sup>1</sup>, Rocío Mateo-Gallego<sup>1</sup>, Sofía Pérez-Calahorra<sup>1</sup>, Lucía Baila-Rueda<sup>1</sup>, Ana Cenarro<sup>1</sup>, Fernando Civeira<sup>1</sup> and Isabel de Castro-Orós<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Background:** Hypertriglyceridemia (HTG) is a common complex metabolic trait that results of the accumulation of relatively common genetic variants in combination with other modifier genes and environmental factors resulting in increased plasma triglyceride (TG) levels. The majority of severe primary hypertriglyceridemias is diagnosed in adulthood and their molecular bases have not been fully defined yet. The prevalence of HTG is highly variable among populations, possibly caused by differences in environmental factors and genetic background. However, the prevalence of very high TG and the frequency of rare mutations causing HTG in a whole non-selected population have not been previously studied.

**Methods:** The total of 23,310 subjects over 18 years from a primary care-district in a middle-class area of Zaragoza (Spain) with TG >500 mg/dL were selected to establish HTG prevalence. Those affected of primary HTG were considered for further genetic analysis. The promoters, coding regions and exon-intron boundaries of *LPL*, *LMF1*, *APOC2*, *APOA5*, *APOE* and *GPIHBP1* genes were sequenced. The frequency of rare variants identified was studied in 90 controls.

**Results:** One hundred ninety-four subjects (1.04 %) had HTG and 90 subjects (46.4 %) met the inclusion criteria for primary HTG. In this subgroup, nine patients (12.3 %) were carriers of 7 rare variants in *LPL*, *LMF1*, *APOA5*, *GPIHBP1* or *APOE* genes. Three of these mutations are described for the first time in this work. The presence of a rare pathogenic mutation did not confer a differential phenotype or a higher family history of HTG.

**Conclusion:** The prevalence of rare mutations in candidate genes in subjects with primary HTG is low. The low frequency of rare mutations, the absence of a more severe phenotype or the dominant transmission of the HTG would not suggest the use of genetic analysis in the clinical practice in this population.

**Keywords:** Hypertriglyceridemia, Mutations, Prevalence

\* Correspondence: itziarlamiquiz@gmail.com

<sup>1</sup>Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Avenida Isabel La Católica 1-3, 50009 Zaragoza, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article







## **ESTUDIO 3**

Single Nucleotide Variants  
Associated with Polygenic  
Hypercholesterolemia in Families  
Diagnosed Clinically with Familial  
Hypercholesterolemia





Original article

# Single Nucleotide Variants Associated With Polygenic Hypercholesterolemia in Families Diagnosed Clinically With Familial Hypercholesterolemia

Itziar Lamiquiz-Moneo,<sup>a,\*</sup> María Rosario Pérez-Ruiz,<sup>a</sup> Estíbaliz Jarauta,<sup>a</sup> María Teresa Tejedor,<sup>b</sup> Ana M. Bea,<sup>a</sup> Rocío Mateo-Gallego,<sup>a</sup> Sofía Pérez-Calahorra,<sup>a</sup> Lucía Baila-Rueda,<sup>a</sup> Victoria Marco-Benedí,<sup>a</sup> Isabel de Castro-Orós,<sup>a</sup> Ana Cenaarro,<sup>a</sup> and Fernando Civeira<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), CIBERCV, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Anatomía, Embriología y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

Article history:

Received 8 March 2017

Accepted 20 July 2017

Keywords:

Familial hypercholesterolemia  
Single nucleotide variants  
Polygenic hypercholesterolemia

ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Approximately 20% to 40% of clinically defined familial hypercholesterolemia cases do not show a causative mutation in candidate genes, and some of them may have a polygenic origin. A cholesterol gene risk score for the diagnosis of polygenic hypercholesterolemia has been demonstrated to be valuable to differentiate polygenic and monogenic hypercholesterolemia. The aim of this study was to determine the contribution to low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) of the single nucleotide variants associated with polygenic hypercholesterolemia in probands with genetic hypercholesterolemia without mutations in candidate genes (nonfamilial hypercholesterolemia genetic hypercholesterolemia) and the genetic score in cascade screening in their family members.

**Methods:** We recruited 49 nonfamilial hypercholesterolemia genetic hypercholesterolemia families (294 participants) and calculated cholesterol gene scores, derived from single nucleotide variants in *SORT1*, *APOB*, *ABCG8*, *APOE* and *LDLR* and lipoprotein(a) plasma concentration.

**Results:** Risk alleles in *SORT1*, *ABCG8*, *APOE*, and *LDLR* showed a statistically significantly higher frequency in blood relatives than in the 1000 Genomes Project. However, there were no differences between affected and nonaffected members. The contribution of the cholesterol gene score to LDL-C was significantly higher in affected than in nonaffected participants ( $P = .048$ ). The percentage of the LDL-C variation explained by the score was 3.1%, and this percentage increased to 6.9% in those families with the highest genetic score in the proband.

**Conclusions:** Nonfamilial hypercholesterolemia genetic hypercholesterolemia families concentrate risk alleles for high LDL-C. Their contribution varies greatly among families, indicating the complexity and heterogeneity of these forms of hypercholesterolemias. The gene score explains a small percentage of LDL-C, which limits its use in diagnosis.

© 2017 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Variantes de un solo nucleótido asociados con la hipercolesterolemia poligénica en familias diagnosticadas de hipercolesterolemia familiar

RESUMEN

**Introducción y objetivos:** Aproximadamente un 20-40% de los casos de hipercolesterolemia familiar diagnosticada no muestran mutación causal en los genes candidatos, por lo que algunos de estos casos pueden tener un origen poligénico. Se han identificado diferentes variantes genéticas de un solo nucleótido que ayudan a diferenciar las hipercolesterolemias poligénicas de las monogénicas. El objetivo es estudiar la contribución de dichas variantes a la concentración de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) en probandos con hipercolesterolemia genética sin mutación en genes candidatos (hipercolesterolemia genética sin hipercolesterolemia familiar) y establecer el valor de una puntuación genética basada en las frecuencias de dichas variantes de un solo nucleótido en el cribado en cascada de sus familiares.

**Métodos:** Se reclutó a 49 familias con hipercolesterolemia genética sin hipercolesterolemia familiar (294 sujetos) y se calculó la puntuación genética derivada de las variantes de un solo nucleótido de los genes *SORT1*, *APOB*, *ABCG8*, *APOE* y *LDLR* más la concentración plasmática de lipoproteína(a).

**Resultados:** Los alelos de riesgo en *SORT1*, *ABCG8*, *APOE* y *LDLR* presentaron mayor frecuencia en los consanguíneos que en el proyecto 1.000 Genomas, con diferencia estadísticamente significativa. La

Palabras clave:

Hipercolesterolemia familiar  
Variante de un solo nucleótido  
Hipercolesterolemia poligénica

\* Corresponding author: Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Avda. Isabel La Católica 1-3, 50009 Zaragoza, Spain.

E-mail address: [itziarlamiquiz@gmail.com](mailto:itziarlamiquiz@gmail.com) (I. Lamiquiz-Moneo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rec.2017.07.010>

1885-5857/© 2017 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.





## ESTUDIO 4

*ABCG5/G8* gene is associated with hypercholesterolemias without mutation candidate genes and noncholesterol sterols





# ABCG5/G8 gene is associated with hypercholesterolemias without mutation in candidate genes and noncholesterol sterols

**Itziar Lamiquiz-Moneo, MSc\***, **Lucía Baila-Rueda, PhD**, **Ana M. Bea, MLT**, **Rocío Mateo-Gallego, PhD**, **Sofía Pérez-Calahorra, MSc**, **Victoria Marco-Benedí, MSc**, **Antonio Martín-Navarro, PhD**, **Emilio Ros, PhD, MD**, **Montserrat Cofán, PhD**, **José Carlos Rodríguez-Rey, PhD**, **Miguel Pocovi, PhD**, **Ana Cenaarro, PhD**, **Fernando Civeira, PhD, MD**

*Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), CIBERCV, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain (Drs Lamiquiz-Moneo, Baila-Rueda, Bea, Mateo-Gallego, Pérez-Calahorra, Marco-Benedí, Martín-Navarro, Cenaarro, and Civeira); Unitat de Lipids, Servei d'Endocrinologia i Nutrició, Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer, Hospital Clinic and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Barcelona, Spain (Drs Ros and Cofán); Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Santander, Cantabria, Spain (Dr Rodríguez-Rey); and Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain (Dr Pocovi)*

## KEYWORDS:

Genetic  
hypercholesterolemia;  
ABCG5/G8;  
Noncholesterol sterols;  
Cholesterol absorption

**CONTEXT:** Approximately 20% to 40% of clinically defined familial hypercholesterolemia (FH) cases do not show a causative mutation in candidate genes (mutation-negative FH), and some of them may have a polygenic origin.

**OBJECTIVE:** The aim of this work was to study the prevalence of ABCG5/G8 genetic variants in mutation-negative FH, as defects in these genes relate to intestinal hyperabsorption of cholesterol and thus ABCG5/G8 variants could explain in part the mechanism of hypercholesterolemia.

**DESIGN, SETTING, AND PATIENTS:** We sequenced the ABCG5/G8 genes in 214 mutation-negative FH and 97 controls. Surrogate markers of cholesterol absorption (5 $\alpha$ -cholestanol,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, stigmasterol, and sitostanol) were quantified by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in both studied groups.

**RESULTS:** We found 8 mutation-negative FH patients (3.73%) with a pathogenic mutation in ABCG5/G8 genes. We observed significantly higher concentration of surrogate markers of cholesterol absorption in mutation-negative FH than in controls. In addition, we found significantly higher concentrations of cholesterol absorption markers in mutation-negative FH with ABCG5/G8 defects than in mutation-negative, ABCG5/G8-negative FH. A gene score reflecting the number of common single

Financial support: This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness PI15/01983, PI13/02507, PI12/01321, CIBERCV, CIBEROBN, and Cuenca Villoro Foundation. These projects are co-financed by Instituto de Salud Carlos III and the European Regional Development Fund (ERDF) of the European Union “A way to make Europe.”

\* Corresponding author. Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Avenida Isabel La Católica 1-3, 50009 Zaragoza, Spain.

E-mail address: [itziarlamiquiz@gmail.com](mailto:itziarlamiquiz@gmail.com)

Submitted July 28, 2017. Accepted for publication September 22, 2017.





## **ESTUDIO 5**

Genetic predictors of weight loss in  
overweight and obese subjects





**Title**

Genetic predictors of weight loss in overweight and obese subjects

**Authors**

Itziar Lamiquiz-Moneo<sup>a</sup>, Rocío Mateo-Gallego<sup>a,b</sup>, Ana M Bea<sup>a</sup>, Blanca Dehesa-García<sup>a</sup>, Sofía Pérez-Calahorra<sup>a</sup>, Victoria Marco-Benedí<sup>a</sup>, Lucía Baila-Rueda<sup>a</sup>, Martín Laclaustra<sup>a</sup>, Fernando Civeira<sup>a,b</sup>, Ana Cenarro<sup>a</sup>

**Affiliation**

<sup>a</sup> Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), CIBERCV, Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain.

**Corresponding author**

Name: Rocío Mateo-Gallego

Address: Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Avenida Isabel La Católica, 1-3, 50009, Zaragoza, Spain

Telephone number: (34) 976765500 (EXT 142895)

E-mail address: rociomatga@gmail.com

**Keywords**

SNV, Obesity, weight loss, genetic score, overweight

**Running title**

Genetic predictors of weight loss

**Word count:** 2293 words

**Financial support**

This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness PI15/01983, PI13/02507, PI12/ 01321, CIBERCV, and Cuenca Villoro Foundation. These projects are co-financed by Instituto de Salud Carlos III and the European Regional Development Fund (ERDF) of the European Union “A way to make Europe”.

**Disclosure**

The authors declared no conflict of interest

**Author contributions**

ILM, AMB SPC, RMG, VMB and BDG conducted research. ILM, ML and RMG analyzed data and performed the analysed data. ILM and RMG contributed to the writing of the article. FC and AC contributed to the designed reach, design the article and had the primary responsibility for final content. All authors participated in acquisition, analysis and interpretation of the data, in the drafting of the article or critical revision, and in final approval of the version to be published.

