

Disminución de triglicéridos sin ayuno y reducción de mortalidad por cualquier causa: un estudio de randomización mendeliana

Low nonfasting triglycerides and reduced all-cause mortality: a mendelian randomization study

► Thomsen M^{1,2}, Varbo A^{1,2}, Tybjaerg-Hansen A^{2,3,4}, Nordestgaard BG^{1,3,4*}

¹ Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital Herlev, Hospital Universitario de Copenhague, Copenhague, Dinamarca.

² Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Copenhague, Dinamarca.

³ *Copenhagen City Heart Study*, Hospital Frederiksberg, Hospital Universitario de Copenhague, Copenhague, Dinamarca.

⁴ Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario de Copenhague-Rigshospitalet, Copenhague, Dinamarca.

* Dirección de correspondencia de este autor: Department of Clinical Biochemistry, Herlev Hospital, Copenhagen University Hospital, Herlev Ringvej 75, DK-2730 Herlev, Denmark. Fax: 45-3868-3311; e-mail: boerge.nordestgaard@regionh.dk

Traducción: Dr. Diego Lucero y Prof. Dra. Laura Schreier. Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Este artículo ha sido traducido con el permiso de la AACC. La AACC no es responsable de la exactitud de la traducción. Las opiniones expresadas son las de los autores y no necesariamente de la AACC o de la Revista. Tomado de *Clin Chem* 2014; 60 (5): 737-46, con el permiso del editor. Derechos de autor original © Asociación Americana de Química Clínica, Inc, 2014. Al citar este artículo, por favor recurra a la fuente original de publicación en la revista *Clinical Chemistry*.

This article has been translated with the permission of AACC. AACC is not responsible for the accuracy of the translation. The views presented are those of the authors and not necessarily those of the AACC or the Journal. Reprinted from Clin Chem. 2014; 60 (5): 737-46, by permission of the publisher. Original copyright © 2014 American Association for Clinical Chemistry, Inc. When citing this article, please refer to the original publication source in the journal Clinical Chemistry.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

Antecedentes: El aumento de los triglicéridos plasmáticos sin ayuno, marcador del aumento de colesterol en lipoproteínas remanentes, es un importante factor de riesgo para enfermedad cardiovascular, pero se desconoce si la reducción en las concentraciones de triglicéridos, sobre una base genética, a lo largo de toda la vida en última instancia conduce a una menor mortalidad por cualquier causa. Pusimos a prueba esta hipótesis. **Métodos:** Estudiando individuos del *Copenhagen City Heart Study* en un diseño de randomización mendeliana, en primer lugar estudiamos si las menores concentraciones de triglicéridos sin ayuno se asociaron con una reducción de mortalidad por cualquier causa en un análisis observacional (n=13.957); segundo, si variantes genéticas en la enzima hidrolizante de triglicéridos lipoproteína lipasa, que resultan en reducción de los triglicéridos plasmáticos sin ayuno y del colesterol de remanentes, se asociaron con una reducción de mortalidad por cualquier causa (n=10.208). **Resultados:** Durante una mediana de 24 y 17 años de seguimiento, completado en un 100%, 9.991 y 4.005 personas murieron en el análisis observacional y genético, respectivamente. En el análisis observacional en comparación con los individuos con triglicéridos plasmáticos sin ayuno de 266 a 442 mg/dL (3,00-4,99 mmol/L), los *hazard ratios* ajustados en modelo multivariado para mortalidad por cualquier causa fueron 0,89 (IC 95%: 0,78-1,02) para 177-265 mg/dL (2,00-2,99 mmol/L), 0,74 (0,84-0,65) para 89 a 176 mg/dL (1,00-1,99 mmol/L), y 0,59 (0,51-0,68) para las personas con triglicéridos sin ayuno < 89 mg/dL (< 1,00 mmol/L). El *odds ratio* para una disminución en la concentración de triglicéridos plasmáticos sin ayunos de 89 mg/dL (1 mmol/L) derivado genéticamente fue de 0,50 (0,30-0,82), con un *hazard ratio* observacional correspondiente de 0,87 (0,85-0,89). Además, el *odds ratio* correspondiente a una disminución del 50% en la concentración de triglicéridos plasmáticos sin ayuno, derivada genéticamente, fue de 0,43 (0,23-0,80), con un *hazard ratio* observacional correspondiente de 0,73 (0,70-0,77). **Conclusiones:** Concentraciones plasmáticas de triglicéridos sin ayuno genéticamente reducidas se asocian con una reducción de mortalidad por cualquier causa, probablemente a través de la reducción en la cantidad de colesterol de lipoproteínas remanentes.

