

### 3. DISLIPEMIAS CON ALTERACIONES DE LAS VÍAS EXÓGENA Y ENDÓGENA

#### RESUMEN GENERAL

- **Déficit de Lipasa Hepática:** Familiar lipasa hepática deficiencia (MIM 151.670) es una rara enfermedad autosómica recesiva caracterizada por hipertrigliceridemia moderada y enfermedad coronaria prematura. Es una enfermedad poco frecuente, que se manifiesta en la edad adulta.

- *Clinica:* Depende del fenotipo lipídico, pudiendo ser éste de dos tipos: fenotipo III, en el que hay que establecer el diagnóstico diferencial con la disbetalipoproteinemia (cociente VLDL-C/TG < 0,3 y HDL elevadas), y fenotipo IIb, en el que se manifiesta el síndrome de quilomicronemia (Tablas N° 3 y 4). Las LDL y las HDL son muy ricas en triglicéridos con una acumulación de lipoproteínas que contienen apo B, que van desde pequeña densa, VLDL a LDL boyante. Estas VLDL cuentan con movilidad  $\beta$  en gel de agarosa. El diagnóstico se establece por una actividad de la lipasa hepática disminuida, con una prueba de la heparina normal. La técnica de determinación es exactamente igual a la de LPL pero en vez de usar SDS, se usa como inhibidor sulfato de Protamina (inhibidor específico de la enzima LPL).

- *Genética:* El gen responsable está localizado en el cromosoma 15q21-q23.

Doce personas de seis familias se han reportado con deficiencia de la lipasa hepática, la mayoría tienen la aparición de aterosclerosis clínica en su 4º y 5º década de vida. El tratamiento consiste en dieta y el uso de fármacos hipolipemiantes. Heterocigotos tienen una disminución en la actividad de la lipasa hepática. Los hombres tienen una mayor actividad de la lipasa hepática que las mujeres, especialmente los hombres obesos. Alta actividad de la lipasa hepática se asocia con la acumulación de LDL pequeñas y densas y la disminución de HDL2-c, cambios que aumentan el riesgo de una aterosclerosis temprana.

- **Disbetalipoproteinemia (Hiperlipoproteinemia tipo III):** También conocida con el nombre de 'enfermedad de la beta ancha', sigue un modelo de herencia autosómica recesiva, siendo su prevalencia en la población general de aproximadamente 1/5.000-1/10.000, afectando sobre todo a varones. Se expresa en la época adulta, y precisa de factores exógenos como la obesidad, hipotiroidismo, diabetes, etc., para su manifestación clínica.

La hiperlipoproteinemia tipo III es: (1) una dislipoproteinemia altamente aterogénica y más común de lo que se piensa y (2) se puede diagnosticar según el colesterol total, los

triglicéridos y la apoB. **Relación Tg/Apo B < 8,8 y CT/Apo B  $\geq$  2,4** . En nuestro país se suele utilizar el siguiente criterio: (3) niveles de los triglicéridos entre 150-1000 mg/ dl y relación VLDLc/Trigliceridos >0.3

- *Bioquímica*: Los pacientes muestran un fenotipo III (tabla I) con aumento del colesterol total y triglicéridos, con LDL y HDL en rangos normales, y con una característica presencia de VLDLr que migra como pre- $\beta$ -lipoproteínas retrasada, y un cociente VLDL-C/TG superior a 0,3, que es el que permite establecer el diagnóstico.
- *Clínica*: Los enfermos presentan xantomas palmares (tuberosos o planos) y tendinosos, y presentan un riesgo elevado de enfermedad coronaria y vasculopatía periférica (Tabla N<sup>o</sup>4).
- *Genética*: El defecto molecular se localiza en el gen APO E, situado en el cromosoma 19q13.2. Casi todos los pacientes de disbetalipoproteinemia son homocigotos para la Apo E2 (E2/2), que es la forma que presenta una unión más defectuosa al receptor LDL. Además de ésta, existen otras causas de la HLP tipo III, debidas a formas de apoproteína E más infrecuentes, todas ellas con defecto en la unión al receptor, y con un modelo de herencia que parece ser dominante, y manifiesta mayor riesgo vascular.

### HIPERLIPOPROTEINEMIA TIPO III

#### DISBETALIPOPROTEINEMIAS: EL ROL DE APO E EN EL METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS

##### Resumen:

Los pacientes con hiperlipoproteinemia tipo III tienen concentraciones elevadas de colesterol en plasma y los triglicéridos. Una de las características bioquímicas de la enfermedad es la presencia de la banda ancha o  $\beta$ -VLDL, que son el colesterol enriquecido con los restos tanto de quilomicrones intestinal como VLDL hepática. La banda  $\beta$ -VLDL se enriquecen en una variante de apo E, que, en la hiperlipoproteinemia tipo III, es disfuncional.

Las características clínicas de la enfermedad son muy variados. Muchos pacientes con tipo III tienen xantomas cutáneos, especialmente tuberoeruptivo o xantomas tuberosos y xantomas de los pliegues palmares (xantoma striata palmar), este último no han sido identificados en ningún otro trastorno. Estos pacientes tienen una alta incidencia de aterosclerosis prematura coronaria y (especialmente) aterosclerosis periférica. En la forma más común de la enfermedad, la hiperlipidemia es evidente sólo en raras ocasiones se manifiesta antes de la edad adulta. Pacientes con tipo III suelen tener otras enfermedades que agravan la hiperlipoproteinemia.

Apolipoproteína E es una proteína polimórfica que resulta de la existencia de múltiples alelos en un locus único gen y de diferentes sialilación postraduccionales. El polimorfismo genéticamente determinado de apo E tiene un impacto significativo en las variaciones normales de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas en la población humana. El principal defecto molecular en la mayoría de los pacientes con hiperlipoproteinemia tipo III es la presencia de una forma mutante de apo E (apo E-2) que difiere de la normal de apo E (apo E-3) por sólo una sola sustitución de aminoácido (cisteína a arginina en el residuo 158). La apo E-2 variante se une poco a los receptores de lipoproteínas de baja densidad y se asocia con un modo de herencia recesiva de hiperlipoproteinemia tipo III. Otras formas poco comunes de apo E mutante que causa hiperlipoproteinemia tipo III parece estar asociado con la herencia dominante.

El catabolismo normal de partículas de lipoproteínas remanentes, que se dirige por la apo E, se ve alterado en la hiperlipoproteinemia tipo III. La presencia de los resultados defectuosos apo E en la acumulación de restos de quilomicrones y VLDL ( $\beta$ -VLDL) en el plasma. Estas partículas, a su vez tienen una propensión a la captación por los macrófagos en los tejidos periféricos. Como resultado de la deposición de colesterol masiva, estos macrófagos se convierten en células espumosas, que pueden ser los progenitores de células cargadas de colesterol en la lesión aterosclerótica.

En la forma recesiva de la enfermedad, el desarrollo de la hiperlipidemia abierta requiere la herencia de dos alelos de la apo E mutante [E-2 (Arg 158 Cys  $\rightarrow$ )]. La presencia de los alelos defectuosos es necesaria, pero no suele ser suficiente para inducir la hiperlipoproteinemia tipo III. La mayoría de los pacientes E-2 / 2 son normolipidémicos o incluso hipocolesterolémicos. Por lo tanto, el desarrollo de la forma recesiva de la hiperlipidemia abierta implica otras influencias genéticas, hormonales o ambientales que, en combinación con el receptor defectuoso unión de apo E, precipitar el desarrollo de la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Los factores secundarios incluyen el hipotiroidismo, bajo condiciones de estrógenos, la obesidad, la diabetes y la edad.