**What is already known about this subject?**

- Obesity is a multifactorial disorder that has a genetic predisposition
- GWAS have allowed to identified new genes involved in pathology of this disease.
- However, it is still far from knowing the importance of genetic predisposition in obesity and the contribution of this predisposition to the loss or gain of weight in subjects with a hypocaloric diet.

**What does your study add?**

Our study is the first study which analyze the effect of genetic contribution on the weight variation in a large cohort the subjects with obesity and overweight under homogeneous hypocaloric dietary intervention.

## 1 **Abstract**

### 2 Objective

3 The aim our study was to establish the genetic factors associated to weight loss that could be  
4 used as predictive markers in weight loss interventions in a large cohort of overweight subjects  
5 under a homogeneous dietary intervention.

### 6 Methods

7 We retrospectively recruited all subjects (N= 788) aged over 18 with BMI >25 kg/m<sup>2</sup> with at  
8 least one-year of follow-up from 2008 to 2016 and a control group of subjects (168 patients)  
9 with normal BMI. All cases received counselling which included healthy diet and increase of  
10 physical activity. We genotyped 25 single nucleotide variants (SNV) in 25 genes previously  
11 associated with obesity and calculated weighted genetic score derived from 5 SNV.

### 12 Results

13 The mean follow-up was  $5.58 \pm 2.68$  years. Subjects with lower genetic score showed higher  
14 weight loss along follow-up. The genetic score was the variable that explained best weight  
15 change variance after baseline weight, explaining 1.7% weight change variance at one year and  
16 1.5% weight change variance at the end of follow-up adjusting by baseline weight, sex, age and  
17 years of follow-up.

### 18 Conclusion

19 Genetic score based on 5 SNV predicted body weight change in subjects; a low genetic score  
20 leads to greater weight loss both in short and long-term

### 21 **Keywords**

22 SNV, Obesity, weight loss, genetic score, overweight

23



# REFERENCIAS



Referencias

1. Brown and Goldstein Nobel Lecture.pdf [Internet]. [citado 6 de febrero de 2018].  
Disponible en:  
[http://www.hms.harvard.edu/md\\_phd/news/Brown%20and%20Goldstein%20Nobel%20Lecture.pdf](http://www.hms.harvard.edu/md_phd/news/Brown%20and%20Goldstein%20Nobel%20Lecture.pdf)
2. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:459-81.
3. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet.* febrero de 2009;10(2):109-21.
4. Durrington P. Dyslipidaemia. *The Lancet.* 30 de agosto de 2003;362(9385):717-31.
5. Emilio Herrera. *Bioquímica: Aspectos estructurales y vías metabólicas.* Vol. 1. McGraw-Hill;
6. Ridker PM. LDL cholesterol: controversies and future therapeutic directions. *Lancet Lond Engl.* 16 de agosto de 2014;384(9943):607-17.
7. Dominiczak MH, Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem.* noviembre de 2011;48(Pt 6):498-515.
8. Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* junio de 2009;296(6):E1183-1194.
9. Yen C-LE, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese RV. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res.* noviembre de 2008;49(11):2283-301.
10. Carmena R, Duriez P, Fruchart J-C. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation.* 15 de junio de 2004;109(23 Suppl 1):III2-7.
11. Hassing HC, Surendran RP, Mooij HL, Stroes ES, Nieuwdorp M, Dallinga-Thie GM. Pathophysiology of hypertriglyceridemia. *Biochim Biophys Acta.* mayo de 2012;1821(5):826-32.
12. Choi SY, Hirata K, Ishida T, Quertermous T, Cooper AD. Endothelial lipase: a new lipase on the block. *J Lipid Res.* noviembre de 2002;43(11):1763-9.
13. Péterfy M, Ben-Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE, Pullinger CR, et al. Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat Genet.* diciembre de 2007;39(12):1483-7.

14. Beigneux AP, Davies BSJ, Gin P, Weinstein MM, Farber E, Qiao X, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab.* abril de 2007;5(4):279-91.
15. Davies BSJ, Beigneux AP, Barnes RH, Tu Y, Gin P, Weinstein MM, et al. GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab.* 7 de julio de 2010;12(1):42-52.
16. Havel RJ, Hamilton RL. Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* febrero de 2004;24(2):213-5.
17. Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol.* abril de 2001;12(2):151-7.
18. Aalto-Setälä K, Fisher EA, Chen X, Chajek-Shaul T, Hayek T, Zechner R, et al. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J Clin Invest.* noviembre de 1992;90(5):1889-900.
19. Shu X, Nelbach L, Ryan RO, Forte TM. Apolipoprotein A-V associates with intrahepatic lipid droplets and influences triglyceride accumulation. *Biochim Biophys Acta.* mayo de 2010;1801(5):605-8.
20. Fisher EA, Khanna NA, McLeod RS. Ubiquitination regulates the assembly of VLDL in HepG2 cells and is the committing step of the apoB-100 ERAD pathway. *J Lipid Res.* junio de 2011;52(6):1170-80.
21. Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J, et al. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11(4):200-8.
22. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* abril de 2009;29(4):431-8.
23. cholesterol-metabolism.jpg (628x484) [Internet]. [citado 7 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://i0.wp.com/www.namrata.co/wp-content/uploads/2012/11/cholesterol-metabolism.jpg?resize=628%2C484>
24. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, et al. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell.* 8 de octubre de 1993;75(1):187-97.



25. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res.* abril de 2009;50 Suppl:S172-177.
26. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest.* diciembre de 2006;116(12):3090-100.
27. Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNA control of high-density lipoprotein metabolism and function. *Circ Res.* 3 de enero de 2014;114(1):183-92.
28. Fukuda M, Nakano M, Sriwongsitanont S, Ueno M, Kuroda Y, Handa T. Spontaneous reconstitution of discoidal HDL from sphingomyelin-containing model membranes by apolipoprotein A-I. *J Lipid Res.* abril de 2007;48(4):882-9.
29. Rye K-A, Barter PJ. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* marzo de 2004;24(3):421-8.
30. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res.* 24 de junio de 2005;96(12):1221-32.
31. Saddar S, Mineo C, Shaul PW. Signaling by the high-affinity HDL receptor scavenger receptor B type I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* febrero de 2010;30(2):144-50.
32. Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall AR. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem.* 6 de julio de 2001;276(27):25287-93.
33. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.* 1 de noviembre de 1990;323(18):1234-8.
34. Maranhão RC, Carvalho PO, Strunz CC, Pileggi F. Lipoprotein (a): structure, pathophysiology and clinical implications. *Arq Bras Cardiol.* julio de 2014;103(1):76-84.
35. Li Y, Luke MM, Shiffman D, Devlin JJ. Genetic variants in the apolipoprotein(a) gene and coronary heart disease. *Circ Cardiovasc Genet.* octubre de 2011;4(5):565-73.
36. Sommer A, Gorges R, Kostner GM, Paltauf F, Hermetter A. Sulfhydryl-selective fluorescence labeling of lipoprotein(a) reveals evidence for one single disulfide linkage between apoproteins(a) and B-100. *Biochemistry (Mosc).* 26 de noviembre de 1991;30(47):11245-9.

37. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, et al. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*. 12 de noviembre de 1987;330(6144):132-7.
38. Bartens W, Rader DJ, Talley G, Brewer HB. Decreased plasma levels of lipoprotein(a) in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. agosto de 1994;108(2):149-147.
39. Saeed A, Virani SS. Lipoprotein(a) and cardiovascular disease: current state and future directions for an enigmatic lipoprotein. *Front Biosci Landmark Ed*. 1 de enero de 2018;23:1099-112.
40. Santos RD. Lipoprotein(a) and cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia: should we also blame the LDL receptor? *J Am Coll Cardiol*. 20 de mayo de 2014;63(19):1990-1.
41. Riches K, Porter KE. Lipoprotein(a): Cellular Effects and Molecular Mechanisms. *Cholesterol*. 2012;2012:923289.
42. Mackay DS, Jones PJH. Plasma noncholesterol sterols: current uses, potential and need for standardization. *Curr Opin Lipidol*. junio de 2012;23(3):241-7.
43. von Bergmann K, Sudhop T, Lütjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol*. 4 de julio de 2005;96(1A):10D-14D.
44. de Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J Nutr Biochem*. julio de 2003;14(7):362-9.
45. De Smet E, Mensink RP, Plat J. Effects of plant sterols and stanols on intestinal cholesterol metabolism: suggested mechanisms from past to present. *Mol Nutr Food Res*. julio de 2012;56(7):1058-72.
46. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. febrero de 2008;9(2):125-38.
47. OMS | Enfermedades cardiovasculares [Internet]. WHO. [citado 6 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
48. Fredrickson DS, Lees RS. A SYSTEM FOR PHENOTYPING HYPERLIPOPROTEINEMIA. *Circulation*. marzo de 1965;31:321-7.
49. Benn M, Watts GF, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG. Mutations causative of familial hypercholesterolaemia: screening of 98 098 individuals from the Copenhagen General

- Population Study estimated a prevalence of 1 in 217. *Eur Heart J.* 1 de mayo de 2016;37(17):1384-94.
50. Kotze MJ, De Villiers WJ, Steyn K, Kriek JA, Marais AD, Langenhoven E, et al. Phenotypic variation among familial hypercholesterolemics heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol.* octubre de 1993;13(10):1460-8.
51. Sánchez-Hernández RM, Civeira F, Stef M, Perez-Calahorra S, Almagro F, Plana N, et al. Homozygous Familial Hypercholesterolemia in Spain: Prevalence and Phenotype-Genotype Relationship. *Circ Cardiovasc Genet.* diciembre de 2016;9(6):504-10.
52. Santos RD, Gidding SS, Hegele RA, Cuchel MA, Barter PJ, Watts GF, et al. Defining severe familial hypercholesterolaemia and the implications for clinical management: a consensus statement from the International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. *Lancet Diabetes Endocrinol.* octubre de 2016;4(10):850-61.
53. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest.* julio de 1973;52(7):1544-68.
54. Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest.* junio de 2003;111(12):1795-803.
55. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* abril de 2007;4(4):214-25.
56. Seidah NG, Awan Z, Chrétien M, Mbikay M. PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. *Circ Res.* 14 de marzo de 2014;114(6):1022-36.
57. De Castro-Orós I, Pocoví M, Civeira F. The genetic basis of familial hypercholesterolemia: inheritance, linkage, and mutations. *Appl Clin Genet.* 2010;3:53-64.
58. Cenarro A, Etxebarria A, de Castro-Orós I, Stef M, Bea AM, Palacios L, et al. The p.Leu167del Mutation in APOE Gene Causes Autosomal Dominant Hypercholesterolemia by Down-regulation of LDL Receptor Expression in Hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* mayo de 2016;101(5):2113-21.
59. Fouchier SW, Dallinga-Thie GM, Meijers JCM, Zelcer N, Kastelein JJP, Defesche JC, et al. Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Circ Res.* 29 de agosto de 2014;115(6):552-5.

60. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, Raal FJ, Santos RD, Hegele RA, et al. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 21 de agosto de 2014;35(32):2146-57.
61. Civeira F, International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. marzo de 2004;173(1):55-68.
62. Masana L, Civeira F, Pedro-Botet J, de Castro I, Pocoví M, Plana N, et al. [Expert consensus on the detection and clinical management of familial hypercholesterolemia]. *Clin E Investig En Arterioscler Publicacion Of Soc Espanola Arterioscler*. octubre de 2013;25(4):182-93.
63. Rocha VZ, Chacra APM, Salgado W, Miname M, Turolla L, Gagliardi ACM, et al. Extensive xanthomas and severe subclinical atherosclerosis in homozygous familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 28 de mayo de 2013;61(21):2193.
64. Plana N, Ibarretxe D, Cabré A, Ruiz E, Masana L. Prevalence of atherogenic dyslipidemia in primary care patients at moderate-very high risk of cardiovascular disease. Cardiovascular risk perception. *Clin E Investig En Arterioscler Publicacion Of Soc Espanola Arterioscler*. diciembre de 2014;26(6):274-84.
65. Neil A, Cooper J, Betteridge J, Capps N, McDowell I, Durrington P, et al. Reductions in all-cause, cancer, and coronary mortality in statin-treated patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study. *Eur Heart J*. noviembre de 2008;29(21):2625-33.
66. Masana L, Plana N, Pérez-Calahorra S, Ibarretxe D, Lamiquiz-Moneo I, Pedro-Botet J, et al. How many familial hypercholesterolemia patients are eligible for PCSK9 inhibition? *Atherosclerosis*. julio de 2017;262:107-12.
67. Hovingh GK, Davidson MH, Kastelein JJP, O'Connor AM. Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J*. abril de 2013;34(13):962-71.
68. National Collaborating Centre for Primary Care (UK). Identification and Management of Familial Hypercholesterolaemia (FH) [Internet]. London: Royal College of General Practitioners (UK); 2008 [citado 2 de marzo de 2018]. (National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53822/>

69. Marks D, Thorogood M, Neil SM, Humphries SE, Neil H a. W. Cascade screening for familial hypercholesterolaemia: implications of a pilot study for national screening programmes. *J Med Screen*. 2006;13(3):156-9.
70. Huxley RR, Hawkins MH, Humphries SE, Karpe F, Neil H a. W, Simon Broome Familial Hyperlipidaemia Register Group and Scientific Steering Committee. Risk of fatal stroke in patients with treated familial hypercholesterolemia: a prospective registry study. *Stroke*. enero de 2003;34(1):22-5.
71. Talmud PJ, Shah S, Whittall R, Futema M, Howard P, Cooper JA, et al. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolaemia: a case-control study. *Lancet Lond Engl*. 13 de abril de 2013;381(9874):1293-301.
72. Paththinige CS, Sirisena ND, Dissanayake V. Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia - a comprehensive literature review. *Lipids Health Dis*. 2 de junio de 2017;16(1):103.
73. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 4 de abril de 1986;232(4746):34-47.
74. Ellis KL, Pang J, Chan DC, Hooper AJ, Bell DA, Burnett JR, et al. Familial combined hyperlipidemia and hyperlipoprotein(a) as phenotypic mimics of familial hypercholesterolemia: Frequencies, associations and predictions. *J Clin Lipidol*. diciembre de 2016;10(6):1329-1337.e3.
75. Veerkamp MJ, de Graaf J, Bredie SJH, Hendriks JCM, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Diagnosis of familial combined hyperlipidemia based on lipid phenotype expression in 32 families: results of a 5-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 de febrero de 2002;22(2):274-82.
76. Hokanson JE, Krauss RM, Albers JJ, Austin MA, Brunzell JD. LDL physical and chemical properties in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. abril de 1995;15(4):452-9.
77. Trastornos del metabolismo de las lipoproteínas | Harrison. *Principios de Medicina Interna, 18e* | HarrisonMedicina | McGraw-Hill Medical [Internet]. [citado 12 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://harrisonmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookId=865&sectionId=68956448>

78. Brouwers MCGJ, van Greevenbroek MMJ, Stehouwer CDA, de Graaf J, Stalenhoef AFH. The genetics of familial combined hyperlipidaemia. *Nat Rev Endocrinol*. 14 de febrero de 2012;8(6):352-62.
79. Veerkamp MJ, de Graaf J, Stalenhoef AFH. Role of insulin resistance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. mayo de 2005;25(5):1026-31.
80. Castro Cabezas M, de Bruin TW, de Valk HW, Shoulders CC, Jansen H, Willem Erkelens D. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. A mechanism associating hepatic apolipoprotein B overproduction and insulin resistance. *J Clin Invest*. julio de 1993;92(1):160-8.
81. Austin MA, McKnight B, Edwards KL, Bradley CM, McNeely MJ, Psaty BM, et al. Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: A 20-year prospective study. *Circulation*. 20 de junio de 2000;101(24):2777-82.
82. Skoumas I, Masoura C, Aznaouridis K, Metaxa V, Tsokanis A, Papadimitriou L, et al. Impact of cardiometabolic risk factors on major cardiovascular events in patients with familial combined hyperlipidemia. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. 2013;77(1):163-8.
83. Skoumas I, Masoura C, Pitsavos C, Tousoulis D, Papadimitriou L, Aznaouridis K, et al. Evidence that non-lipid cardiovascular risk factors are associated with high prevalence of coronary artery disease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia or familial combined hyperlipidemia. *Int J Cardiol*. 1 de octubre de 2007;121(2):178-83.
84. Jarauta E, Mateo-Gallego R, Gilabert R, Plana N, Junyent M, de Groot E, et al. Carotid atherosclerosis and lipoprotein particle subclasses in familial hypercholesterolaemia and familial combined hyperlipidaemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. julio de 2012;22(7):591-7.
85. Hegele RA, Pollex RL. Hypertriglyceridemia: phenomics and genomics. *Mol Cell Biochem*. junio de 2009;326(1-2):35-43.
86. Brunzell JD. Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med*. 6 de septiembre de 2007;357(10):1009-17.
87. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk*. abril de 1996;3(2):213-9.

88. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA*. 18 de julio de 2007;298(3):309-16.
89. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*. 18 de julio de 2007;298(3):299-308.
90. Hegele RA. Phenomics, lamin A/C, and metabolic disease. *J Clin Endocrinol Metab*. diciembre de 2007;92(12):4566-8.
91. Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J Lipid Res*. febrero de 2011;52(2):189-206.
92. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science*. 7 de noviembre de 2008;322(5903):881-8.
93. Criqui MH, Heiss G, Cohn R, Cowan LD, Suchindran CM, Bangdiwala S, et al. Plasma triglyceride level and mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med*. 29 de abril de 1993;328(17):1220-5.
94. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, et al. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 24 de mayo de 2011;123(20):2292-333.
95. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can*. 10 de abril de 2007;176(8):1113-20.
96. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 5 de agosto de 2010;466(7307):707-13.
97. Connelly PW, Maguire GF, Little JA. Apolipoprotein CII. Michael. Familial apolipoprotein CII deficiency associated with premature vascular disease. *J Clin Invest*. diciembre de 1987;80(6):1597-606.
98. Johansen CT, Hegele RA. Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. *Curr Opin Lipidol*. agosto de 2011;22(4):247-53.
99. Brown WV, Gaudet D, Goldberg I, Hegele R. Roundtable on etiology of familial chylomicronemia syndrome. *J Clin Lipidol*. febrero de 2018;12(1):5-11.

100. Benlian P, De Gennes JL, Foubert L, Zhang H, Gagné SE, Hayden M. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med*. 19 de septiembre de 1996;335(12):848-54.
101. Rouis M, Dugi KA, Previato L, Patterson AP, Brunzell JD, Brewer HB, et al. Therapeutic response to medium-chain triglycerides and omega-3 fatty acids in a patient with the familial chylomicronemia syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. julio de 1997;17(7):1400-6.
102. Basar R, Uzum AK, Canbaz B, Dogansen SC, Kalayoglu-Besisik S, Altay-Dadin S, et al. Therapeutic apheresis for severe hypertriglyceridemia in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. mayo de 2013;287(5):839-43.
103. Gaudet D, Méthot J, Déry S, Brisson D, Essiembre C, Tremblay G, et al. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther*. abril de 2013;20(4):361-9.
104. Pechlaner R, Tsimikas S, Yin X, Willeit P, Baig F, Santer P, et al. Very-Low-Density Lipoprotein-Associated Apolipoproteins Predict Cardiovascular Events and Are Lowered by Inhibition of APOC-III. *J Am Coll Cardiol*. 21 de febrero de 2017;69(7):789-800.
105. Balder J-W, Rimbert A, Zhang X, Viel M, Kanninga R, van Dijk F, et al. Genetics, Lifestyle, and Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Young and Apparently Healthy Women. *Circulation*. 20 de febrero de 2018;137(8):820-31.
106. al U-EM et. Review of first 5 years of screening for familial hypercholesterolaemia in the Netherlands. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 19 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11213091>
107. Iacocca MA, Hegele RA. Recent advances in genetic testing for familial hypercholesterolemia. *Expert Rev Mol Diagn*. julio de 2017;17(7):641-51.
108. Südhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*. 17 de mayo de 1985;228(4701):815-22.
109. Lo Surdo P, Bottomley MJ, Calzetta A, Settembre EC, Cirillo A, Pandit S, et al. Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep*. 1 de diciembre de 2011;12(12):1300-5.
110. Andersen LH, Miserez AR, Ahmad Z, Andersen RL. Familial defective apolipoprotein B-100: A review. *J Clin Lipidol*. diciembre de 2016;10(6):1297-302.



111. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. octubre de 1987;84(19):6919-23.
112. Miserez AR, Keller U. Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. octubre de 1995;15(10):1719-29.
113. März W, Baumstark MW, Scharnagl H, Ruzicka V, Buxbaum S, Herwig J, et al. Accumulation of «small dense» low density lipoproteins (LDL) in a homozygous patients with familial defective apolipoprotein B-100 results from heterogenous interaction of LDL subfractions with the LDL receptor. *J Clin Invest*. diciembre de 1993;92(6):2922-33.
114. Krisko A, Etchebest C. Theoretical model of human apolipoprotein B100 tertiary structure. *Proteins*. 1 de febrero de 2007;66(2):342-58.
115. Prassl R, Laggner P. Molecular structure of low density lipoprotein: current status and future challenges. *Eur Biophys J EBJ*. febrero de 2009;38(2):145-58.
116. Benn M. Apolipoprotein B levels, APOB alleles, and risk of ischemic cardiovascular disease in the general population, a review. *Atherosclerosis*. septiembre de 2009;206(1):17-30.
117. Boekholdt SM, Peters RJG, Fountoulaki K, Kastelein JJP, Sijbrands EJG. Molecular variation at the apolipoprotein B gene locus in relation to lipids and cardiovascular disease: a systematic meta-analysis. *Hum Genet*. octubre de 2003;113(5):417-25.
118. Chiodini BD, Barlera S, Franzosi MG, Beceiro VL, Inrona M, Tognoni G. APO B gene polymorphisms and coronary artery disease: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. abril de 2003;167(2):355-66.
119. Gaffney D, Forster L, Caslake MJ, Bedford D, Stewart JP, Stewart G, et al. Comparison of apolipoprotein B metabolism in familial defective apolipoprotein B and heterogeneous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. mayo de 2002;162(1):33-43.
120. Pietzsch J, Wiedemann B, Julius U, Nitzsche S, Gehrisch S, Bergmann S, et al. Increased clearance of low density lipoprotein precursors in patients with heterozygous familial defective apolipoprotein B-100: a stable isotope approach. *J Lipid Res*. octubre de 1996;37(10):2074-87.
121. Benn M, Nordestgaard BG, Jensen JS, Nilausen K, Meinertz H, Tybjaerg-Hansen A. Mutation in apolipoprotein B associated with hypobetalipoproteinemia despite decreased binding to the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*. 3 de junio de 2005;280(22):21052-60.

