

Condicions de HPLC

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

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

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

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

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

Preparació del substrat.

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

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

Assaig

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

REACTIUS I SOLUCIONS

Tampó A

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

pH 7.4 en 1 litre d'aigua destil·lada

3.2.5. Determinació del genotip de l'apolipoproteïna E.

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

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

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

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

Determinació del genotip de l'apolipoproteïna E.

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

Originals

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

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

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

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

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

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

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

Palabras clave:

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

GENETIC VERSUS PHENOTYPE METHODS TO ASSESS APOLIPOPROTEIN E POLYMORPHISM

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

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

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

Correspondencia: Dr. L. Masana.

Facultat de Medicina.

Sant Llorenç, 21. 43201 Reus. Tarragona.

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

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

Key words:

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

Introducción

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

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

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

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

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

Métodos

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

Amplificación de la secuencia de apo-E

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

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

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

SSCP análisis

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

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

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

Restricción con CfoI

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

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

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

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

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

Amplificación de la secuencia de apo-E

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

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

Tabla 1. Resultados cruzados de la determinación genotípica y fenotípica

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

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

Determinación del genotipo

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

Métodos estadísticos

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

Resultados

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

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

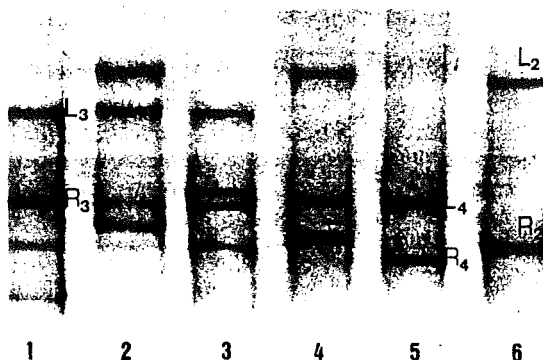


Figura 1. Resultados de un SSCP en el que se muestran los 6 genotipos posibles. 1-E3/3, 2-E2/3, 3-E3/4, 4-E2/4, 5-E4/4 y 6-E2/2. L₂, L₃ y L₄ son las conformaciones lentas de una cadena sencilla de ADN y R₂, R₃ y R₄ son las conformaciones rápidas de la otra cadena sencilla.

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

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

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

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

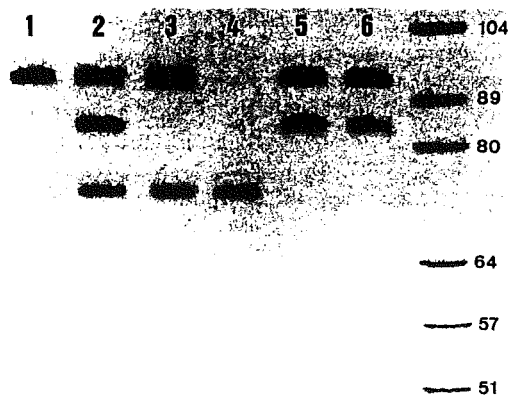


Figura 2. Resultados obtenidos después de la digestión con la enzima CfoI. 1-E3/3, 2-E2/4, 3-E3/4, 4-E4/4, 5-E2/2, 6-E2/3. También podemos observar el tamaño (en pb) de las bandas del marker V (pBR 322 DNA, HaeIII).

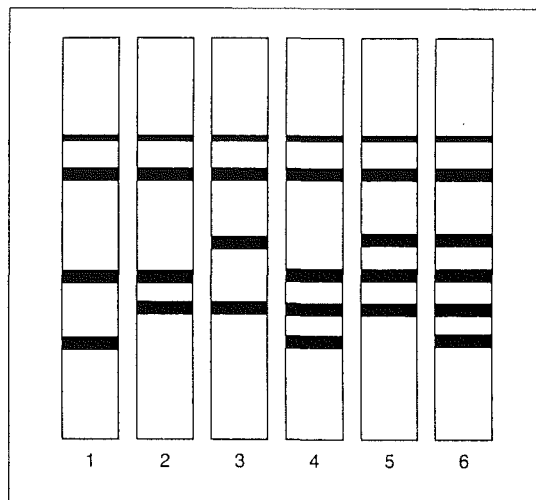


Figura 4. Combinación de bandas que se obtienen al determinar los genotipos mediante el kit comercial. 1-E2/2, 2-E3/3, 3-E4/4, 4-E3/2, 5-E3/4, 6-E2/4.