En la forma dominante de la enfermedad, los sujetos que poseen un solo alelo para una de las variantes raras de apo E tienen la hiperlipidemia abierta, probablemente desde el nacimiento. Secundaria los factores genéticos, hormonales o ambientales por lo general no están obligados a precipitar la acumulación de lipoproteínas remanentes en el plasma, pero los factores secundarios a veces son capaces de modular la severidad de la enfermedad.

El diagnóstico de hiperlipoproteinemia tipo III se realiza por el aumento de colesterol y

triglicéridos en plasma, la presencia de  $\beta$ -VLDL, xantomas (especialmente palmar xantomas), enfermedad vascular prematura (especialmente de las arterias periféricas), y por lo general el fenotipo apo E E-2 / 2 . El sello distintivo de diagnóstico de este trastorno es la presencia de apo E que es defectuoso en la unión a receptores de lipoproteínas.

Hiperlipoproteinemia tipo III por lo general responde bien al tratamiento. El control dietético es el tratamiento preferido, pero un régimen de medicamentos también puede ser necesaria a los niveles de lípidos más bajos. Fármacos útiles para el tratamiento de la hiperlipoproteinemia tipo III son el ácido nicotínico, los derivados del Fibratos, y de la HMG-CoA reductasa. En particular, gemfibrozil parece ser el fármaco de elección en el tratamiento de este trastorno.

## **1. HISTORIA**

1950. Fue descrito por primera vez por Gofman y col. y lo llamo originalmente xantoma tuberosum, basado en excesivo numero de xantomas en tendones extensores y en la superficie de las manos.

1967. Fredrickson y col. la establecen como una hiperlipoproteinemia tipo III. Basó su clasificación de las distintas dislipoproteinemias usando ultracentrifugación y electroforesis en papel. Se la denomina también como enfermedad de la banda ancha, enfermedad de la remoción de remanentes y disbetalipoproteinemia

1973. Havel y Kane demuestran en plasma de pacientes con esta enfermedad, un incremento en los niveles plasmáticos de Apo E o *apoproteína rica en arginina*. Apo E es un componente de VLDL, QM y ciertas subclases de HDL. Apo E fue descubierto como el mayor ligando del R de LDL y es la apoproteína que media la captación de los QM y VLDL remanentes. La apo E mutante no se une normalmente a los receptores de lipoproteínas, generando la acumulación de  $\beta$ -VLDL.

## **2. PATOGÉNESIS DE HIPERLIPOPROTEINEMIA TIPO III**

La hiperlipoproteinemia tipo III o de remanentes es una dislipoproteinemia altamente aterogénica caracterizada por la acumulación marcada de partículas de lipoproteínas remanentes enriquecidas en colesterol de origen hepático e intestinal. Existe un aumento de los niveles de colesterol y triglicéridos.

El acumulo de remanentes tienen múltiples consecuencias metabólicas: primero, debido a que su tiempo de residencia en plasma es notablemente prolongado, estas partículas se acumulan en grandes cantidades en plasma. En segundo lugar, durante este período prolongado en la circulación, se enriquecen con colesterol a medida que adquieren un exceso de éster de colesterol debido a los intercambios con HDL. En consecuencia, estas partículas anormales remanentes tienen una proporción alta de colesterol/triglicéridos (C/TG), una proporción alta de CT/apoB y propiedades electroforéticas anormales.

Tercero, debido a que las partículas de VLDL no se convierten en la proporción habitual a LDL, el número de partículas de LDL es bajo en relación a apo B-VLDL con niveles normales de apo B total en plasma. En consecuencia, las proporciones de apoB-VLDL/apoB-LDL y apoB-VLDL/apoB total se vuelven mayores de lo normal.

La aparición de la bancha ancha se debe a la imposibilidad de la depuración de los remanentes debido que Apo E mutante no se unen normalmente a R-LDL, HSPG y/o LRP1 lo que genera la acumulación de las lipoproteínas remanentes en el plasma de los pacientes.

Weisgraber y col. (1982) demostró que Apo E2 de un paciente con hiperlipoproteinemia tipo III tiene 1-2 % de capacidad de unión comparado a la unión de Apo E3 y Apo E4 al RLDL, ver figura 11a. Demostrando que la depuración de Apo E2 fue significativamente retardada, sugiriendo un defecto en el ligando más que un defecto en los receptores. Figura 11b.

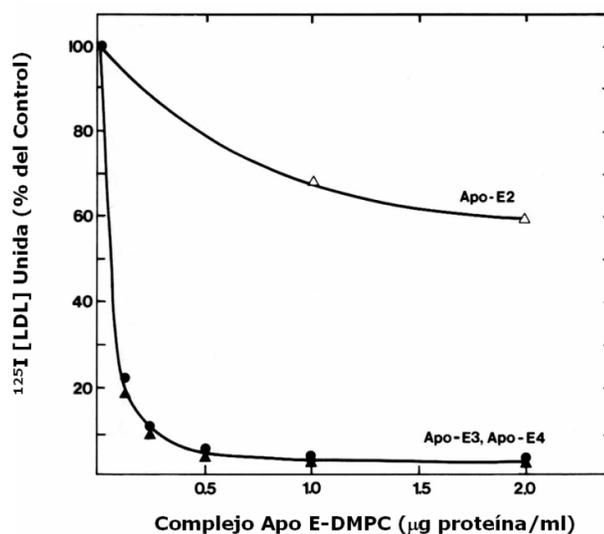


Figura11a: Actividad de Binding del receptor de Apo E-2 ( $\Delta$ ), Apo E-3 ( $\blacktriangle$ ) y apo E-4( $\bullet$ ) seguido como un ensayo de competición *in vitro*.  $^{125}\text{I}$ [LDL] como un competidor para el binding de complejos apoE-DMPC (di-miristoil-fosfatidilcolina) a fibroblastos humanos normales. ApoE2 es desde pacientes HL tipo III.

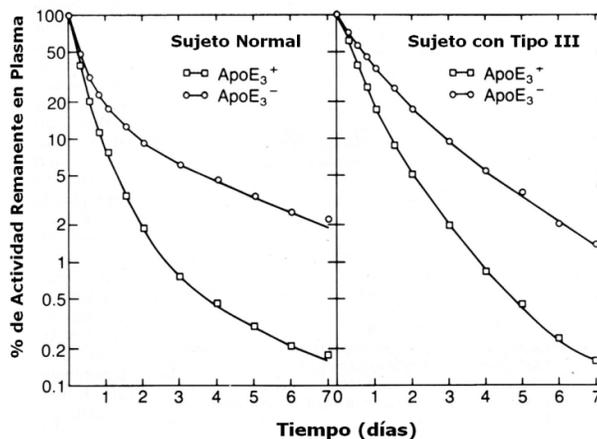


Figura 11b: Depuración de Apo E-3 (E<sub>3</sub><sup>+</sup>) y Apo E-2 (E<sub>3</sub><sup>-</sup>) simultáneamente inyectada en pacientes normales (izquierda) y con HL tipo III (derecha).

La apoE plasmática se sintetiza principalmente por los hepatocitos del hígado, que representan aproximadamente el 75% de la producción de apoE del cuerpo. En sujetos normolipidémicos, la concentración plasmática de apoE es aproximadamente 4-8mg/dl. El segundo órgano más común que sintetiza la apoE es el cerebro, donde se produce principalmente por astrocitos, pero también por oligodendrocitos, microglia y neuronas, especialmente neuronas dañadas o estresadas. En el cerebro, la apoE se sintetiza in situ y no atraviesa la barrera hematoencefálica de la circulación periférica. Apo E es sintetizada por varios tejidos como tejidos periféricos, como el riñón, los adipocitos y varias células en todo el cuerpo, incluyendo macrófagos.