122. Schaefer JR, Herzum M, Maisch B. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med*. 26 de noviembre de 1998;339(22):1641-2.
123. Motazacker MM, Pirruccello J, Huijgen R, Do R, Gabriel S, Peter J, et al. Advances in genetics show the need for extending screening strategies for autosomal dominant hypercholesterolaemia. *Eur Heart J*. junio de 2012;33(11):1360-6.
124. Alves AC, Etxebarria A, Soutar AK, Martin C, Bourbon M. Novel functional APOB mutations outside LDL-binding region causing familial hypercholesterolaemia. *Hum Mol Genet*. 1 de abril de 2014;23(7):1817-28.
125. Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, et al. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 de febrero de 2003;100(3):928-33.
126. Hunt SC, Hopkins PN, Bulka K, McDermott MT, Thorne TL, Wardell BB, et al. Genetic localization to chromosome 1p32 of the third locus for familial hypercholesterolemia in a Utah kindred. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. abril de 2000;20(4):1089-93.
127. Denis M, Marcinkiewicz J, Zaid A, Gauthier D, Poirier S, Lazure C, et al. Gene inactivation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces atherosclerosis in mice. *Circulation*. 21 de febrero de 2012;125(7):894-901.
128. Pedro-Botet J, Badimón L. [PCSK9: Structure and function. PCSK9 and low-density lipoprotein receptor. Mutations and their effects]. *Clin E Investig En Arterioscler Publicacion Of Soc Espanola Arterioscler*. mayo de 2016;28 Suppl 2:3-8.
129. Chen X-W, Wang H, Bajaj K, Zhang P, Meng Z-X, Ma D, et al. SEC24A deficiency lowers plasma cholesterol through reduced PCSK9 secretion. *eLife*. 9 de abril de 2013;2:e00444.
130. Grozdanov PN, Petkov PM, Karagyozev LK, Dabeva MD. Expression and localization of PCSK9 in rat hepatic cells. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell*. febrero de 2006;84(1):80-92.
131. Benjannet S, Saavedra YGL, Hamelin J, Asselin M-C, Essalmani R, Pasquato A, et al. Effects of the prosegment and pH on the activity of PCSK9: evidence for additional processing events. *J Biol Chem*. 24 de diciembre de 2010;285(52):40965-78.
132. Qian Y-W, Schmidt RJ, Zhang Y, Chu S, Lin A, Wang H, et al. Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J Lipid Res*. julio de 2007;48(7):1488-98.

133. Du F, Hui Y, Zhang M, Linton MF, Fazio S, Fan D. Novel domain interaction regulates secretion of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) protein. *J Biol Chem*. 16 de diciembre de 2011;286(50):43054-61.
134. Browning JD, Horton JD. Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. *J Lipid Res*. noviembre de 2010;51(11):3359-63.
135. Fan D, Yancey PG, Qiu S, Ding L, Weeber EJ, Linton MF, et al. Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry (Mosc)*. 12 de febrero de 2008;47(6):1631-9.
136. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 23 de marzo de 2006;354(12):1264-72.
137. Tudorache IF, Trusca VG, Gafencu AV. Apolipoprotein E - A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features. *Comput Struct Biotechnol J*. 2017;15:359-65.
138. Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis*. diciembre de 2014;72 Pt A:3-12.
139. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*. 28 de junio de 1991;252(5014):1817-22.
140. Raussens V, Slupsky CM, Sykes BD, Ryan RO. Lipid-bound structure of an apolipoprotein E-derived peptide. *J Biol Chem*. 11 de julio de 2003;278(28):25998-6006.
141. Chen J, Li Q, Wang J. Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 de septiembre de 2011;108(36):14813-8.
142. Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med Berl Ger*. mayo de 2005;83(5):329-42.
143. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*. mayo de 2009;10(5):333-44.
144. Dong LM, Weisgraber KH. Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem*. 9 de agosto de 1996;271(32):19053-7.

145. Solanas-Barca M, de Castro-Orós I, Mateo-Gallego R, Cofán M, Plana N, Puzo J, et al. Apolipoprotein E gene mutations in subjects with mixed hyperlipidemia and a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. junio de 2012;222(2):449-55.
146. Marduel M, Ouguerram K, Serre V, Bonnefont-Rousselot D, Marques-Pinheiro A, Erik Berge K, et al. Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the APOE p.Leu167del mutation. *Hum Mutat*. enero de 2013;34(1):83-7.
147. Awan Z, Choi HY, Stitzel N, Ruel I, Bamimore MA, Husa R, et al. APOE p.Leu167del mutation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. diciembre de 2013;231(2):218-22.
148. Wintjens R, Bozon D, Belabbas K, MBou F, Girardet J-P, Tounian P, et al. Global molecular analysis and APOE mutations in a cohort of autosomal dominant hypercholesterolemia patients in France. *J Lipid Res*. marzo de 2016;57(3):482-91.
149. Khachadurian AK. THE INHERITANCE OF ESSENTIAL FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA. *Am J Med*. septiembre de 1964;37:402-7.
150. Morganroth J, Levy RI, McMahon AE, Gotto AM. Pseudohomozygous type II hyperlipoproteinemia. *J Pediatr*. noviembre de 1974;85(5):639-43.
151. Harada-Shiba M, Tajima S, Yokoyama S, Miyake Y, Kojima S, Tsushima M, et al. Siblings with normal LDL receptor activity and severe hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol*. septiembre de 1992;12(9):1071-8.
152. Zuliani G, Vigna GB, Corsini A, Maioli M, Romagnoni F, Fellin R. Severe hypercholesterolaemia: unusual inheritance in an Italian pedigree. *Eur J Clin Invest*. mayo de 1995;25(5):322-31.
153. Zuliani G, Arca M, Signore A, Bader G, Fazio S, Chianelli M, et al. Characterization of a new form of inherited hypercholesterolemia: familial recessive hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. marzo de 1999;19(3):802-9.
154. Harada-Shiba M, Takagi A, Marutsuka K, Moriguchi S, Yagyu H, Ishibashi S, et al. Disruption of autosomal recessive hypercholesterolemia gene shows different phenotype in vitro and in vivo. *Circ Res*. 29 de octubre de 2004;95(9):945-52.
155. Norman D, Sun XM, Bourbon M, Knight BL, Naoumova RP, Soutar AK. Characterization of a novel cellular defect in patients with phenotypic homozygous familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. septiembre de 1999;104(5):619-28.

156. Garuti R, Jones C, Li W-P, Michaely P, Herz J, Gerard RD, et al. The modular adaptor protein autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) promotes low density lipoprotein receptor clustering into clathrin-coated pits. *J Biol Chem*. 9 de diciembre de 2005;280(49):40996-1004.
157. Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, et al. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*. 18 de mayo de 2001;292(5520):1394-8.
158. Tada H, Kawashiri M, Ohtani R, Noguchi T, Nakanishi C, Konno T, et al. A novel type of familial hypercholesterolemia: double heterozygous mutations in LDL receptor and LDL receptor adaptor protein 1 gene. *Atherosclerosis*. diciembre de 2011;219(2):663-6.
159. Fellin R, Arca M, Zuliani G, Calandra S, Bertolini S. The history of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH). From clinical observations to gene identification. *Gene*. 15 de enero de 2015;555(1):23-32.
160. Brown JM, Yu L. Opposing Gatekeepers of Apical Sterol Transport: Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) and ATP-Binding Cassette Transporters G5 and G8 (ABCG5/ABCG8). *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*. marzo de 2009;9(1):18-29.
161. Brown JM, Yu L. Protein mediators of sterol transport across intestinal brush border membrane. *Subcell Biochem*. 2010;51:337-80.
162. Calandra S, Tarugi P, Speedy HE, Dean AF, Bertolini S, Shoulders CC. Mechanisms and genetic determinants regulating sterol absorption, circulating LDL levels, and sterol elimination: implications for classification and disease risk. *J Lipid Res*. noviembre de 2011;52(11):1885-926.
163. Yu X-H, Qian K, Jiang N, Zheng X-L, Cayabyab FS, Tang C-K. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 20 de enero de 2014;428:82-8.
164. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, et al. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest*. septiembre de 2002;110(5):671-80.
165. Wu T, Fu J, Yang Y, Zhang L, Han J. The effects of phytosterols/stanols on blood lipid profiles: a systematic review with meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2009;18(2):179-86.
166. Bonde Y, Plösch T, Kuipers F, Angelin B, Rudling M. Stimulation of murine biliary cholesterol secretion by thyroid hormone is dependent on a functional ABCG5/G8 complex. *Hepatology*. noviembre de 2012;56(5):1828-37.

167. Sumi K, Tanaka T, Uchida A, Magoori K, Urashima Y, Ohashi R, et al. Cooperative interaction between hepatocyte nuclear factor 4 alpha and GATA transcription factors regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8. *Mol Cell Biol.* junio de 2007;27(12):4248-60.
168. Renner O, Lütjohann D, Richter D, Strohmeyer A, Schimmel S, Müller O, et al. Role of the ABCG8 19H risk allele in cholesterol absorption and gallstone disease. *BMC Gastroenterol.* 13 de febrero de 2013;13:30.
169. Koeijvoets KCMC, van der Net JB, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Mensink RP, Kastelein JJP, et al. ABCG8 gene polymorphisms, plasma cholesterol concentrations, and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* junio de 2009;204(2):453-8.
170. Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, Fuentes F, Mata P, Lopez-Miranda J, Alonso R, et al. Genetic variations at ABCG5/G8 genes modulate plasma lipids concentrations in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* junio de 2010;210(2):486-92.
171. Amor-Salamanca A, Castillo S, Gonzalez-Vioque E, Dominguez F, Quintana L, Lluís-Ganella C, et al. Genetically Confirmed Familial Hypercholesterolemia in Patients With Acute Coronary Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 3 de octubre de 2017;70(14):1732-40.
172. Brænne I, Kleiwecke M, Reiz B, Graf E, Strom T, Wieland T, et al. Systematic analysis of variants related to familial hypercholesterolemia in families with premature myocardial infarction. *Eur J Hum Genet EJHG.* febrero de 2016;24(2):191-7.
173. Pirillo A, Garlaschelli K, Arca M, Averna M, Bertolini S, Calandra S, et al. Spectrum of mutations in Italian patients with familial hypercholesterolemia: New results from the LIPIGEN study. *Atheroscler Suppl.* octubre de 2017;29:17-24.
174. Attia J, Ioannidis JPA, Thakkestian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, et al. How to use an article about genetic association: A: Background concepts. *JAMA.* 7 de enero de 2009;301(1):74-81.
175. Hahn PF. ABOLISHMENT OF ALIMENTARY LIPEMIA FOLLOWING INJECTION OF HEPARIN. *Science.* 2 de julio de 1943;98(2531):19-20.
176. Anfinsen CB, Boyle E, Brown RK. The Role of Heparin in Lipoprotein Metabolism. *Science.* 30 de mayo de 1952;115(2996):583-6.
177. Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* agosto de 2009;297(2):E271-288.

- 
178. Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C, Etienne J, Guilhot S, Svenson K, et al. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. diciembre de 1989;86(24):9647-51.
179. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med Berl Ger*. diciembre de 2002;80(12):753-69.
180. Doolittle MH, Ehrhardt N, Péterfy M. Lipase maturation factor 1: structure and role in lipase folding and assembly. *Curr Opin Lipidol*. junio de 2010;21(3):198-203.
181. Sha H, Sun S, Francisco AB, Ehrhardt N, Xue Z, Liu L, et al. The ER-associated degradation adaptor protein Sel1L regulates LPL secretion and lipid metabolism. *Cell Metab*. 2 de septiembre de 2014;20(3):458-70.
182. Klinger SC, Højland A, Jain S, Kjolby M, Madsen P, Svendsen AD, et al. Polarized trafficking of the sorting receptor SorLA in neurons and MDCK cells. *FEBS J*. 2016;283(13):2476-93.
183. Klinger SC, Glerup S, Raarup MK, Mari MC, Nyegaard M, Koster G, et al. SorLA regulates the activity of lipoprotein lipase by intracellular trafficking. *J Cell Sci*. 1 de abril de 2011;124(Pt 7):1095-105.
184. He P-P, Jiang T, OuYang X-P, Liang Y-Q, Zou J-Q, Wang Y, et al. Lipoprotein lipase: Biosynthesis, regulatory factors, and its role in atherosclerosis and other diseases. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. mayo de 2018;480:126-37.
185. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res*. diciembre de 2002;43(12):1997-2006.
186. Savonen R, Hiden M, Hultin M, Zechner R, Levak-Frank S, Olivecrona G, et al. The tissue distribution of lipoprotein lipase determines where chylomicrons bind. *J Lipid Res*. marzo de 2015;56(3):588-98.
187. Shimada M, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Kawamura M, Inaba T, et al. Overexpression of human lipoprotein lipase in transgenic mice. Resistance to diet-induced hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia. *J Biol Chem*. 25 de agosto de 1993;268(24):17924-9.
188. Ahn J, Lee H, Chung CH, Ha T. High fat diet induced downregulation of microRNA-467b increased lipoprotein lipase in hepatic steatosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 4 de noviembre de 2011;414(4):664-9.