Summary

Background: Increased nonfasting plasma triglycerides marking increased amounts of cholesterol in remnant lipoproteins are important risk factors for cardiovascular disease, but whether lifelong reduced concentrations of triglycerides on a genetic basis ultimately lead to reduced all-cause mortal-

ity is unknown. We tested this hypothesis. Methods: Using individuals from the Copenhagen City Heart Study in a mendelian randomization design, we first tested whether low concentrations of nonfasting triglycerides were associated with reduced all-cause mortality in observational analyses ($n = 13\ 957$); second, whether genetic variants in the triglyceride-degrading enzyme lipoprotein lipase, resulting in reduced nonfasting triglycerides and remnant cholesterol, were associated with reduced all-cause mortality ($n = 10\ 208$). Results: During a median 24 and 17 years of 100% complete follow-up, 9991 and 4005 individuals died in observational and genetic analyses, respectively. In observational analyses compared to individuals with nonfasting plasma triglycerides of 266-442 mg/dL (3.00-4.99 mmol/L), multivariably adjusted hazard ratios for all-cause mortality were 0.89 (95% CI 0.78-1.02) for 177-265 mg/dL (2.00-2.99 mmol/L), 0.74 (0.65-0.84) for 89-176 mg/dL (1.00-1.99 mmol/L), and 0.59 (0.51-0.68) for individuals with nonfasting triglycerides <89 mg/dL (<1.00 mmol/L). The odds ratio for a genetically derived 89-mg/dL (1-mmol/L) lower concentration in nonfasting triglycerides was 0.50 (0.30-0.82), with a corresponding observational hazard ratio of 0.87 (0.85-0.89). Also, the odds ratio for a genetically derived 50% lower concentration in nonfasting triglycerides was 0.43 (0.23-0.80), with a corresponding observational hazard ratio of 0.73 (0.70-0.77). Conclusions: Genetically reduced concentrations of nonfasting plasma triglycerides are associated with reduced all-cause mortality, likely through reduced amounts of cholesterol in remnant lipoproteins.

Abreviaturas no comunes

GENES HUMANOS:

LPL: lipoproteína lipasa.

CRP: Proteína C-reactiva, relacionada con pentraxina.

TRIB1: Tribbles Pseudoquinasa 1.

GCKR: Regulador de glucoquinasa (hexoquinasa 4).

APOA5: Apolipoproteína A-V.

APOC3: Apolipoproteína C-III.

Introducción

El aumento de los triglicéridos determinados sin ayuno, como marcador de aumento de la cantidad de colesterol de lipoproteínas remanentes, es cada vez más reconocido como un importante factor de riesgo para enfermedad vascular isquémica (1-13). Sobre la base de estas evidencias es posible que, por tanto, pareciera evidente que bajos niveles de triglicéridos conducen a la reducción de mortalidad por cualquier causa, pero esto no ha sido documentado hasta el momento. Ni ensayos de intervención randomizados, así como tampoco estudios de randomización mendeliana han tratado previamente esta cuestión. Una respuesta a esta pregunta es no obstante importante, ya que es poco probable que los médicos generales y otros profesionales clínicos acentúen el enfoque terapéutico hacia los triglicéridos aumentados si no existe dicha evidencia.