Sirve como un ligando para la captación mediada por receptores de lipoproteínas a través del R de LDL (R-LDL), receptores de LRP y proteoglicanos de sulfato de heparan. La apoE se asocia a quilomicrones, VLDL, IDL, y HDL. En los ratones knockout para ApoE, se acumulan lipoproteínas ricas en colesterol como IDL y  $\beta$ -VLDL causando aterosclerosis rápida en el cuerpo.

El gen *APOE* humano bandea en el cromosoma 19 en un grupo con los genes *APOC1*, *APOC4* y *APOC2*.

ApoE es una glicoproteína con un peso molecular de 34 kDa que consta de 299 aminoácidos. La apoE recién sintetizada se modifica por O- glicosilación en Thr194, y esta modificación postraduccional permite que apoE muestre varias isoformas no genéticas contribuidas por la sialilación diferencial. Los polimorfismos de *APOE* pueden provocar variaciones en los niveles de

colesterol y triglicéridos en la sangre y, por lo general, se han determinado tres fenotipos diferentes (E2, E3, E4) mediante técnicas de enfoque isoeléctrico e inmunotransferencia de plasma, figura N°12. El haplotipo ApoE3 es la isoforma predominante. ApoE4 se diferencia de apoE3 por una sustitución de aminoácidos en la posición 112 (C112R), mientras que apoE2 tiene una sustitución en la posición 158 (R158C). La genotipificación de *APOE* se realiza principalmente mediante PCR seguida de digestión con enzimas de restricción y análisis de los fragmentos de restricción en geles de poliacrilamida. Este método determina la presencia de los tres alelos *APOE* más comunes ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ ). ApoE4 se asocia con un aumento de los niveles de colesterol, lo que aumenta el riesgo de enfermedad cardíaca. Además, los individuos con E4 / E4 tienen un riesgo muy alto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. La mayoría de los pacientes con LH tipo III son homocigotos para apoE2.

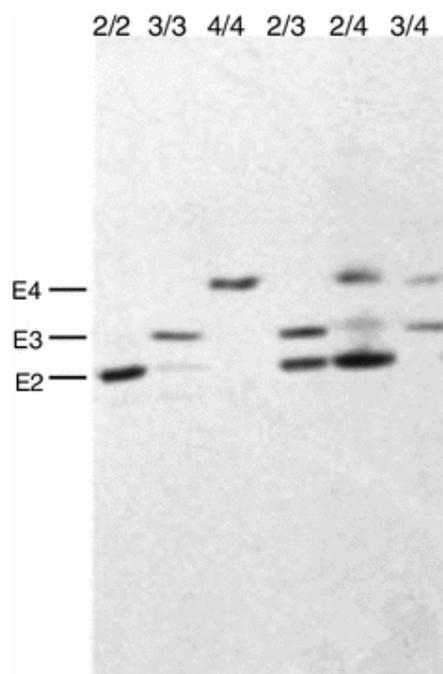


Figura N°18: Enfoque isoeléctrico y análisis de inmunotransferencia del fenotipo apoE. Los seis carriles muestran los fenotipos apoE E2 / E2, E3 / E3, E4 / E4, E2 / E3, E2 / E4 y E3 / E4, respectivamente.

ApoE contiene dos dominios estructurales, un N-terminal y un C-terminal, cada uno asociado con una función específica. El dominio N-terminal contiene la región de unión al receptor de lipoproteínas y el dominio C-terminal contiene los principales

elementos de unión a lípidos. La mayor parte de la estructura secundaria, aproximadamente el 62%, consiste en hélices  $\alpha$  anfipáticas, mientras que el resto está formado por láminas  $\beta$  (9%), giros  $\beta$  (11%) y estructuras aleatorias (18%). La unión del receptor es importante para la captación celular de lipoproteínas, y se cree que se produce debido a las interacciones iónicas entre los residuos básicos de apoE y los residuos ácidos (de los ácidos aspártico y glutámico) del receptor de lípidos. La unión lipídica más fuerte se produce en la porción del terminal carboxilo, entre los residuos 244-272.

Los estudios de cristalografía de rayos X muestran que el dominio N-terminal se pliega en un haz de cuatro hélices de  $\alpha$ -hélices anfipáticas, que contiene la región de unión al receptor. La hélice 4 en apoE2 contiene un reordenamiento crítico del puente salino que reduce el potencial positivo del lado de unión al receptor LDL en caja. Asp-154 cambia su interacción iónica a Arg-150 en apoE2 debido a la sustitución Cys-158, sacando la cadena lateral de Arg-150 de la nube de potencial positivo y reduciendo su potencial. La isoforma apoE2 muestra <2% de la actividad de unión al receptor normal y está asociada con un modo recesivo de herencia de HL tipo III. En esta forma recesiva, el desarrollo de hiperlipidemia manifiesta requiere la herencia de dos alelos de *APOE 2*. La aparición de los alelos defectuosos es necesaria pero no suele ser suficiente para inducir el tipo III HL. Además, la mayoría de los sujetos con apo E2 / E2 son normolipidémicos o incluso hipocolesterolémicos. Por lo tanto, el desarrollo de la forma recesiva de hiperlipidemia manifiesta implica otras influencias genéticas, hormonales o ambientales que, en combinación con la unión defectuosa del receptor de apoE, precipitan el desarrollo de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia. Los factores secundarios incluyen diabetes, hipotiroidismo, condiciones de bajo nivel de estrógeno, obesidad y edad.

### **3. APOPROTEÍNA E: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN**

#### ***Gen***

El gen de Apo E tiene una longitud de 3,7 Kb y se encuentra en el cromosoma 19. Está constituido por 4 exones. El RNAm tiene 1164 nt, el transcrito primario tiene 317 aminoácidos con un péptido señal de 18 aminoácidos sobre el extremo N-terminal. La apo E madura es secretado como una proteína de 299 aminoácidos.

#### ***Proteína***

Se ha encontrado expresión de RNAm en hígado, cerebro, bazo, pulmón, glándula adrenal, ovario, riñón y músculo. La mayor producción es en hígado.

Modelo de la estructura de Apo E libre de lípidos. El dominio N-terminal consiste de un manojo de 4 hélices (hélice 1, rojo; hélice 2, azul; hélice 3, verde; hélice 4, amarillo). El dominio N-terminal contiene la región de unión al receptor de LDL (R-LDL) en la hélice 4. La región de alta afinidad al R-LDL requiere también la Arg172 in la región bisagra que conecta los dominios N- y C terminal. El dominio N-terminal contiene 2 posiciones polimórficas en posición 112 y 158 que distingue las 3 isoformas de Apo E. El dominio C-terminal (gris) contiene los principales elementos de unión a lipoproteínas.