189. Chen T, Li Z, Tu J, Zhu W, Ge J, Zheng X, et al. MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL-stimulated dendritic cells. *FEBS Lett.* 18 de febrero de 2011;585(4):657-63.
190. Sayad A, Noruzinia M, Zamani M, Harirchian MH, Kazemnejad A. Lipoprotein Lipase HindIII Intronic Polymorphism in a Subset of Iranian Patients with Late-Onset Alzheimer's Disease. *Cell J.* 2012;14(1):67-72.
191. Ren L, Ren X. Meta-analyses of four polymorphisms of lipoprotein lipase associated with the risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 21 de abril de 2016;619:73-8.
192. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 29 de abril de 1993;362(6423):801-9.
193. He D, Huang L, Xu Y, Pan X, Liu L. Computational analysis and enzyme assay of inhibitor response to disease single nucleotide polymorphisms (SNPs) in lipoprotein lipase. *J Bioinform Comput Biol.* octubre de 2016;14(5):1650028.
194. Chen H, Jia J, Ni Z, Vastermark A, Wu B, Le Y, et al. Orlistat response to missense mutations in lipoprotein lipase. *Biotechnol Appl Biochem.* julio de 2017;64(4):464-70.
195. Wang Z-B, Zeng H-C, Wei H-S, Yi G-H, Yu J, Wang Y-T, et al. NO-1886 ameliorates glycogen metabolism in insulin-resistant HepG2 cells by GSK-3 $\beta$  signalling. *J Pharm Pharmacol.* febrero de 2012;64(2):293-301.
196. van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JHM, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2 de agosto de 2002;295(5):1156-9.
197. Jakel H, Nowak M, Helleboid-Chapman A, Fruchart-Najib J, Fruchart J-C. Is apolipoprotein A5 a novel regulator of triglyceride-rich lipoproteins? *Ann Med.* 2006;38(1):2-10.
198. Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 3 de junio de 2005;280(22):21553-60.
199. Dorfmeister B, Zeng WW, Dichlberger A, Nilsson SK, Schaap FG, Hubacek JA, et al. Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* octubre de 2008;28(10):1866-71.



200. Doolittle MH, Neher SB, Ben-Zeev O, Ling-Liao J, Gallagher CM, Hosseini M, et al. Lipase maturation factor LMF1, membrane topology and interaction with lipase proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 27 de noviembre de 2009;284(48):33623-33.
201. Yin F, Doolittle MH, Péterfy M. A quantitative assay measuring the function of lipase maturation factor 1. *J Lipid Res.* noviembre de 2009;50(11):2265-9.
202. Cefalù AB, Noto D, Arpi ML, Yin F, Spina R, Hilden H, et al. Novel LMF1 nonsense mutation in a patient with severe hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab.* noviembre de 2009;94(11):4584-90.
203. Paterniti JR, Brown WV, Ginsberg HN, Artzt K. Combined lipase deficiency (cld): a lethal mutation on chromosome 17 of the mouse. *Science.* 8 de julio de 1983;221(4606):167-9.
204. Ikeda Y, Goji K, Takagi A. A compound heterozygote for a novel missense mutation (G105R) in exon 3 and a missense mutation (D204E) in exon 5 of the lipoprotein lipase gene in a Japanese infant with hyperchylomicronaemia. *Clin Sci Lond Engl* 1979. diciembre de 2000;99(6):569-78.
205. Ma Y, Henderson HE, Murthy V, Roederer G, Monsalve MV, Clarke LA, et al. A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in French Canadians. *N Engl J Med.* 20 de junio de 1991;324(25):1761-6.
206. Yang WS, Nevin DN, Iwasaki L, Peng R, Brown BG, Brunzell JD, et al. Regulatory mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial combined hyperlipidemia and coronary artery disease. *J Lipid Res.* diciembre de 1996;37(12):2627-37.
207. GPIHBP1 and Plasma Triglyceride Metabolism. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 21 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27185325>
208. Beigneux AP, Davies BSJ, Tat S, Chen J, Gin P, Voss CV, et al. Assessing the role of the glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) three-finger domain in binding lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 3 de junio de 2011;286(22):19735-43.
209. Llinas P, Le Du MH, Gårdsvoll H, Danø K, Ploug M, Gilquin B, et al. Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO J.* 4 de mayo de 2005;24(9):1655-63.
210. Beigneux AP, Fong LG, Bensadoun A, Davies BSJ, Oberer M, Gårdsvoll H, et al. GPIHBP1 missense mutations often cause multimerization of GPIHBP1 and thereby prevent lipoprotein lipase binding. *Circ Res.* 13 de febrero de 2015;116(4):624-32.

211. Myslting S, Kristensen KK, Larsson M, Beigneux AP, Gårdsvoll H, Fong LG, et al. The acidic domain of the endothelial membrane protein GPIHBP1 stabilizes lipoprotein lipase activity by preventing unfolding of its catalytic domain. *eLife*. 3 de enero de 2016;5:e12095.
212. Charrière S, Peretti N, Bernard S, Di Filippo M, Sassolas A, Merlin M, et al. GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab*. octubre de 2011;96(10):E1675-1679.
213. Weinstein MM, Yin L, Beigneux AP, Davies BSJ, Gin P, Estrada K, et al. Abnormal patterns of lipoprotein lipase release into the plasma in GPIHBP1-deficient mice. *J Biol Chem*. 12 de diciembre de 2008;283(50):34511-8.
214. Kei AA, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Elisaf MS. A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. *Metabolism*. julio de 2012;61(7):906-21.
215. Wang CS. Structure and functional properties of apolipoprotein C-II. *Prog Lipid Res*. 1991;30(2-3):253-8.
216. MacRaid CA, Hatters DM, Howlett GJ, Gooley PR. NMR structure of human apolipoprotein C-II in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry (Mosc)*. 8 de mayo de 2001;40(18):5414-21.
217. Shen Y, Lookene A, Nilsson S, Olivecrona G. Functional analyses of human apolipoprotein CII by site-directed mutagenesis: identification of residues important for activation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 8 de febrero de 2002;277(6):4334-42.
218. Lam C-W, Yuen Y-P, Cheng W-F, Chan Y-W, Tong S-F. Missense mutation Leu72Pro located on the carboxyl terminal amphipathic helix of apolipoprotein C-II causes familial chylomicronemia syndrome. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. febrero de 2006;364(1-2):256-9.
219. Zannis VI, Cole FS, Jackson CL, Kurnit DM, Karathanasis SK. Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry (Mosc)*. 30 de julio de 1985;24(16):4450-5.
220. Andersson Y, Majd Z, Lefebvre AM, Martin G, Sechkin AV, Kosykh V, et al. Developmental and pharmacological regulation of apolipoprotein C-II gene expression. Comparison with apo C-I and apo C-III gene regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. enero de 1999;19(1):115-21.

221. Björkegren J, Karpe F, Milne RW, Hamsten A. Differences in apolipoprotein and lipid composition between human chylomicron remnants and very low density lipoproteins isolated from fasting and postprandial plasma. *J Lipid Res.* julio de 1998;39(7):1412-20.
222. LaRosa JC, Levy RI, Herbert P, Lux SE, Fredrickson DS. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun.* 9 de octubre de 1970;41(1):57-62.
223. AbouRjaili G, Shtaynberg N, Wetz R, Costantino T, Abela GS. Current concepts in triglyceride metabolism, pathophysiology, and treatment. *Metabolism.* agosto de 2010;59(8):1210-20.
224. Tian L, Xu Y, Fu M, Jia L, Yang Y. Influence of apolipoproteinCII concentrations on HDL subclass distribution. *J Atheroscler Thromb.* octubre de 2009;16(5):611-20.
225. Cox DW, Breckenridge WC, Little JA. Inheritance of apolipoprotein C-II deficiency with hypertriglyceridemia and pancreatitis. *N Engl J Med.* 28 de diciembre de 1978;299(26):1421-4.
226. Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem.* 25 de septiembre de 1991;266(27):18259-67.
227. Nauck MS, Nissen H, Hoffmann MM, Herwig J, Pullinger CR, Averna M, et al. Detection of mutations in the apolipoprotein CII gene by denaturing gradient gel electrophoresis. Identification of the splice site variant apolipoprotein CII-Hamburg in a patient with severe hypertriglyceridemia. *Clin Chem.* julio de 1998;44(7):1388-96.
228. Tuzgöl S, Bijvoet SM, Bruin T, Kastelein JJ, Hayden MR. Apolipoprotein CII-Padova (Tyr37-->stop) as a cause of chylomicronaemia in an Italian kindred from Siculiana. *J Med Genet.* agosto de 1994;31(8):622-6.
229. Kuniyoshi A, Okamoto Y, Tamagawa T, Matsuyama Y, Fuku H. A thymidine to cytosine substitution for codon 26 of exon 3 of apolipoprotein C-II gene in a patient with apolipoprotein C-II deficiency. *Intern Med Tokyo Jpn.* febrero de 1999;38(2):140-4.
230. Howlett GJ, Moore KJ. Untangling the role of amyloid in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* octubre de 2006;17(5):541-7.
231. Gerber Y, Goldbourt U, Cohen H, Harats D. Association between serum apolipoprotein C(II) concentration and coronary heart disease. *Prev Med.* julio de 2002;35(1):42-7.

232. Yao Z. Human apolipoprotein C-III - a new intrahepatic protein factor promoting assembly and secretion of very low density lipoproteins. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. diciembre de 2012;12(2):133-40.
233. Caron S, Verrijken A, Mertens I, Samanez CH, Mautino G, Haas JT, et al. Transcriptional activation of apolipoprotein CIII expression by glucose may contribute to diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. marzo de 2011;31(3):513-9.
234. Pavlic M, Valéro R, Duez H, Xiao C, Szeto L, Patterson BW, et al. Triglyceride-rich lipoprotein-associated apolipoprotein C-III production is stimulated by plasma free fatty acids in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. septiembre de 2008;28(9):1660-5.
235. Wang F, Kohan AB, Dong HH, Yang Q, Xu M, Huesman S, et al. Overexpression of apolipoprotein C-III decreases secretion of dietary triglyceride into lymph. *Physiol Rep*. 2014;2(3):e00247.
236. Pollin TI, Damcott CM, Shen H, Ott SH, Shelton J, Horenstein RB, et al. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science*. 12 de diciembre de 2008;322(5908):1702-5.
237. Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjærg-Hansen A. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med*. 3 de julio de 2014;371(1):32-41.
238. Sundaram M, Curtis KR, Amir Alipour M, LeBlond ND, Margison KD, Yaworski RA, et al. The apolipoprotein C-III (Gln38Lys) variant associated with human hypertriglyceridemia is a gain-of-function mutation. *J Lipid Res*. noviembre de 2017;58(11):2188-96.
239. Meyers NL, Larsson M, Vorrstö E, Olivecrona G, Small DM. Aromatic residues in the C terminus of apolipoprotein C-III mediate lipid binding and LPL inhibition. *J Lipid Res*. mayo de 2017;58(5):840-52.
240. Ramms B, Gordts PLSM. Apolipoprotein C-III in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 15 de marzo de 2018;
241. Gaudet D, Brisson D, Tremblay K, Alexander VJ, Singleton W, Hughes SG, et al. Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome. *N Engl J Med*. 4 de diciembre de 2014;371(23):2200-6.
242. Attia J, Ioannidis JPA, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, et al. How to use an article about genetic association: B: Are the results of the study valid? *JAMA*. 14 de enero de 2009;301(2):191-7.