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

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

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

Discusión

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

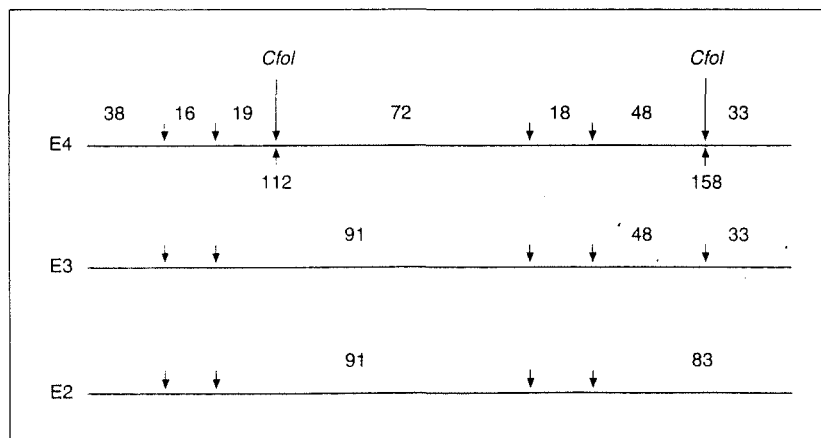


Figura 3. Mapa de restricción para cada isoforma de la apo-E con el tamaño de los fragmentos producidos.

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

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

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

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

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

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

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

Bibliografía

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

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

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

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

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

Josep Ribalta Vives

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

4. RESULTATS i DISCUSSIÓ

4.1. Resum dels Estudis

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

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

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

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

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

Estudi 1

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

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

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

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

Estudi 2

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

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

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

Estudi 3

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

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

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

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

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

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

Estudi 4

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

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

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

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

4.2. ESTUDI 1

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

Introducció

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

Pacientes y métodos

Pacientes

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

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

Análisis lipídicos

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

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

Análisis estadísticos

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

Resultados

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

Lípidos y lipoproteínas

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

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

Apolipoproteínas

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

Discusión

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

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

Agradecimientos

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

Referencias bibliogràficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

^a Significativamente diferente del grupo normolipémico.

^b Significativamente diferente del grupo control.

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

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

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

^a Significativamente diferente del grupo normolipémico.

^b Significativamente diferente del grupo control.

Figura 1. Relación colesterol LDL / colesterol HDL.