Se planteó una situación similar a ésta respecto al tratamiento del colesterol elevado antes de la publicación del estudio 4S (*Scandinavian Simvastatin Survival Study*) (14), ya que antes de este estudio con estatinas otros estudios ya habían demostrado una reducción de enfermedad cardiovascular como consecuencia de la te-

rapia para reducir el colesterol, pero no reducción de mortalidad por cualquier causa. Con estos antecedentes científicos, cuando de repente el estudio 4S documentó la reducción de mortalidad por cualquier causa asociada a la disminución del colesterol-LDL, se modificó la práctica clínica en todo el mundo; es decir, que se aceptó la terapia de reducción del colesterol como un tratamiento clave para la prevención de la enfermedad cardiovascular.

Pusimos a prueba la hipótesis de que concentraciones de triglicéridos sin ayuno genéticamente bajas, como marcador de disminución de colesterol de lipoproteínas remanentes, se asocian con una reducción en la mortalidad por cualquier causa. Utilizando un diseño de randomización mendeliana evitando variables confundidoras (15) (16), primero probamos, en un análisis observacional, si las bajas concentraciones de triglicéridos sin ayuno se asocian con reducción de mortalidad por cualquier causa; y en segundo lugar, si las variantes de la enzima hidrolizante de triglicéridos lipoproteína lipasa, que provocan concentraciones reducidas de triglicéridos y de colesterol de remanentes, se asocian con una reducción de la mortalidad por cualquier causa en un análisis genético. Elegimos variantes bien conocidas del gen de la lipoproteína lipasa (*LPL*)⁵ (1-3), que es la enzima más importante en el metabolismo de los triglicéridos en el plasma (17) y por consiguiente, las variantes en este gen son probablemente los mejores instrumentos genéticos que reflejan concentraciones bajas de triglicéridos a lo largo de toda la vida. Es importante destacar que se están desarrollando estrategias para aumentar la actividad de la lipoproteína lipasa con el fin de reducir las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (18) (19), y estudios como el aquí descrito pueden ayudar a aclarar si probablemente estas estrategias tengan éxito.

Métodos

PARTICIPANTES

El *Copenhagen City Heart Study* es un estudio prospectivo de población general que fue iniciado en 1976-1978 con seguimientos en 1981-1983, 1991-1994, y 2001-2003 (4). Los participantes fueron seleccionados al azar sobre la base del Sistema de Registro Civil Nacional Danés para reflejar las edades de la población adulta danesa, 20-100 años. Los datos se obtuvieron a partir de un cuestionario, un examen físico, y las muestras de sangre en cada examen. El estudio fue aprobado por los comités de ética del Hospital Herlev, del Hospital Universitario de Copenhague y el comité de ética danés y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Se obtuvo consentimiento informado escrito de todos los participantes.

En el análisis observacional, para examinar la asociación entre las concentraciones plasmáticas bajas de triglicéridos sin ayuno y la mortalidad por cualquier causa, se incluyeron 13.957 individuos con examen clínico y mediciones disponibles de 1976 a 1978 (4). En los análisis genéticos, para analizar la asociación entre las variantes genéticas de *LPL*, triglicéridos plasmáticos sin ayuno, y mortalidad por cualquier causa, se incluyeron 10.208 individuos atendidos de 1991-1994 y 2001-2003 con genotipos correspondientes a las 4 variantes genéticas de *LPL*; 6.696 de estas personas también habían participado en el muestreo de 1976-1978 y, por tanto, también fueron incluidos en el análisis observacional.

ANÁLISIS GENÉTICO

Los individuos atendidos de 1991 a 1994 fueron genotipificados para S447X (rs328), D9N (rs1801177), N291S (rs268), y G188E (rs118204057) en *LPL*, como está descrito (1)(3)(20-21). Para los atendidos entre 2001 y 2003, se utilizó para la genotipificación ensayos basados en TaqMan (*Applied Biosystems*). En los ensayos TaqMan se incluyeron controles positivos que fueron genotipificados utilizando métodos originales. Los participantes también fueron genotipificados para 4 polimorfismos no codificantes de *PCR* (proteína C-reactiva, relacionada con pentraxina) (rs1205, rs3091244, rs1130864, y rs3093077) también con ensayos basados en TaqMan (22)(23). Estos polimorfismos afectan las concentraciones plasmáticas de proteína C-reactiva (PCR) y fueron incluidos en el análisis genético como control negativo sobre la mortalidad por cualquier causa (23). Por último, los participantes fueron genotipificados para 3 polimorfismos en *TRIB1* (*Tribbles Pseudoquinasa 1*) (rs2954029), *GCKR* [gen regulador de glucoquinasa (hexoquinasa 4)] (rs1260326), y *APOA5* (apolipoproteína AV) (rs651821) que también reducen los triglicéridos plasmáticos (13), estos genotipos fueron incluidos en los análisis de sensibilidad. Todas las distribuciones de los genotipos estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P \geq 0,3$).