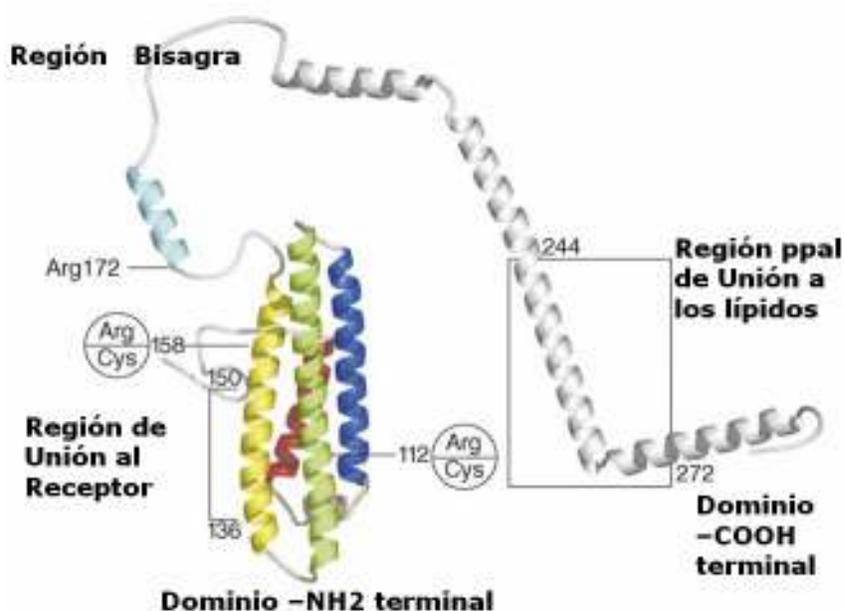


Figura N° 19: Elementos estructurales de apo E.

Tabla N° : Frecuencia de las isoformas de Apo E humanas y sus diferencias						
Isoforma	Frecuencia alelica (%)	Variación de aminoácido		Afinidad RLDL	Preferencia binding a LP	Desordenes Asociados
		112	158			
Apo E2	7	Cys	Cys	Baja	HDL	HLP tipo III
Apo E3	78	Cys	Arg	Alta	HDL	Desconocidos
Apo E4	15	Arg	Arg	Alta	VLDL, LDL	Alzheimer, aterosclerosis

### ***Influencia del aminoácido en posición 158 sobre la actividad de binding del R LDL***

La presencia de cisteína en posición 158 afecta un arreglo de un puente salino en Apo E3 y Apo E2 resultante en una posición diferente de Arg 150 que altera la habilidad de interactuar efectivamente con los R-LDL.

En Apo E3, Arg 158 forma un puente salino con Asp 154 (línea a puntos).

En Apo E2, por el contrario, Asp 154 forma un puente salino con Arg 150 (línea a puntos), lo cual deteriora la región de unión al RLDL y cambia su conformación y propiedades, ver figura N°12.

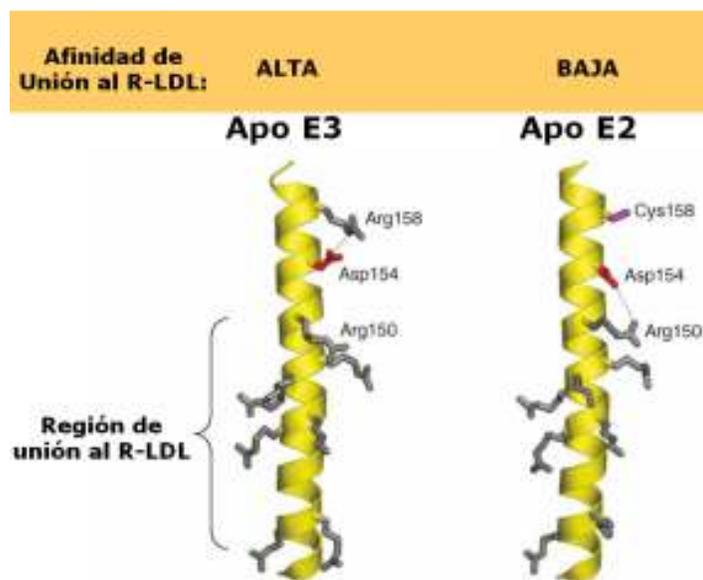


Figura N° 19-b:

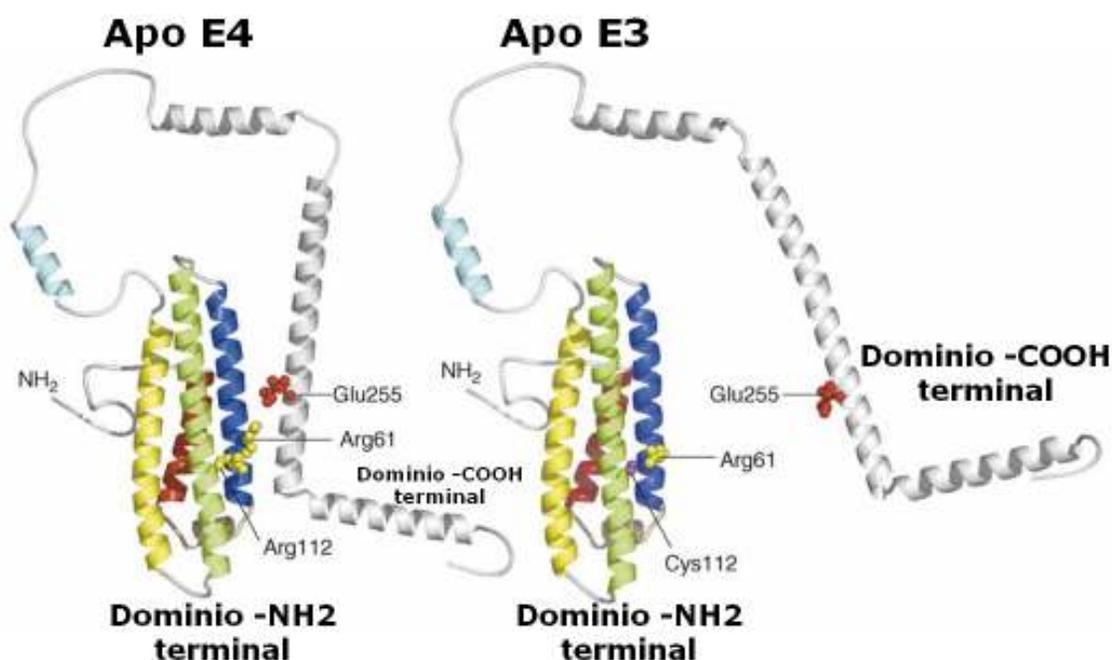


Figura N<sup>o</sup>20: Influencia del dominio de interacción sobre la estructura de apo E. En Apo E4, el dominio de interacción ocurre como un resultado de un puente salino putativo entre Arg61 y Glu255 que estabiliza un contacto cercano entre los dominios N- y C-terminal. Esta interacción no ocurre en la misma extensión en Apo E2 y E3, debido que la cadena lateral de Arg61 adopta una conformación distinta debido a Cys 112, resultando en una cadena lateral menos accesible a la formación del puente salino con Glu255.