243. Attia J, Ioannidis JPA, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, et al. How to use an article about genetic association: C: What are the results and will they help me in caring for my patients? *JAMA*. 21 de enero de 2009;301(3):304-8.
244. Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, Peloso GM, Gustafsson S, Kanoni S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet*. noviembre de 2013;45(11):1274-83.
245. Kathiresan S, Manning AK, Demissie S, D'Agostino RB, Surti A, Guiducci C, et al. A genome-wide association study for blood lipid phenotypes in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet*. 19 de septiembre de 2007;8 Suppl 1:S17.
246. al WC et. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 19 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Newly+identified+loci+that+influence+lipid+concentrations+and+risk+of+coronary+artery+disease.+Nature+Genet>.
247. Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 19 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hepatic+sortilin+regulates+both+apolipoprotein+B+secretion+and+LDL+catabolism>.
248. Arvind P, Nair J, Jambunathan S, Kakkar VV, Shanker J. CELSR2-PSRC1-SORT1 gene expression and association with coronary artery disease and plasma lipid levels in an Asian Indian cohort. *J Cardiol*. noviembre de 2014;64(5):339-46.
249. Nakayama K, Bayasgalan T, Yamanaka K, Kumada M, Gotoh T, Utsumi N, et al. Large scale replication analysis of loci associated with lipid concentrations in a Japanese population. *J Med Genet*. junio de 2009;46(6):370-4.
250. Sabatti C, Service SK, Hartikainen A-L, Pouta A, Ripatti S, Brodsky J, et al. Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. *Nat Genet*. enero de 2009;41(1):35-46.
251. Wallace C, Newhouse SJ, Braund P, Zhang F, Tobin M, Falchi M, et al. Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *Am J Hum Genet*. enero de 2008;82(1):139-49.
252. Brunzell JD. Familial lipoprotein lipase deficiency, apo C-II deficiency, and hepatic lipase deficiency. *Metab Mol Basis Inherit Dis*. 2001;

253. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 17 de diciembre de 2002;106(25):3143-421.
254. al EM et. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 20 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=omparative+Risk+Assessment+Collaborating+Group.+Selected+major+risk+factors+and+global>
255. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr Obes Rep*. septiembre de 2015;4(3):363-70.
256. Sellayah D, Cagampang FR, Cox RD. On the evolutionary origins of obesity: a new hypothesis. *Endocrinology*. mayo de 2014;155(5):1573-88.
257. González-Muniesa P, Martínez-González M-A, Hu FB, Després J-P, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Primer*. 15 de junio de 2017;3:17034.
258. Yang L, Colditz GA. Prevalence of Overweight and Obesity in the United States, 2007-2012. *JAMA Intern Med*. agosto de 2015;175(8):1412-3.
259. Nazare J-A, Smith JD, Borel A-L, Haffner SM, Balkau B, Ross R, et al. Ethnic influences on the relations between abdominal subcutaneous and visceral adiposity, liver fat, and cardiometabolic risk profile: the International Study of Prediction of Intra-Abdominal Adiposity and Its Relationship With Cardiometabolic Risk/Intra-Abdominal Adiposity. *Am J Clin Nutr*. octubre de 2012;96(4):714-26.
260. OMS | Obesidad y sobrepeso [Internet]. WHO. [citado 20 de abril de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
261. Developmental pathways to adiposity begin before birth and are influenced by genotype, prenatal environment and epigenome. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 20 de abril de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Developmental+pathways+to+adiposity+begin+before+birth+and+are+influenced+by+genotype%2C+prenatal+environment+and+epigenome>

262. Dearden L, Ozanne SE. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol.* octubre de 2015;39:3-16.
263. Barsh GS, Schwartz MW. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet.* agosto de 2002;3(8):589-600.
264. Arner P. Hunting for human obesity genes? Look in the adipose tissue! *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes.* noviembre de 2000;24 Suppl 4:S57-62.
265. Wolff GL. Obesity as a pleiotropic effect of gene action. *J Nutr.* septiembre de 1997;127(9):1897S-1901S.
266. Elks CE, den Hoed M, Zhao JH, Sharp SJ, Wareham NJ, Loos RJF, et al. Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression. *Front Endocrinol.* 2012;3:29.
267. Waalen J. The genetics of human obesity. *Transl Res J Lab Clin Med.* octubre de 2014;164(4):293-301.
268. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obes Silver Spring Md.* abril de 2006;14(4):529-644.
269. Dai H-J, Wu JC-Y, Tsai RT-H, Pan W-H, Hsu W-L. T-HOD: a literature-based candidate gene database for hypertension, obesity and diabetes. *Database J Biol Databases Curation.* 2013;2013:bas061.
270. Loos RJF, Bouchard C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes.* mayo de 2008;9(3):246-50.
271. Zhao X, Yang Y, Sun B-F, Zhao Y-L, Yang Y-G. FTO and obesity: mechanisms of association. *Curr Diab Rep.* 2014;14(5):486.
272. Loos RJF. Recent progress in the genetics of common obesity. *Br J Clin Pharmacol.* diciembre de 2009;68(6):811-29.
273. Murad MH, Hazem A, Coto-Yglesias F, Dzyubak S, Gupta S, Bancos I, et al. The association of hypertriglyceridemia with cardiovascular events and pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocr Disord.* 31 de marzo de 2012;12:2.
274. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program

(NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 16 de mayo de 2001;285(19):2486-97.

275. Santamarina-Fojo S. The familial chylomicronemia syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* septiembre de 1998;27(3):551-67, viii.

276. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* abril de 2010;7(4):248-9.

277. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-81.

278. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* agosto de 2010;7(8):575-6.

279. Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol.* 5 de julio de 1991;220(1):49-65.

280. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol J Comput Mol Cell Biol.* 1997;4(3):311-23.

281. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 1 de noviembre de 2012;491(7422):56-65.

282. Wilson PWF, Grundy SM. The metabolic syndrome: a practical guide to origins and treatment: Part II. *Circulation.* 30 de septiembre de 2003;108(13):1537-40.

283. De Castro-Orós I, Cenarro A, Tejedor MT, Baila-Rueda L, Mateo-Gallego R, Lamiquiz-Moneo I, et al. Common genetic variants contribute to primary hypertriglyceridemia without differences between familial combined hyperlipidemia and isolated hypertriglyceridemia. *Circ Cardiovasc Genet.* diciembre de 2014;7(6):814-21.

284. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 26 de febrero de 2018]. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Surendran+RP%2C+Visser+ME%2C+Heemelaar+S%2C+Wang+J%2C+Peter+J%2C+Defesche+JC%2C+et+al.+Mutations+in+LPL%2C+APOC2%2C+APOA5%2C+GPIHBP1+and+LMF1+in+patients+with+severe+hypertriglyceridemia.+J+Intern+Med.+2012>



285. Hypertriglyceridemia in the genomic era: a new paradigm. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 26 de febrero de 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Gary+FL%2C+Changting+X%2C+Hegele+RA.+Hypertriglyceridemia+in+the+Genomic+Era%3A+A+New+Paradigm.+Endocr+Rev>.
286. Calandra S, Priore Oliva C, Tarugi P, Bertolini S. APOA5 and triglyceride metabolism, lesson from human APOA5 deficiency. *Curr Opin Lipidol*. abril de 2006;17(2):122-7.
287. Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet Lond Engl*. 16 de agosto de 2014;384(9943):626-35.
288. de la Fuente-Arrillaga C, Ruiz ZV, Bes-Rastrollo M, Sampson L, Martínez-González MA. Reproducibility of an FFQ validated in Spain. *Public Health Nutr*. septiembre de 2010;13(9):1364-72.
289. Wenham PR, Price WH, Blandell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet Lond Engl*. 11 de mayo de 1991;337(8750):1158-9.
290. Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet*. 1990;24:133-70.
291. Saltijeral A, Pérez de Isla L, Alonso R, Muñiz O, Díaz-Díaz JL, Fuentes F, et al. Attainment of LDL Cholesterol Treatment Goals in Children and Adolescents With Familial Hypercholesterolemia. The SAFEHEART Follow-up Registry. *Rev Espanola Cardiol Engl Ed*. junio de 2017;70(6):444-50.
292. Palacios L, Grandoso L, Cuevas N, Olano-Martín E, Martínez A, Tejedor D, et al. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain. *Atherosclerosis*. marzo de 2012;221(1):137-42.
293. Futema M, Plagnol V, Li K, Whittall RA, Neil HAW, Seed M, et al. Whole exome sequencing of familial hypercholesterolaemia patients negative for LDLR/APOB/PCSK9 mutations. *J Med Genet*. agosto de 2014;51(8):537-44.
294. Jarauta E, Pérez-Ruiz MR, Pérez-Calahorra S, Mateo-Gallego R, Cenarro A, Cofán M, et al. Lipid phenotype and heritage pattern in families with genetic hypercholesterolemia not related to LDLR, APOB, PCSK9, or APOE. *J Clin Lipidol*. diciembre de 2016;10(6):1397-1405.e2.
295. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general

population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. diciembre de 2013;34(45):3478-3490a.

296. Futema M, Shah S, Cooper JA, Li K, Whittall RA, Sharifi M, et al. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem*. enero de 2015;61(1):231-8.

297. Gutiérrez Fuentes JA, Gómez-Jerique J, Gómez De La Cámara A, Angel Rubio M, García Hernández A, Arístegui I, et al. [Diet and cardiovascular risk in Spain. Description of the evolution of cardiovascular profile]. *Med Clin (Barc)*. 2 de diciembre de 2000;115(19):726-9.

298. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal Biomol Eng*. febrero de 1999;14(5-6):143-9.

299. Dahlén GH, Srinivasan SR, Stenlund H, Wattigney WA, Wall S, Berenson GS. The importance of serum lipoprotein (a) as an independent risk factor for premature coronary artery disease in middle-aged black and white women from the United States. *J Intern Med*. noviembre de 1998;244(5):417-24.

300. Hong Y, Dahlén GH, Pedersen N, Heller DA, McClearn GE, de Faire U. Potential environmental effects on adult lipoprotein(a) levels: results from Swedish twins. *Atherosclerosis*. octubre de 1995;117(2):295-304.

301. Akioyamen LE, Genest J, Shan SD, Reel RL, Albaum JM, Chu A, et al. Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 1 de septiembre de 2017;7(9):e016461.

302. de Ferranti SD, Rodday AM, Mendelson MM, Wong JB, Leslie LK, Sheldrick RC. Prevalence of Familial Hypercholesterolemia in the 1999 to 2012 United States National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES). *Circulation*. 15 de marzo de 2016;133(11):1067-72.

303. Ciccarese M, Pacifico A, Tonolo G, Pintus P, Nikoshkov A, Zuliani G, et al. A new locus for autosomal recessive hypercholesterolemia maps to human chromosome 15q25-q26. *Am J Hum Genet*. febrero de 2000;66(2):453-60.

304. Jakulj L, Vissers MN, Tanck MWT, Hutten BA, Stellaard F, Kastelein JJP, et al. ABCG5/G8 polymorphisms and markers of cholesterol metabolism: systematic review and meta-analysis. *J Lipid Res*. octubre de 2010;51(10):3016-23.

305. Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, et al. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res.* marzo de 2002;43(3):486-94.
306. Hubáček JA, Berge KE, Stefková J, Pitha J, Skodová Z, Lánská V, et al. Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels. *Physiol Res.* 2004;53(4):395-401.
307. Weggemans RM, Zock PL, Tai ES, Ordovas JM, Molhuizen HOF, Katan MB. ATP binding cassette G5 C1950G polymorphism may affect blood cholesterol concentrations in humans. *Clin Genet.* septiembre de 2002;62(3):226-9.
308. Chen Z-C, Shin S-J, Kuo K-K, Lin K-D, Yu M-L, Hsiao P-J. Significant association of ABCG8:D19H gene polymorphism with hypercholesterolemia and insulin resistance. *J Hum Genet.* 2008;53(8):757-63.
309. Wu G, Li G-B, Yao M, Zhang D-Q, Dai B, Ju C-J, et al. ABCG5/8 variants are associated with susceptibility to coronary heart disease. *Mol Med Rep.* junio de 2014;9(6):2512-20.
310. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 18 de 2016;536(7616):285-91.
311. Baila-Rueda L, Cenarro A, Cofán M, Orera I, Barcelo-Batlloiri S, Pocoví M, et al. Simultaneous determination of oxysterols, phytosterols and cholesterol precursors by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in human serum. *Anal Methods.* 2013;5(9):2249–2257.
312. GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, et al. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med.* 06 de 2017;377(1):13-27.
313. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med.* 1 de agosto de 2002;347(5):305-13.
314. Espeland MA, Bray GA, Neiberg R, Rejeski WJ, Knowler WC, Lang W, et al. Describing patterns of weight changes using principal components analysis: results from the Action for Health in Diabetes (Look AHEAD) research group. *Ann Epidemiol.* octubre de 2009;19(10):701-10.
315. Ortega-Alonso A, Sipilä S, Kujala UM, Kaprio J, Rantanen T. Genetic influences on adult body mass index followed over 29 years and their effects on late-life mobility: a study of twin sisters. *J Epidemiol Community Health.* agosto de 2009;63(8):651-8.