TRIGLICÉRIDOS PLASMÁTICOS SIN AYUNO

Las concentraciones plasmáticas de triglicéridos se midieron en estado sin ayuno con métodos estándares de laboratorio. En el análisis observacional, las concentraciones de triglicéridos basales de los individuos ingresados entre 1976-1978 se agruparon en 5 categorías [<89 mg/dL ($<1,00$ mmol/L), 89-176 mg/dL (1,00-1,99 mmol/L), 177-265 mg/dL (2,00-2,99 mmol/L), 266-442 mg/dL (3,00-4,99 mmol/L), y ≥ 443 mg/dL ($\geq 5,00$ mmol/L)]. Se preestablecieron puntos de corte cada 89 mg/dL (1 mmol/L) de descenso como se hizo anteriormente (4); Sin embargo, para lograr un grupo de referencia lo suficientemente grande como para que las comparaciones sean estadísticamente significativas, se agruparon los individuos con concentraciones de triglicéridos moderadamente aumentadas, de 266 a 442 mg/dL (3,00-4,99 mmol/L), en un solo grupo que sirvió como grupo de referencia. Debido a que los individuos con triglicéridos severamente aumentados [≥ 443 mg/dL ($\geq 5,00$ mmol/L)] representan un fenotipo especial no fueron considerados como grupo de referencia. Para el análisis genético, se tuvieron en cuenta las concentraciones basales de triglicéridos de los individuos examinados entre 1991-1994 y entre 2001-2003 con el fin de determinar la asociación entre las variantes genéticas en *LPL* y los niveles de triglicéridos plasmáticos sin ayuno.

MORTALIDAD POR CUALQUIER CAUSA

La información sobre la mortalidad por cualquier causa fue obtenida del Sistema de Registro Civil Nacional Danés. La mortalidad por enfermedades cardiovasculares fue definida como muertes por cardiopatía isquémica (OMS, *Clasificación Internacional de Enfermedades*, revisión 8 y revisión 10: códigos 410-414 y I20-I25) y/o enfermedad cerebrovascular isquémica (códigos 431-438 y I60-I69, G45), datos obtenidos a partir del Registro Nacional de Causas de Muerte danés, o muerte dentro de los 28 días desde un ingreso en el hospital con los diagnósticos anteriormente mencionados obtenido del Registro Nacional de Pacientes danés. Los participantes fueron seguidos mediante el uso del número único del Centro de Registro de Personas desde la entrada en el estudio hasta el final del seguimiento en mayo de 2011. El seguimiento fue completado en un 100%; es decir, no hemos perdido el rastro ni siquiera de un solo individuo.

COVARIABLES

Se calculó el índice de masa corporal como el peso corporal (kilogramos) dividido por la altura medida (metros) al cuadrado. Se consideró hipertensión arterial al uso de medicación antihipertensiva, presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg y/o presión arterial diastólica ≥ 90 mmHg; diabetes por auto-reporte de la en-