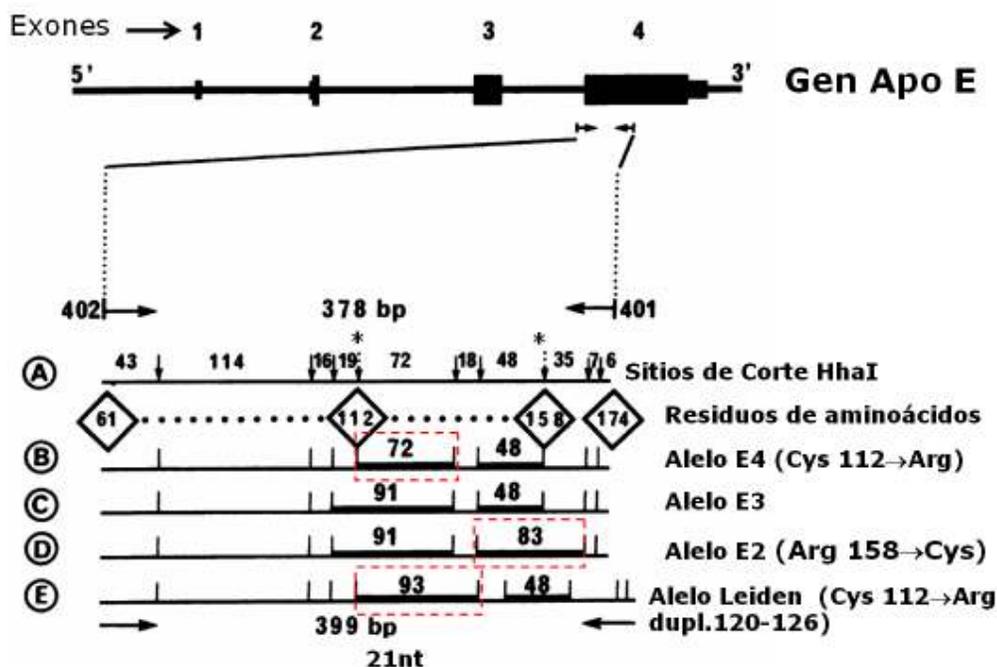


Figura 21: Representación esquemática del gen de Apo E y variaciones alélicas

***Rol de Apolipoproteína E en el Metabolismo de los Remanentes***

La Apo E es una proteína constituyente de distintas lipoproteínas incluyendo QM, QMr, VLDL, IDL, y subclase de HDL. La principal función de Apoproteína E es mediar la interacción de lipoproteínas con receptores de lipoproteínas, incluyendo Receptor de LDL y el R remanente para Apoproteína E o QMr. El receptor remanente es = LRP (proteína relacionada al R de LDL).

Apo E3 y Apo E2 se unen preferencialmente a las HDL, mientras que Apo E4 se asocia a las VLDL. El QMr pierden Apo A-I y A-IV y adquieren Apolipoproteína E y Apo Cs. Los remanentes de VLDL, obtienen Apo E durante su síntesis hepática.

**Pasos involucrados en la depuración (clearance) y captación hepática de QM y VLDLr:**

- a- Secuestro
- b- Procesamiento
- c- Captación (Internalización)

a- Secuestro en el espacio de Disse: se ha postulado que la acumulación inicial resulta de la unión de las lipoproteínas a los proteoglicanos presente en el espacio de Disse. Apo E es conocido por su capacidad de ávida unión al heparan sulfato de origen hepático. Se ha demostrado que ApoE se acumula en el espacio de Disse donde se adhieren a los proteoglicanos o a los R de lipoproteínas como LRP.

b- Procesamiento de los QMr por lipasas en el sinusoides de la célula endotelial o en el espacio de Disse. La enzima Lipasa Hepática (LH), al igual que LPL, se une al sulfato de heparan y está involucrada en el procesamiento final de los remanentes. La LH tiene actividad de triglicérido-hidrolasa y fosfolipasa (en menor medida) y sus sustratos son los remanentes (QMr e IDL) y la fracción HDL<sub>2</sub>.

**c- Internalización:**

Las partículas remanentes resultantes son depuradas posteriormente por los receptores en el hígado, que incluyen los receptores R-LDL, LRP<sub>1</sub>, y proteoglicanos de sulfato de heparán. Recientemente, se ha mostrado que sindecano-1 es el principal receptor de proteoglicano de sulfato de heparán en el hígado, y que funciona en paralelo, pero de forma independiente de los otros receptores en ambas partículas de lipoproteínas derivadas del intestino e hígado.

Se ha demostrado que los QMr son depurados por el R de LDL en un 25-35 %. Sin embargo el receptor LRP, Proteína relacionada al R-LDL (LDL receptor-related protein), que tiene como ligando únicamente la Apo E y está presente en el hígado, juega un rol importante en la captación de QMr. Algunos autores han sugerido que la interacción de remanentes con los proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG, heparan sulfate proteoglycans), en forma previa, parece ser requerida para la unión con LRP y su internalización. Ver figura 12 a y b. Últimamente (2011), se han descrito que estos proteoglicanos son una familia de receptores de proteoglicanos de sulfato de heparan (heparan sulfate proteoglycan, HSPG), de los cuales el Sindecano 1 es el más expresado en hígado.

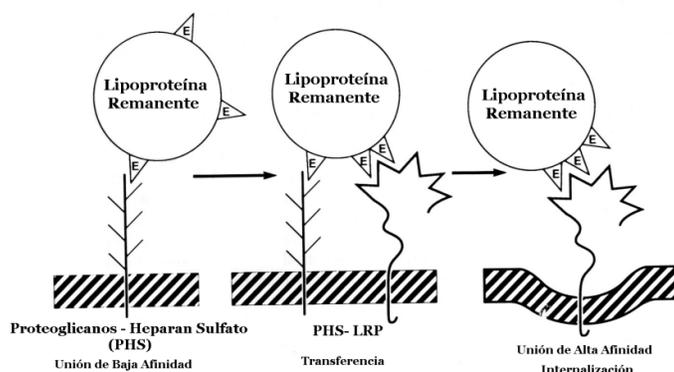


Figura 22a: Proteoglicanos de heparán sulfato (PHS) (Sindecan) son responsables de la unión inicial de los remanentes enriquecidos con Apo E.

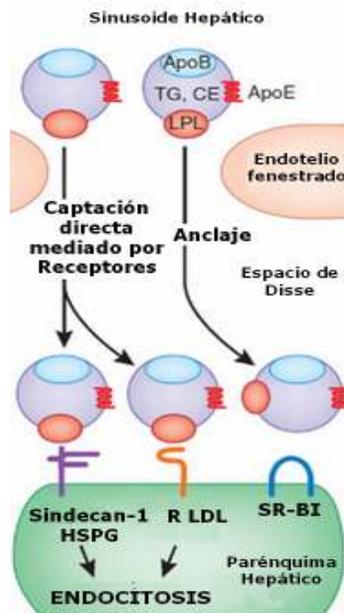


Figura N°22b: El segundo paso del catabolismo de LRT es la captación hepática eficiente de las lipoproteínas remanentes completas. Los remanentes viajan a través del endotelio hepático fenestrado y son captados por 2 tipos de receptores endocíticos (the syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan (HSPG) y el receptor de LDL y LRP y un receptor de anclaje (scavenger receptor class B type I (SR-BI). Modificado de *Nature Medicine* 17, 157–159 (2011)

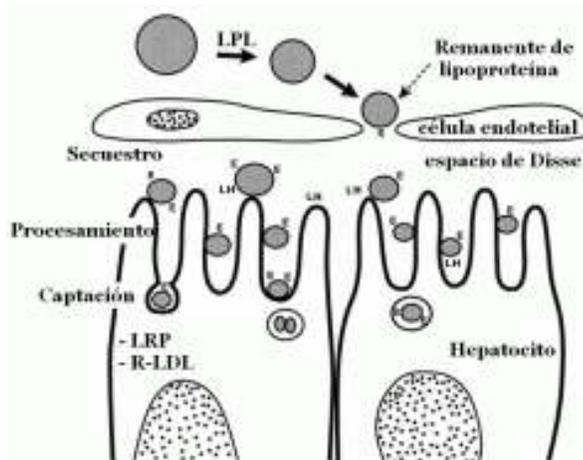


Figura N°22c

**4. VARIACIONES ALÉLICAS Y GENÉTICA DE APO E**

El desarrollo de fenotipo tipo III depende de la presencia de variantes alélicas del gen Apo E. Los polimorfismos del gen Apo E lo puso de manifiesto Utermann y col (1979) con técnicas de isoelectroenfocado donde encontró 3 fenotipos homocigotos de Apo E. La sustitución de aminoácidos genera la diferencia de carga que permite diferenciarlas.