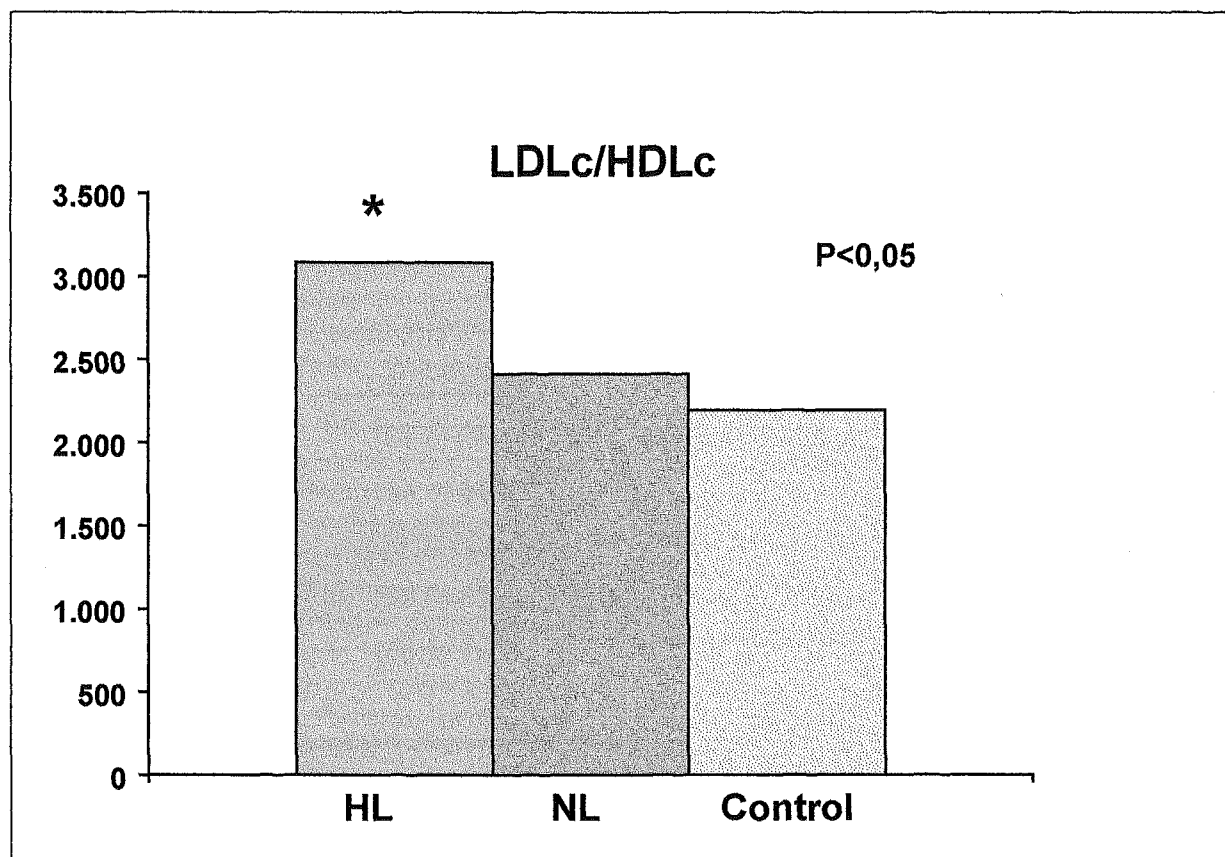


Figura 1 : Se muestran las relación entre colesterol LDL (cLDL) y colesterol de las HDL (cHDL) para los tres grupos de estudio ; niños pertenecientes a familias HLFC hiperlipémicos (HL), normolipémicos (NL) y niños controles.

4.3. ESTUDI 2

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

Ribalta J, La Ville AE, Vallvé JC, Turner PR, Humphries SE, Masana L. *A variation in the apolipoprotein C-III gene is associated with an increased number of circulating VLDL and IDL particles in familial combined hyperlipidemia. J Lipid Res. (Acceptat)*

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

Abstract

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

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

Introduction

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

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

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

Subjects and methods

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

FCHL families

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

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

Normolipidemic control families

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

Unrelated normolipidemic controls

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

Analytical methods

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

Sequential preparative ultracentrifugation

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

DNA Analyses

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

Statistical analyses

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

Results

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

Lipids, lipoproteins and apolipoproteins

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

C₁₁₀₀-T polymorphism in the apo C-III gene

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

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

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

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

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

Discussion

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

Column B - Values obtained on entry into the study.

Mean values expressed as mean (SD).

Table 2. Biometric characteristics of the groups studied.

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

Values expressed as mean (SD).

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

^a Significantly different from HL -rel.

^b Significantly different from NL-rel.

^c Significantly different from controls.

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

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

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

^a Significantly different compared to HL relatives.

^b Significantly different compared to NL relatives.

^c Significantly different compared to controls.

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

All values expressed as means (SD).