fermedad, uso de insulina o hipoglucemiantes orales y/o concentraciones plasmáticas de glucosa sin ayuno ≥ 198 mg/dL (≥ 11 mmol/L). Los fumadores eran fumadores actuales. La inactividad física se definió como actividad de ocio < 4 h semanales y trabajo predominantemente sedentario. Se reportó el consumo de alcohol y se transformó en gramos de alcohol por día. Se midieron colesterol total en plasma, colesterol-HDL, y PCR mediante el uso de métodos estándar; en las muestras de los individuos examinados entre 1976 y 1978, sólo se midieron triglicéridos y colesterol total, es decir, no se midieron colesterol-HDL ni LDL. Para los individuos evaluados entre 1991-1994 y 2001-2003, se calculó colesterol-LDL mediante el uso de la ecuación de Friedewald cuando los triglicéridos en plasma eran < 155 mg/dL ($< 4,0$ mmol/L) y de lo contrario se midió mediante el uso de un ensayo estándar directo. Se reportó el tratamiento hipolipemiante y aunque no se especificó el tipo, la mayoría de las personas probablemente usaban estatinas, ya que es el tipo de terapia de reducción de lípidos más común utilizada en Dinamarca.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó STATA/SE 12.0. Se utilizaron modelos de ANOVA para la comparación de medias de variables continuas y *test* de Pearson χ^2 para la comparación de frecuencias de variables categóricas.

En los análisis observacionales, para examinar la asociación entre las concentraciones de triglicéridos sin ayuno y la mortalidad por cualquier causa, se utilizaron modelos de riesgo proporcional Cox con el fin de estimar los *hazard ratio* con un intervalo de confianza (IC) del 95%. La proporcionalidad de los riesgos en el tiempo fue evaluada mediante inspección visual de los gráficos logarítmicos del riesgo acumulado *versus* la edad; no se observaron violaciones. Los modelos se ajustaron por edad (como escala de tiempo) y sexo y multivariadamente por otros factores de riesgo cardiovascular como hipertensión, tabaquismo, consumo de alcohol, inactividad física, colesterol total y el uso de medicamentos hipolipemiantes; *a priori* las estimaciones de riesgo no ajustaron por índice de masa corporal y diabetes, ya que estas covariables pueden ser parte del cuadro biológico que vincula las bajas concentraciones de triglicéridos a la reducción de mortalidad por cualquier causa. Sin embargo, si se ajusta por estas covariables adicionales, los resultados son similares a los presentados. Se estimaron los *hazard ratios* de mortalidad por cualquier causa para una disminución de los triglicéridos de 89 mg/dL (1 mmol/L) mediante el análisis de los triglicéridos como una variable continua, y transformación \log_2 de triglicéridos para estimar el *hazard ratio* para una reducción del 50%. Los efectos combinados de errores de medición, fluctuaciones a largo plazo, y variaciones intraindividuales, también conocidos como dilución de regresión, llevan a una subestimación de la verdade-

ra asociación de un factor de riesgo con el *outcome* de la enfermedad. Para ajustar esto los *hazard ratios*, incluidos los IC, en el análisis observacional se corrigió por el sesgo de dilución de regresión mediante el uso de un método no paramétrico (24). Para esta corrección, se utilizó un subconjunto de individuos ($n=6.696$) con mediciones repetidas de triglicéridos sin ayuno del periodo 1976-1978, y de aproximadamente 15 años más tarde entre 1991-1994, para calcular la proporción de dilución de regresión para los triglicéridos que fue de 0,58. Esta corrección evita la subvaloración de las estimaciones de riesgo, pero no afecta a los niveles de significación estadística.