**Figura 23.**

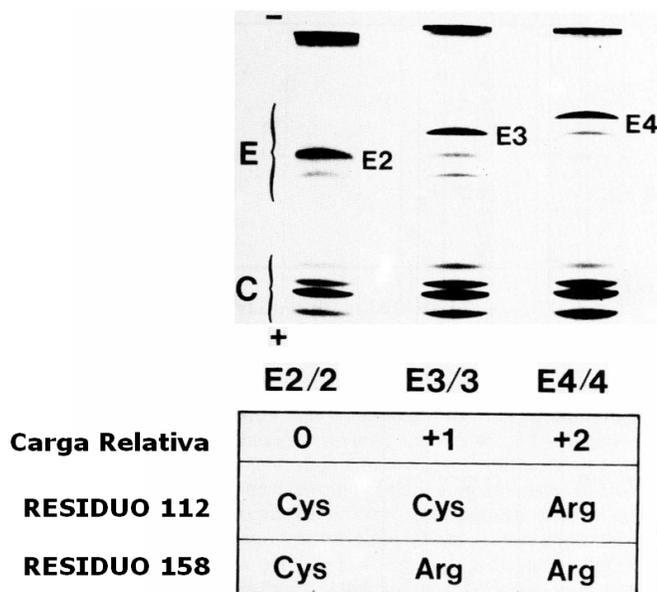


Figura 23: Isoelectroenfocado de apo-VLDL, demostrando los 3 fenotipos de Apo E

En 1982, se unificó el sistema de nomenclatura para la genética y los polimorfismos de Apo E: existen 3 isoformas de Apo E son E-4, E-3, E-2 siendo el E-4 el más básico (pI≈6,1).

## ApoE2

Debido a que se une de manera defectuosa a los receptores de LDL, la homocigosidad de la apoE2 genera una hiperlipoproteinemia tipo III. Este trastorno ocurre solo cuando otra afección (diabetes, obesidad, hipotiroidismo o deficiencia de estrógenos) conduce a una sobreproducción de VLDL o menos receptores de LDL, abrumando la capacidad limitada de apoE2 para mediar la eliminación de  $\beta$ -VLDL rico en triglicéridos y colesterol. Otras mutaciones dominantes y recesivas en la apoE que afectan los residuos en o alrededor de la región de unión del receptor también causan hiperlipoproteinemia tipo III. La unión defectuosa del receptor puede precipitar la hiperlipidemia en el contexto de otros factores genéticos o ambientales y aumentar el riesgo de aterosclerosis, ya que los  $\beta$ -VLDL que se acumulan en el plasma son altamente aterogénicos y causan acumulación de colesterol, especialmente en las arterias periféricas.

## ApoE4

ApoE4 aumenta los niveles plasmáticos de LDL y el riesgo de aterosclerosis. La preferencia de unión a lipoproteínas de apoE4 a VLDL rica en triglicéridos (30–80 nm) se asocia con niveles elevados de LDL. (ApoE3 y apoE2 se unen preferentemente a pequeñas partículas esféricas HDL de 9–16 nm enriquecidas en fosfolípidos y proteínas de superficie, principalmente apoAI). El enriquecimiento de VLDL con apoE4 acelera su eliminación del plasma mediante endocitosis mediada por receptores en el hígado; como resultado, existe una menor expresión de los R-LDL por regulación con aumento en los niveles de LDL en plasma.

El aclaramiento hepático de las lipoproteínas enriquecidas con apoE que involucra R-LDL, R-LRP y proteoglicanos de sulfato de heparan, todos los cuales interactúan con alta afinidad con apoE.

ApoE4 es el principal factor de riesgo genético de la enfermedad de Alzheimer (EA) y otros trastornos neurológicos, incluidos lesiones después de un trauma o un accidente cerebrovascular, demencia frontotemporal, síndrome de Down, ciertos pacientes con enfermedad de Parkinson y enfermedad por cuerpos de Lewy.

ApoE4 afecta dramáticamente para el desarrollo de la EA, se sabe que un 65 a 80% de todos los pacientes con EA portan al menos un alelo apoE4. ApoE4 aumenta el riesgo de desarrollar EA en 4 veces (un alelo) a 14 veces (dos alelos) en comparación con la homocigosidad de apoE3 /3, y disminuye la edad de inicio en 8 años para cada alelo apoE4 (inicio a mediados de los años sesenta con dos alelos). Es importante destacar que los alelos apoE4 no son raros: ~ 25% de las personas en todo el mundo tienen al menos un alelo apoE4.

### **5. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS**

- Presentan niveles aumentados de colesterol y triglicéridos plasmáticos generalmente oscilan entre 300- 1000 mg/dl.
- La relación colesterol-VLDL / triglicéridos plasmáticos (expresada en mg/dl) es muy útil para documentar esta hiperlipemia. Cuando la relación es mayor 0,3 se puede afirmar que el individuo padece una hiperlipemia tipo III.
- Presencia de lipoproteínas anormales: banda ancha=  $\beta$ -flotante=  $\beta$ -VLDL = LDL+IDL+VLDL. Considerablemente rica en ésteres de colesterol y relativamente deplecionadas en triglicéridos.
- Uso del Algoritmo de Apo B: El diagnóstico convencional de dislipoproteinemia tipo III se basa en la demostración de las partículas de lipoproteínas remanentes anormales. Esto requiere la separación de las lipoproteínas mediante ultracentrifugación y, luego, el análisis químico o la electroforesis. La ultracentrifugación y la electroforesis no están disponibles en la clínica regular. Sin embargo, un algoritmo simple basado en los niveles de colesterol total, triglicéridos y apoB hace posible el diagnóstico del tipo III prácticamente en cualquier laboratorio de química clínica moderna. Se puede diagnosticar con los niveles de colesterol total, triglicéridos y apoB.

**Relación  $Tg \geq 130$  mg/dl con Apo B=Normal. Las relaciones  $Tg/Apo B < 8,8$  y con  $CT/Apo B \geq 2,4$ . Figura N° 24.**

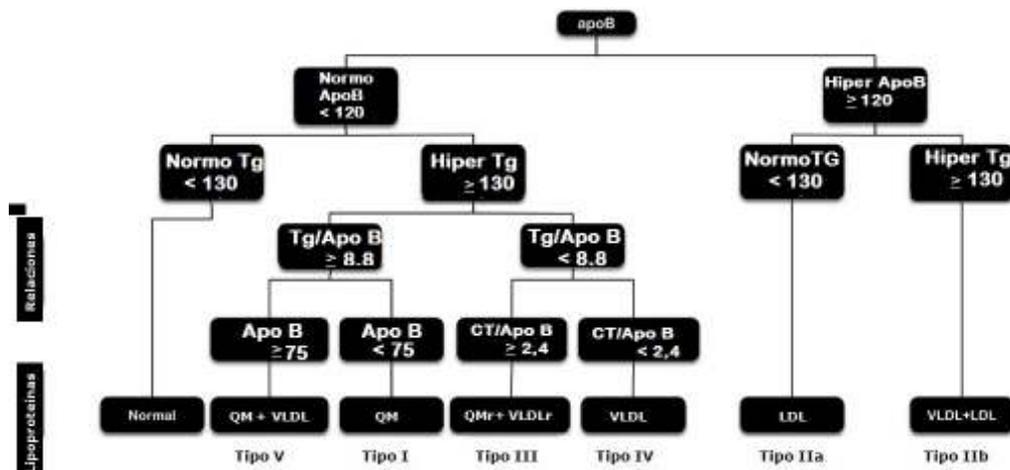


Figura 24: Algoritmo diagnóstico basado en los niveles de Apo B. Los valores están expresados en mg/dl