316. Qi L. Gene-diet interaction and weight loss. *Curr Opin Lipidol*. febrero de 2014;25(1):27-34.
317. Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. junio de 1996;20(6):501-6.
318. Mateo-Gallego R, Bea AM, Jarauta E, Perez-Ruiz MR, Civeira F. Age and sex influence the relationship between waist circumference and abdominal fat distribution measured by bioelectrical impedance. *Nutr Res N Y N*. junio de 2012;32(6):466-9.
319. Lamiquiz-Moneo I, Baila-Rueda L, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Marco-Benedí V, et al. ABCG5/G8 gene is associated with hypercholesterolemias without mutation in candidate genes and noncholesterol sterols. *J Clin Lipidol*. diciembre de 2017;11(6):1432-1440.e4.
320. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation*. 24 de junio de 2014;129(25 Suppl 2):S102-138.
321. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 24 de junio de 2014;129(25 Suppl 2):S1-45.
322. Poveda A, Ibáñez ME, Rebato E. Common variants in BDNF, FAIM2, FTO, MC4R, NEGR1, and SH2B1 show association with obesity-related variables in Spanish Roma population. *Am J Hum Biol Off J Hum Biol Counc*. octubre de 2014;26(5):660-9.
323. Zhao J, Bradfield JP, Zhang H, Sleiman PM, Kim CE, Glessner JT, et al. Role of BMI-associated loci identified in GWAS meta-analyses in the context of common childhood obesity in European Americans. *Obes Silver Spring Md*. diciembre de 2011;19(12):2436-9.
324. Wang K, Li W-D, Zhang CK, Wang Z, Glessner JT, Grant SFA, et al. A genome-wide association study on obesity and obesity-related traits. *PLoS One*. 28 de abril de 2011;6(4):e18939.

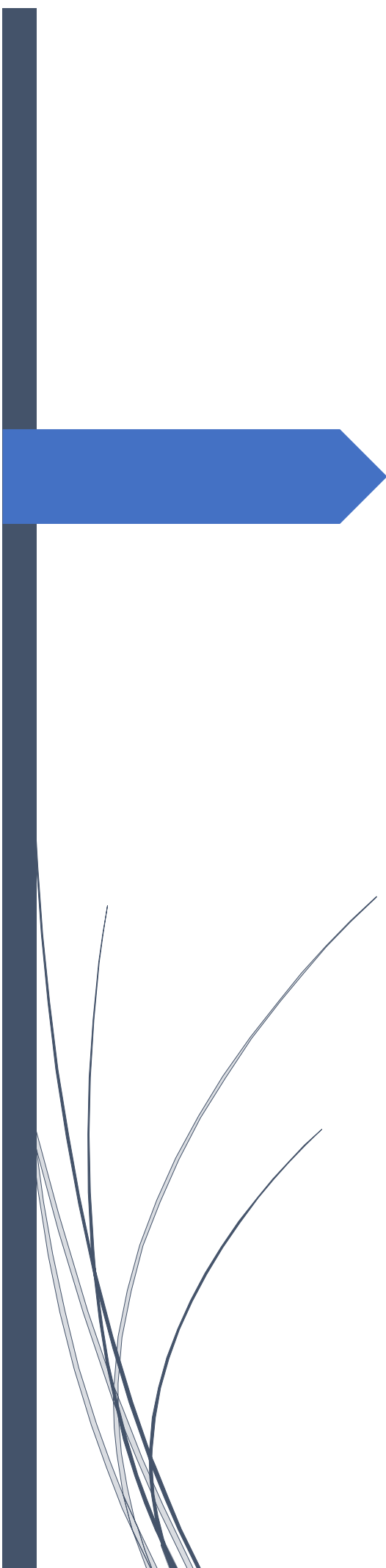
325. Albayrak Ö, Pütter C, Volckmar A-L, Cichon S, Hoffmann P, Nöthen MM, et al. Common obesity risk alleles in childhood attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. junio de 2013;162B(4):295-305.
326. Goumidi L, Cottel D, Dallongeville J, Amouyel P, Meirhaeghe A. Effects of established BMI-associated loci on obesity-related traits in a French representative population sample. *BMC Genet*. 23 de mayo de 2014;15:62.
327. Goodarzi MO. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 14 de septiembre de 2017;
328. Speakman JR. Functional analysis of seven genes linked to body mass index and adiposity by genome-wide association studies: a review. *Hum Hered*. 2013;75(2-4):57-79.



# ANEXOS







**ÁREA TEMÁTICA,  
FACTOR DE IMPACTO Y  
APORTACIÓN DEL  
DOCTORADO EN  
COMPENDIO DE  
PUBLICACIONES**



Publicaciones principales que engloban la Tesis

	Publicación	Área temática	Factor de impacto	Aportación del doctorando
<b>Estudio 1</b>	<u>Lamiquiz-Moneo I</u> , Bea AM, Mateo-Gallego R, Baila-Rueda L, Cenarro A, Pocoví M, Civeira F, De Castro-Orós I. Identification of variants in LMF1 gene associated with primary hypertriglyceridemia. Clin Invest Artioscler. 2015 Sep-Oct;27(5):246-52	Medicina Cardiovascular y cardiología	0,124	Elaboración del diseño del estudio, recogida de datos, secuenciación de los sujetos, análisis de resultados y elaboración del manuscrito
<b>Estudio 2</b>	<u>Lamiquiz-Moneo I</u> , Blanco-Torrecilla C, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Baila-Rueda L, Cenarro A, Civeira F, de Castro-Orós I. Frequency of rare mutations and common genetic variations in severe hypertriglyceridemia in the general population of Spain. Lipids Health Dis. 2016 Apr 23;15:82.	Bioquímica y Biología Molecular	2,219	Elaboración del diseño del estudio, recogida de datos, secuenciación de los sujetos, análisis de resultados y elaboración del manuscrito
<b>Estudio 3</b>	<u>Lamiquiz-Moneo I</u> , Pérez-Ruiz MR, Jarauta E, Tejedor MT, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Baila-Rueda L, Marco-Benedí V, de Castro-Orós I, Cenarro A, Civeira F. Single Nucleotide Variants Associated With Polygenic Hypercholesterolemia in Families Diagnosed Clinically With Familial Hypercholesterolemia. Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2017 Sep 14.	Sistemas cardiacos y cardiovasculares	5,166	Elaboración del diseño del estudio, recogida de datos, secuenciación de los sujetos, análisis de resultados y elaboración del manuscrito
<b>Estudio 4</b>	<u>Lamiquiz-Moneo I</u> , Baila-Rueda L, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Martín-Navarro A, Ros E, Cofán M, Rodríguez-Rey JC, Pocovi M, Cenarro A, Civeira F. ABCG5/G8 gene is associated with hypercholesterolemias without mutation in candidate genes and noncholesterol sterols. J Clin Lipidol. 2017;11(6):1432-40.	Farmacología y Farmacia	3,580	Elaboración del diseño del estudio, recogida de datos, secuenciación de los sujetos, análisis de resultados y elaboración del manuscrito
<b>Estudio 5</b>	<u>Lamiquiz-Moneo I</u> , Mateo-Gallego R, Bea AM, Dehesa-García B, Perez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Baila-Rueda L, Laclaustra M, Civeira F, Cenarro A. Genetic predictors of weight loss in overweight and obese subjects. Obesity. Under review	Endocrinología y metabolismo	4,042	Elaboración del diseño del estudio, recogida de datos, secuenciación de los sujetos, análisis de resultados y elaboración del manuscrito

Publicaciones secundarias realizadas durante la tesis

	<b>Publicación</b>	<b>Área temática</b>	<b>Factor de impacto</b>	<b>Aportación del doctorando</b>
<b>Estudio 6</b>	Mateo-Gallego R, <u>Lamiquiz-Moneo I</u> , Perez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Bea AM, Baila-Rueda L, Laclaustra M, Peñalvo JL, Civeira F, Cenarro A. Different protein composition of low-calorie diet differently impacts adipokine profile irrespective of weight loss in overweight and obese women. <i>Nutr Metab Cardiovasc Dis.</i> 2018 Feb;28(2):133-142.	Sistemas cardíacos y cardiovasculares; Endocrinología y metabolismo; Nutrición y Dietética	3,679	Realización del análisis estadístico y colaboración en la elaboración del manuscrito
<b>Estudio 7</b>	Baila-Rueda L, <u>Lamiquiz-Moneo I</u> , Jarauta E, Mateo-Gallego R, Perez-Calahorra S, Marco-Benedí V, Bea AM, Cenarro A, Civeira F. Association between non-cholesterol sterol concentrations and Achilles tendon thickness in patients with genetic familial hypercholesterolemia. <i>J Transl Med.</i> 2018 Jan 15;16(1):6	Investigation Medica y Experimental	3,786	Realización del análisis estadístico y colaboración en la elaboración del manuscrito
<b>Estudio 8</b>	Baila-Rueda L, Mateo-Gallego R, <u>Lamiquiz-Moneo I</u> , Cenarro A, Civeira F. Severe hypercholesterolemia and phytosterolemia with extensive xanthomas in primary biliary cirrhosis: role of biliary excretion on sterol homeostasis. <i>J Clin Lipidol.</i> 2014 Sep-Oct;8(5):520-4	Farmacología y Farmacia	3,904	Secuenciación de los genes <i>ABCG5/G8</i> y colaboración en la elaboración del manuscrito
<b>Estudio 9</b>	Marco-Benedí V, <u>Lamiquiz-Moneo I</u> , Alvarez-Sala L, Civeira F. Disappearance of recurrent pancreatitis after splenectomy in Familial Chylomicronemia Syndrome. <i>Atherosclerosis.</i> 2018. Jun 21;275:342-345.	Enfermedad vascular periférica	4,467	Secuenciación de los genes <i>LPL, LMF1, GPIHBP1, APOC2</i> y <i>APOA5</i>



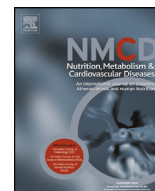
**COMPENDIO DE  
PUBLICACIONES:  
ESTUDIOS  
COMPLEMENTARIOS**





Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

## Nutrition, Metabolism &amp; Cardiovascular Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/nmcd](http://www.elsevier.com/locate/nmcd)

## Different protein composition of low-calorie diet differently impacts adipokine profile irrespective of weight loss in overweight and obese women

R. Mateo-Gallego <sup>a,\*</sup>, I. Lamiquiz-Moneo <sup>a</sup>, S. Perez-Calahorra <sup>a</sup>, V. Marco-Benedí <sup>a</sup>,  
A.M. Bea <sup>a</sup>, L. Baila-Rueda <sup>a</sup>, M. Laclaustra <sup>a</sup>, J.L. Peñalvo <sup>b</sup>, F. Civeira <sup>a</sup>, A. Cénarro <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), Universidad de Zaragoza, CIBERCV, Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Tufts Friedman School of Nutrition Science & Policy, Boston, MA, USA

Received 19 May 2017; received in revised form 27 October 2017; accepted 30 October 2017

Handling Editor: Peter Clifton

Available online ■ ■ ■

### KEYWORDS

Protein;  
Weight loss;  
Adipokines;  
Adipose tissue;  
Obesity;  
Overweight

**Abstract** *Background and aims:* High-protein (HP) diets have shown benefits in cardiometabolic markers such as insulin or triglycerides but the responsible mechanisms are not known. We aimed to assess the effect of three energy-restricted diets with different protein contents (20%, 27%, and 35%; ~80% coming from animal source) on plasma adipokine concentration and its association with changes in cardiometabolic markers.

*Methods:* Seventy-six women (BMI  $32.8 \pm 2.93$ ) were randomized to one of three calorie-reduced diets, with protein, 20%, 27%, or 35%; carbohydrates, 50%, 43%, or 35%; and fat, 30%, for 3 months. Plasma adipokine (leptin, resistin, adiponectin, and retinol-binding protein 4; RBP4) levels were assessed.