En los análisis genéticos, para examinar el efecto de los genotipos *LPL* sobre los triglicéridos plasmáticos medidos sin ayuno, los genotipos con concentraciones de triglicéridos más altas sirvieron como referencia. Con el fin de obtener el máximo poder estadístico para mortalidad por cualquier causa, en primer lugar analizamos todas las posibles combinaciones genotípicas y agrupamos a cada participante de acuerdo al número de alelos relacionados con el descenso de triglicéridos (G para S447X, G para D9N, A para N291S, y G para G188E). El grupo con el menor número de estos alelos y por lo tanto las concentraciones de triglicéridos más altas sirvió como grupo de referencia. Se realizó ANOVA entre grupos mediante el uso de métodos no paramétricos, debido a la distribución no normal de los triglicéridos. Para examinar la asociación entre los genotipos y mortalidad por cualquier causa, se utilizaron curvas de Kaplan-Meier y la prueba de tendencia de rango logarítmico para comparar las probabilidades de supervivencia en función de la edad. Para la prueba de tendencia, se codificaron a los grupos de acuerdo al número de alelos relacionados con el descenso de triglicéridos en 1, 2, 3, etc. Además, se utilizaron modelos de riesgo proporcional de Cox para estimar los *hazard ratio* para mortalidad por cualquier causa en función del número de alelos relacionados con el descenso de triglicéridos. Los modelos se ajustaron por edad (como escala de tiempo), sexo, hipertensión, tabaquismo, consumo de alcohol, actividad física, colesterol total y el uso de medicación hipolipemiante; en el análisis de sensibilidad, también se ajustó por la concentración de colesterol-HDL. Como se describe en Zacho *et al.* (22), se utilizó el *hazard ratio* observado para una reducción del 50% en los triglicéridos para predecir el riesgo teórico de muerte por cualquier causa asociada con los cambios en las concentraciones de triglicéridos sin ayunas causadas por el número de alelos reductores de triglicéridos. En los análisis en los que se incluyen los genotipos de *PCR*, *TRIB1*, *GCKR* y *APOA5*, la estrategia estadística utilizada fue similar.

Para estimar la asociación entre los triglicéridos genéticamente disminuidos y la reducción de mortalidad por cualquier causa, se aplicó la teoría general del análisis de la variable instrumental utilizando la "puntuación de alelo" generada no ponderada como marcador de

los triglicéridos plasmáticos sin ayuno (25). Realizamos regresión de mínimos cuadrados en 2 etapas con una regresión logística de la segunda etapa para estimar un *odds ratio* genético para un descenso de triglicéridos sin ayuno de 89 mg/dL (1 mmol/L) y una reducción del 50% en la concentración (25). Con una "puntuación de alelo" ponderada o el estimador multiplicativo del método generalizado de momentos, los resultados fueron similares a los presentados.

Resultados

Las características basales de los 13.957 individuos incluidos en el análisis observacional y los 10.208 individuos incluidos en el análisis genético se muestran en la Tabla Suplementaria 1, que acompaña a la versión *online* de este artículo en <http://www.clinchem.org/content/vol60/issue5>. En el análisis observacional, los participantes ingresaron en el estudio entre 1976-1978 (n=13.957), y a lo largo una mediana de 24 años de seguimiento 9.991 murieron. En el análisis genético, los participantes entraron en el estudio realizado en 1991-1994 (n=9.114) o en el período 2001-2003 (n=1.094), y durante una mediana de 17 años de seguimiento, 4.005 murieron.

MEDIDA DE TRIGLICÉRIDOS SIN AYUNO Y MORTALIDAD POR CUALQUIER CAUSA

Existió una reducción del riesgo por etapas de mortalidad por cualquier causa con la disminución de las concentraciones de triglicéridos plasmáticos sin ayuno

(Figura 1). En comparación con los individuos con concentraciones de triglicéridos sin ayuno de 266 a 442 mg/dL (3,00-4,99 mmol/L), los *hazard ratios* ajustados por edad y sexo fueron: 0,84 (IC del 95% 0,73-0,96) para 177-265 mg/dL (2,00-2,99 mmol/L), 0,67 (0,60 a 0,76) para 89 a 176 mg/dL (1,00-1,99 mmol/L), y 0,51 (0,44-0,58) para los individuos con triglicéridos sin ayuno < 89 mg/dL (< 1,00 mmol/L). Los *hazard ratios* correspondientes ajustados en el análisis multivariado fueron 0,89 (0,78-1,02), 0,74 (0,65-0,84) y 0,59 (0,51-0,68), respectivamente. Para las individuos con triglicéridos sin ayuno ≥ 443 mg/dL ($\geq 5,00$ mmol/L) *vs.* 266-442 mg/dL (3,00-4,99 mmol/L), el *hazard ratio* de mortalidad por cualquier causa fue de 1,28 (1,01 a 1,62) en el modelo ajustado por sexo y edad, y 1,26 (1,00-1,60) en el modelo de ajuste multivariado.