**METODOS DE DIAGNOSTICO DE LABORATORIO** (tomado de Wikinski y col., 2010)

**I-Ensayos cualitativos:** El método de Wieland y Seidel consiste en una electroforesis en gel de agarosa y una incubación posterior durante 2 h con una solución de MgCl<sub>2</sub> 0,1 mol/l, heparina 1,5 g/l, y NaCl 10 g/l que conduce a la inmovilización de los QR y VLDL-R que conforman lipoproteínas remanentes (RLPs). Las IDLs se visualizan como una banda ancha de beta-VLDL. La técnica es simple y permite detectar cantidades elevadas de RLPs, compatibles con la HL tipo III. Sin embargo, no constituye una prueba que certifique la disbetalipoproteinemia primaria.

**II-Ensayos cuantitativos:** Se destacan dos métodos electroforéticos y uno inmunoquímico.

**II-1-Método Electroforético** (Wikinski, Schreier y Rosental) consiste en la electroforesis en gel de agarosa de suero entero, que separa quilomicrones en el origen, una banda ancha que comprende la zona entre el origen y la beta, donde también quedan las beta lipoproteínas (LDL). La zona alfa es ocupada por las HDL. Para separar los RLPs de la LDL, se realiza una incubación con la solución de Wieland y Seidel, que inmoviliza los remanentes porque neutraliza su carga eléctrica, y en una segunda electroforesis se separan las LDL que conservaron su carga negativa. La banda de RLPs se visualiza, se recupera y se usa para extraer y medir el colesterol con reactivo férrico. La medida de colesterol de RLPs separados por este método se comparó con la medida del colesterol de IDL y beta-VLDL separadas por ultracentrifugación a densidad

hidratada 1.006-1.019 g/ml y correlacionó significativamente,  $r = 0.96$  ( $P < 0.001$ ). Los valores de referencia en individuos normales fueron  $5.7 \pm 7.0$  mg/dl. Siete pacientes con fenotipos de HL tipo III presentaron las concentraciones más altas de colesterol-RLPs de  $162 \pm 345$  mg/dl. Se encontró aumento moderado de RLPs en pacientes diabéticos de tipos I y II. Este método puede implementarse en todo laboratorio clínico donde se realicen lipidogramas en gel de agarosa.

**II-2- Método Electroforético:** El método de separación de lipoproteínas en gel de poliacrilamida no desnaturizante de Blom y col., es útil para pesquisa de HL tipo III. El suero preteñido con Sudan Black se siembra en un gel en gradiente de 2 a 8% a 4 °C. Luego de 8-12 horas de electroforesis, se puede inspeccionar visualmente y ver las VLDL pequeñas + IDL con una sensibilidad de 72% y una alta especificidad de 95%. La videodensitometría revela disbetalipoproteinemia con 100% de especificidad, midiendo el área bajo la curva que distingue las VLDL grandes de las pequeñas, IDL elevadas y LDL disminuidas con relación  $IDL/LDL > 0.5$ .

**II-3-El método inmunoquímico** (de Campos, Nakajima y cols.) se fundamenta en que los RLPs enriquecidos en Apo E, que no contienen Apo C ni Apo B-48, no precipitan con anticuerpos monoclonales anti Apo B-100 y anti Apo A-1, los cuales están incorporados a una columna con sefarosa que luego se eluye para liberar las lipoproteínas no unidas. En el eluato se mide preferentemente colesterol. El anticuerpo anti Apo B-100 utilizado es único porque no reconoce Apo B en RLPs y sólo se une con Apo B-100-LDL o Apo B-100-VLDL. Está patentado en Japón (Japan Immuno Research Laboratories) y actualmente es el método cuantitativo de elección.

Los valores de colesterol-RLPs son similares a los obtenidos por el método de Wikinski y col. ya citado.

## **6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La variante más común de la Apo E que causa esta enfermedad resulta de Apo E<sub>2</sub>, que es una simple sustitución de arginina por cistina (Arg 158 → Cys). Aproximadamente, 1% de la población de América del Norte y la población del Norte de Europa es homocigoto para la forma mutante (fenotipo Apo E-2/2) que esta asociado con la hiperlipoproteinemia tipo III. Sin embargo, la hiperlipoproteinemia (con elevados

niveles de colesterol y triglicéridos) solo ocurre con una frecuencia de cerca 1-5/5000 en la población en general.

Cuando se analizaron las características clínicas (ver tabla) en 185 pacientes (131 hombres y 54 mujeres), homocigotos para la apolipoproteína E2, se encontró: que hubo una alta prevalencia de xantomas (55%), enfermedad coronaria (28%) y la aterosclerosis (39%), y especialmente, enfermedad vascular periférica (21%).

La edad media al diagnóstico de la enfermedad fue de 49 años en varones y 53 años en mujeres. Las mujeres usualmente expresan este desorden después de la menopausia.

Los xantomas son el hallazgo clínico más frecuente de esta enfermedad y es patognomónico para la hiperlipoproteinemia tipo III. Este particular xantoma llamado xantoma planar o xantoma palmar (“xanthoma striata palmaris”) ocurre como depósitos amarillos de lípidos en los pliegues palmares; alrededor de la mitad de los pacientes no tratados tienen esta particular lesión.

<b>Número pacientes</b>	<b>185</b>
<b>Hombre/ Mujeres</b>	<b>131/54</b>
<b>Rango de edad, Años</b>	<b>16 a 95</b>
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	<b>450</b>
<b>Triglicéridos(mg/dl)</b>	<b>570</b>

<b>Hallazgos Clínicos</b>	<b>% de Pacientes</b>
<b>Xantomas:</b>	
<b>Palmar</b>	<b>55</b>
<b>Tendon</b>	<b>13</b>
<b>Tuberoso y tuberoeruptivo</b>	<b>64</b>
<b>Xantelasma</b>	<b>7</b>
<b>Arco Corneal</b>	<b>11</b>
<b>Enfermedad coronaria</b>	<b>28</b>
<b>Enfermedad Vascular periférica</b>	<b>21</b>
<b>Enfermedad cerebro vascular</b>	<b>4</b>
<b>Gota</b>	<b>4</b>
<b>Diabetes mellitus</b>	<b>4</b>
<b>Hipotiroidismo</b>	<b>4</b>

Figura N°25: Características clínicas de la HLP tipo III



Figura 26: Ejemplos de xantomas en sujetos con HLIII. A- Xantomas tuberosos. B- Xantomas en líneas de la palma de la mano.

## **7. DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO**

El diagnóstico se realiza por:

- Presencia de la  $\beta$ -VLDL por electroforesis
- Xantomas en los pliegues palmares
- Apo E2 homocigota (2/2)

Hiperlipoproteinemia tipo III por lo general responde bien al tratamiento. El control dietético es el tratamiento preferido, pero también puede ser necesario un régimen de medicamentos para mantener los niveles de lípidos más bajos.

Reducir la ingesta calórica de grasas (30% del total de calorías) y colesterol (250-300 mg/día).