*Results:* After 3 months, leptin concentration decreased in all groups without differences among them, while resistin levels remained unchanged. Adiponectin concentration heterogeneously changed in all groups ( $P$  for trend = 0.165) and resistin concentration did not significantly change. RBP4 significantly decreased by  $-17.5\%$  ( $-31.7, -3.22$ ) in 35%-protein diet ( $P$  for trend = 0.024 among diets). Triglycerides improved in women following the 35%-protein diet regardless of weight loss; RBP4 variation significantly influenced triglyceride concentration change by 24.9% and 25.9% when comparing 27%- and 35%- with 20%-protein diet, respectively. *Conclusions:* A 35%-protein diet induced a decrease in RBP4 regardless of weight loss, which was directly associated with triglyceride concentration improvement. These findings suggest that HP diets improve the cardiometabolic profile, at least in part, through changes in adipokine secretion. Whether this beneficial effect of HP diet is due to improvements in hepatic or adipose tissue functionality should be elucidated.

*Clinical trial registration:* The clinical trial has been registered in [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov) (Identifier: NCT02160496).

© 2017 The Italian Society of Diabetology, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition, and the Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** AgRP, Agouti-related peptide; BMI, Body mass index; CRP, C-reactive protein; GGT, Gamma-glutamyl transpeptidase; GPT, Glutamic-pyruvic transaminase; HbA1c, Glycated hemoglobin; HP, High protein; NPY, Neuropeptide Y; RBP4, Retinol-binding protein 4.

\* Corresponding author. Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Av. Isabel La Católica, 1-3, 50009 Zaragoza, Spain. Fax: +34 976369985.

E-mail address: [mateo@iisaragon.es](mailto:mateo@iisaragon.es) (R. Mateo-Gallego).

<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.10.024>

0939-4753/© 2017 The Italian Society of Diabetology, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition, and the Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.





RESEARCH

Open Access



# Association between non-cholesterol sterol concentrations and Achilles tendon thickness in patients with genetic familial hypercholesterolemia

Lucía Baila-Rueda\*, Itziar Lamiquiz-Moneo, Estíbaliz Jarauta, Rocío Mateo-Gallego, Sofía Perez-Calahorra, Victoria Marco-Benedí, Ana M. Bea, Ana Cenarro and Fernando Civeira

## Abstract

**Background:** Familial hypercholesterolemia (FH) is a genetic disorder that result in abnormally high low-density lipoprotein cholesterol levels, markedly increased risk of coronary heart disease (CHD) and tendon xanthomas (TX). However, the clinical expression is highly variable. TX are present in other metabolic diseases that associate increased sterol concentration. If non-cholesterol sterols are involved in the development of TX in FH has not been analyzed.

**Methods:** Clinical and biochemical characteristics, non-cholesterol sterols concentrations and Aquilles tendon thickness were determined in subjects with genetic FH with (n = 63) and without (n = 40) TX. Student-t test o Mann–Whitney test were used accordingly. Categorical variables were compared using a Chi square test. ANOVA and Kruskal–Wallis tests were performed to multiple independent variables comparison. Post hoc adjusted comparisons were performed with Bonferroni correction when applicable. Correlations of parameters in selected groups were calculated applying the non-parametric Spearman correlation procedure. To identify variables associated with Achilles tendon thickness changes, multiple linear regression were applied.

**Results:** Patients with TX presented higher concentrations of non-cholesterol sterols in plasma than patients without xanthomas ( $P = 0.006$  and  $0.034$ , respectively). Furthermore, there was a significant association between 5 $\alpha$ -cholestanol,  $\beta$ -sitosterol, desmosterol, 24S-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol concentrations and Achilles tendon thickness ( $p = 0.002$ ,  $0.012$ ,  $0.020$ ,  $0.045$  and  $0.040$ , respectively).

**Conclusions:** Our results indicate that non-cholesterol sterol concentrations are associated with the presence of TX. Since cholesterol and non-cholesterol sterols are present in the same lipoproteins, further studies would be needed to elucidate their potential role in the development of TX.

**Keywords:** Non-cholesterol sterols, Xanthomas, Familial hypercholesterolemia

## Background

Familial hypercholesterolemia (FH), among the most common inherited metabolic disorders, is due to a group of genetic disorders that result in abnormally high

low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels that cause atherosclerotic plaque deposition in arteries and a markedly increased risk of coronary heart disease (CHD) at a young age [1, 2]. FH has an autosomal codominant inheritance, with homozygotes having twice the LDL cholesterol levels of heterozygotes [1, 2]. The frequency of the heterozygous FH (HeFH) state has traditionally been estimated at 1 in 500 and of the homozygous FH (HoFH) state at 1 in 1,000,000, although recent population analysis have estimated a prevalence as high as 1 in

\*Correspondence: lbaila@iisaragon.es; lubailarueda@gmail.com  
Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), CIBERCV, Universidad de Zaragoza, Av. Isabel La Católica, 1-3, 50009 Saragossa, Spain



Case Studies

# Severe hypercholesterolemia and phytosterolemia with extensive xanthomas in primary biliary cirrhosis: Role of biliary excretion on sterol homeostasis



Lucia Baila-Rueda, BS, Rocio Mateo-Gallego, RD, MSc, Itziar Lamiquiz-Moneo, BS, Ana Cenarro, PhD, Fernando Civeira, MD, PhD\*

*Unidad de Lípidos and Laboratorio de Investigación Molecular, Servicios de Medicina Interna and Endocrinología, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain*

**KEYWORDS:**

Hypercholesterolemia;  
Phytosterolemia;  
Xanthomas;  
Primary biliary cirrhosis

**Abstract:** Primary biliary cirrhosis (PBC) is an autoimmune, chronic, cholestatic liver disease that affects primarily women. PBC is commonly associated with hypercholesterolemia that has been associated with cholestasis. We report an exceptionally high blood cholesterol and phytosterols with just mild cholestasis indicating a selective defect in sterol biliary secretion in a patient with PBC.

© 2014 National Lipid Association. All rights reserved.

## Background

Primary biliary cirrhosis (PBC) is an autoimmune, chronic, cholestatic liver disease that primarily affects women. Histopathologically, PBC is characterized by portal inflammation and immune-mediated destruction of the intrahepatic bile ducts. Serologically, PBC is characterized by the presence of antimitochondrial antibodies, which are present in 90 to 95% of patients and are often detectable years before clinical signs appear.<sup>1</sup> Pruritus can be the most distressing symptom.<sup>2</sup> Other common findings in PBC include fatigue, hypothyroidism, osteopenia, and coexisting autoimmune diseases, including Sjogren's syndrome and scleroderma.<sup>3</sup> PBC is commonly associated with hypercholesterolemia and marked alterations of the enterohepatic circulation of bile acids.<sup>4</sup> Cholesterol

precursors are lower in PBC patients than in control subjects, probably reflecting decreased cholesterol synthesis, whereas increased level of phytosterols or plant sterols (eg, campesterol and sitosterol) and cholestanol, a biliary cholesterol metabolite, are mainly from impaired biliary elimination.<sup>5</sup> Plant sterols and cholestanol plasma concentrations in humans are only about 0.5% of the respective cholesterol values in normal subjects, and this is believed to be produced by a differential intestinal absorption among sterols. Intestinal sterol absorption is mediated by several transporter proteins located at the intestinal brush border membrane. All intestinal sterols are taken up by the enterocyte to a similar extent through the Niemann-Pick C1 Like 1 transporter,<sup>6</sup> and the ATP-binding cassette (ABC) transporters G5 and G8 actively efflux plant sterols back into the intestinal lumen. However, cholesterol is mainly incorporated to chylomicrons and poorly eliminated by ABCG5/G8 transporters.<sup>7</sup> In addition, ABCG5/G8s are located at the canalicular membranes of hepatocytes, where they facilitate efflux of cholesterol and plant sterols into bile.<sup>8</sup>

\* Corresponding author. Hospital Universitario Miguel Servet, Paseo Isabel La Católica 1-3, 50009 Zaragoza, Spain.

E-mail address: [civeira@unizar.es](mailto:civeira@unizar.es)

Submitted March 12, 2014. Accepted for publication May 18, 2014.





Contents lists available at ScienceDirect

## Atherosclerosis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/atherosclerosis](http://www.elsevier.com/locate/atherosclerosis)

## Disappearance of recurrent pancreatitis after splenectomy in familial chylomicronemia syndrome



Victoria Marco-Benedí<sup>a</sup>, Itziar Lamiquiz-Moneo<sup>a</sup>, Luis A. Álvarez-Sala<sup>b</sup>,  
Fernando Civeira<sup>a, c, \*</sup>

<sup>a</sup> Lipid Clinic, Hospital Universitario Miguel Servet, IIS Aragón, CIBERCV, Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Lipid Clinic, Hospital Universitario Gregorio Marañón, IIS Gregorio Marañón (IISGM), Departamento de Medicina. School of Medicine. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 February 2018

Received in revised form

6 June 2018

Accepted 19 June 2018

Available online 21 June 2018

#### Keywords:

Familial chylomicronemia

Lipoprotein lipase deficiency

Pancreatitis

Splenectomy

### ABSTRACT

**Background and aims:** Recurrent pancreatitis is a severe complication of familial chylomicronemia syndrome (FCS) mainly secondary to lipoprotein lipase deficiency. The mechanism and interindividual variability of pancreatitis in FCS are not fully understood, but abnormalities in the drainage system of pancreatic veins could be involved.

**Methods and results:** Two cases of typical FCS are described with a past history of recurrent pancreatitis that dramatically improved after splenectomy performed in both cases for reasons non-related to FCS.

**Conclusions:** These are the first reports of the disappearance of pancreatitis after splenectomy in FCS and they should be considered of anecdotal nature at this time. The disappearance of pancreatitis following splenectomy could be in part due to subsequent improvements in pancreatic drainage. Extrahepatic portal hypertension induced by hypertriglyceridemic splenomegaly leading to pancreatic congestion could also be a contributing factor.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Familial chylomicronemia syndrome (FCS) deficiency is a rare autosomal recessive disorder characterized by the absence or the severe reduction of lipoprotein lipase (LPL) activity and a massive accumulation of chylomicrons in plasma, leading to a large increase of plasma triglyceride concentration, usually greater than 22.5 mmol/l (2000 mg/dl) in the fasting state [1]. FCS is clinically characterized by repeated abdominal pain episodes, recurrent acute pancreatitis, eruptive cutaneous xanthomatosis, *lipemia retinalis* and hepatosplenomegaly. FCS is mostly identified in childhood due to recurrent episodes of pancreatitis and high fasting triglycerides [2]. Pancreatitis is the most serious complication of LPL deficiency. The underlying pathophysiological mechanisms are not fully understood [3]. FCS is a very rare disease with a frequency at about one per million in the general

population, although it may be higher in some populations due to a founder effect [4].

The degree of hyperchylomicronemia in FCS depends, at least in part, on dietary fat intake, but genetic heterogeneity can play a role [5]. It has been observed that a severe restriction of dietary fat to less than 20 g/day is enough to control the symptoms in some cases [6]. In contrast, FCS is usually not responsive to conventional lipid-lowering therapy. Acute pancreatitis characterizes early stages of the disease while some patients may develop recurrent abdominal pain and chronic pancreatitis as the disease progresses. Hepatomegaly and splenomegaly could appear over time when the chylomicronemia becomes chronic. Splenomegaly is less frequently observed than hepatomegaly and can be notably hard. The organomegaly occurs as result of triglyceride uptake by macrophages. These individuals might show anemia and/or thrombocytopenia due to secondary hypersplenism [1,7].

In this study, we describe two unrelated cases of typical FCS with a past history of recurrent pancreatitis controlled in two different lipid clinics in Spain. Both cases have shown a dramatic improvement in pancreatitis after a splenectomy was performed due to reasons non-related to FCS.

\* Corresponding author. Unidad de Lípidos, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Miguel Servet, Avda Isabel La Católica 1-3, 50009, Zaragoza, Spain.

E-mail address: [civeira@unizar.es](mailto:civeira@unizar.es) (F. Civeira).