Fármacos útiles para el tratamiento de la hiperlipoproteinemia tipo III son el ácido nicotínico, los derivados del fibratos, y de la HMG-CoA reductasa (lovastatin y simvastatina). En particular, gemfibrozil (600mg dos veces al día) parece ser el fármaco de elección en el tratamiento de este trastorno.

### **DEFICIENCIA FAMILIAR DE LIPASA HEPÁTICA**

La deficiencia de LH (MIM 151670) se caracteriza por una moderada hipertrigliceridemia y enfermedad arterial coronaria prematura. LDL y HDL son muy ricas en triglicéridos con una acumulación de lipoproteínas que contienen apo B que se distribuyen en el rango desde LDL pequeña, VLDL hasta LDL boyante. Esta VLDL tiene movilidad  $\beta$  sobre un gel de agarosa.

Es un trastorno autosómico recesivo debido a mutaciones en el cromosoma 15q21. La mutación provoca un déficit lipolítico de las partículas VLDL remanentes y dificultad para el reconocimiento y aclaramiento plasmático de remanentes de quilomicrones y VLDL. El espectro lipoproteico puede confundirse con el de una disbetalipoproteinemia apareciendo hipercolesterolemia, aumento de LDLc, de los niveles de ApoB e hipertrigliceridemia. A diferencia de la deficiencia de LPL en la deficiencia de lipasa hepática hay además un aumento del HDLc (60-100 mg/dL) por aumento de la fracción HDL2. Se considera que el riesgo cardiovascular de quienes lo padecen se encuentra elevado. Pueden aparecer xantomas eruptivos y hay también riesgo de pancreatitis si la hipertrigliceridemia es importante.

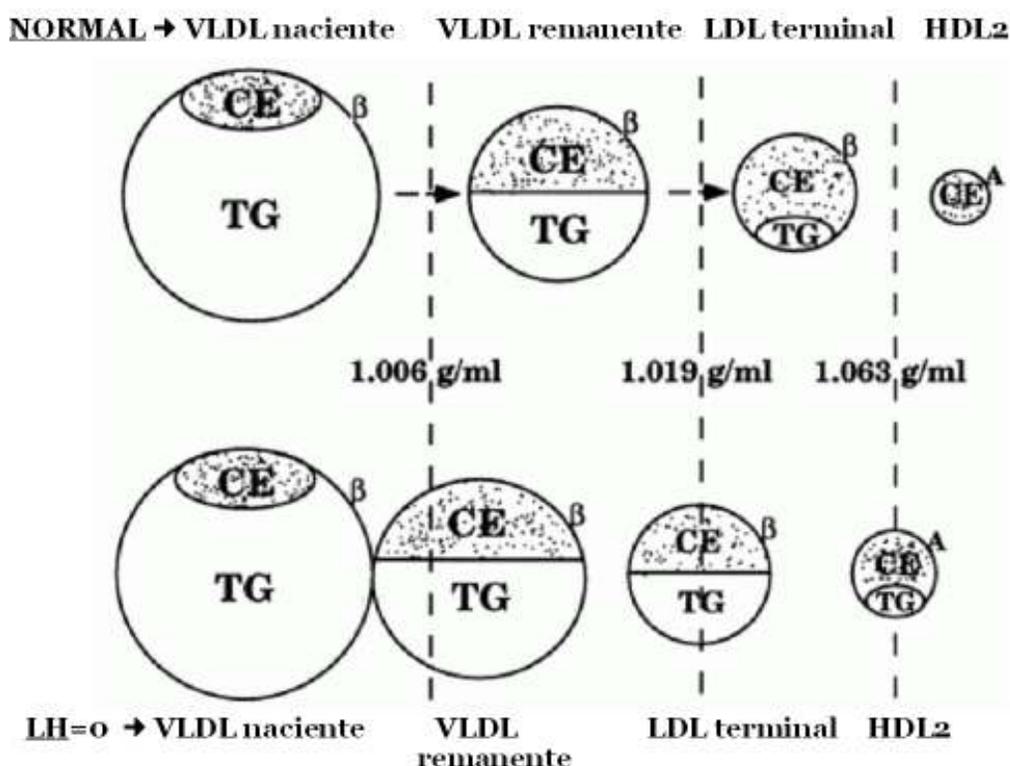


Figura 27: El defecto de la lipasa hepática (LH) incrementa la flotabilidad de todas las lipoproteínas, generando cambios en el tamaño y la densidad de todo el espectro. En condiciones normales, una densidad de 1,006 g/ml separa el espectro de las VLDL de las IDL; una  $\delta=1,019$  g/ml separa las IDL de las LDL y  $\delta=1,063$  g/ml separa las LDL de las HDL. Si hay deficiencia de LH hay un enriquecimiento de triglicéridos y fosfolípidos que genera que todas las lipoproteínas se desplacen a un rango de menor densidad los que hace que todas las lipoproteínas sean más flotadoras o boyantes.

Aparición de la lipoproteínas boyantes o flotadoras:

El enriquecimiento de triglicéridos de las LDL y HDL en la deficiencia total de la lipasa hepática refleja el defecto en estas lipoproteínas en la hidrólisis de triglicéridos (y fosfolípidos). Un defecto en la captación de los remanentes (de quilomicrones e IDL) por el hígado, lo cual parece ser independiente de la actividad lipolítica, podría jugar un

papel en la dislipidemia. El defecto lipolítico podría aumentar la flotabilidad de todas las lipoproteínas a través del espectro habitual de lipoproteínas, basado en su tamaño y densidad. De esta forma, las lipoproteínas que contiene apo B en la cascada de las VLDL a LDL que se encuentra en la fracción de densidad de 1,019 a 1,063 g / ml, se extiende en el rango de IDL (1,006 a 1,019 g / ml).

LH cataliza la hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos de los remanentes de IDL y de grandes LDL boyantes que resultan en partículas de mayor densidad. La ausencia de actividad de LH genera partículas de LDL grandes boyantes, enriquecidas en triglicéridos y fosfolípidos.

La enfermedad coronaria prematura que sufren estos individuos puede estar explicada por un aumento de la captación y retención arterial de lipoproteínas que contienen apo B de composición anormal y/o una función defectuosa de las HDL en el transporte reverso.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- **STANLEY C. RALL, JR, ROBERT W. MAHLEY.** Chapter 61: Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The Role of Apolipoprotein E in Normal and Abnormal Lipoprotein Metabolism. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. Volume II. Charles R. Scriver, Arthur L. Beaudet, William S. Sly and David Valle, EDITORS. McGraw-Hill. Seventh Edition. (p.1953-1980).
- **REGINA WIKINSKI, LAURA E. SCHREIER, GABRIELA A. BERG, FERNANDO D. BRITES, GRACIELA LOPEZ, ANA I. GONZALEZ, VALERIA ZAGO** LIPOPROTEINAS REMANENTES ATEROGENICAS EN HUMANOS. *MEDICINA (Buenos Aires)* 2010; 70: 375-380
- **Danny M. Hatters, Clare A. Peters-Libeu and Karl H. Weisgraber.** Apolipoprotein E structure: insights into function. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.31 No.8: 445-454
- **ROBERT W. MAHLEY, STANLEY C. RALL, JR.** PART 12: LIPIDS Chapter 119: Type III Hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia): The Role of Apolipoprotein E in Normal and Abnormal Lipoprotein Metabolism. Page 1-59. 2011. The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. Editors: Valle, Beaudet, Vogelstein, Kinzler, Antonarakis & Ballabio. Editors Emeritus: Scriver, Childs & Sly.
- **Kevin Jon Williams & Edward A Fisher.** Globular warming: how fat gets to the furnace. *Nature Medicine* 17, 157–159 (2011)