GENOTIPOS DE LPL Y TRIGLICÉRIDOS SIN AYUNO

Las frecuencias de los alelos de *LPL* minoritarios fueron 0,10 para S447X, 0,01 para D9N, 0,02 para N291S, y 0,0004 para G188E (correlaciones por pares, todas: $r^2 < 1\%$). Se observaron menores concentraciones de triglicéridos sin ayuno en el polimorfismo S447X (genotipos CG y GG *vs.* genotipo CC, 11% y 22% de disminución), el polimorfismo D9N (AA/AG *vs.* GG, 9% de disminución), el polimorfismo N291S (GG/GA *vs.* AA, 13% de disminución), y la mutación G188E (AG *vs.* GG, 26% de disminución) (Fig. 2). Cuando se combinaron los genotipos por número de alelos reductores de triglicéridos, un número creciente de alelos resultó en una disminución en los triglicéridos sin ayuno de hasta un 31%. Esto se correspondió con concentraciones de co-

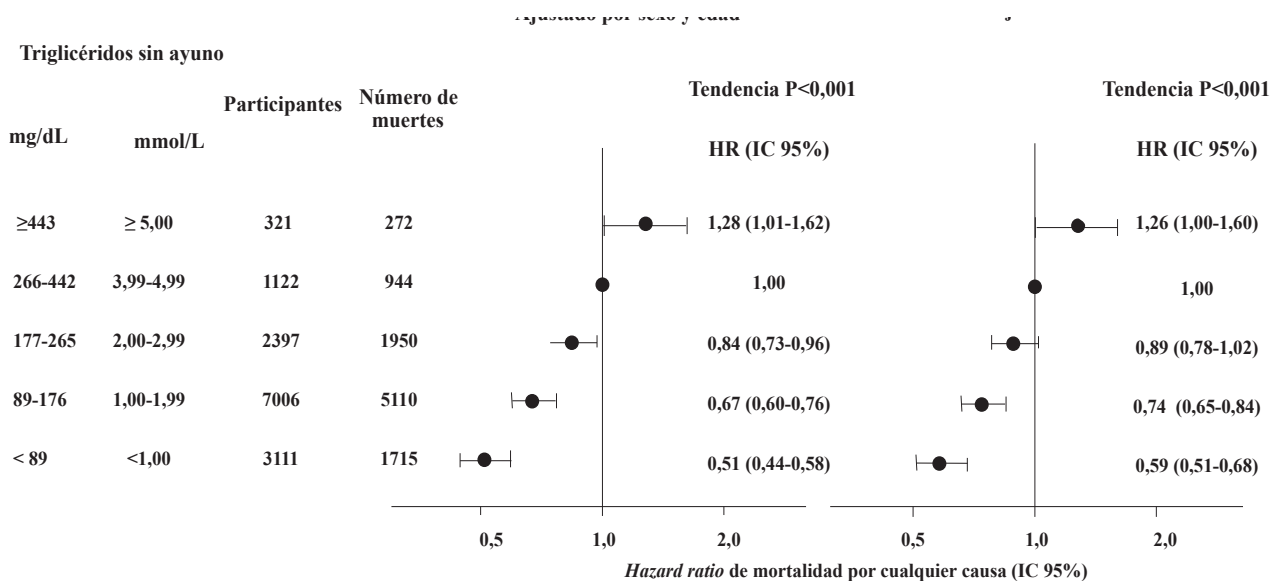


Figura 1. *Hazard ratio* para mortalidad por cualquier causa al descender las concentraciones plasmáticas de triglicéridos sin ayuno en 13.957 individuos del Copenhagen City Heart Study.

Los *hazard ratios* se ajustaron por edad (como escala de tiempo) y sexo; y en un modelo multivariado por edad (como escala de tiempo), sexo, hipertensión, tabaquismo, consumo de alcohol, y uso de medicamentos hipolipemiantes. HR, *hazard ratios*. Los valores de *P* son de la tendencia.

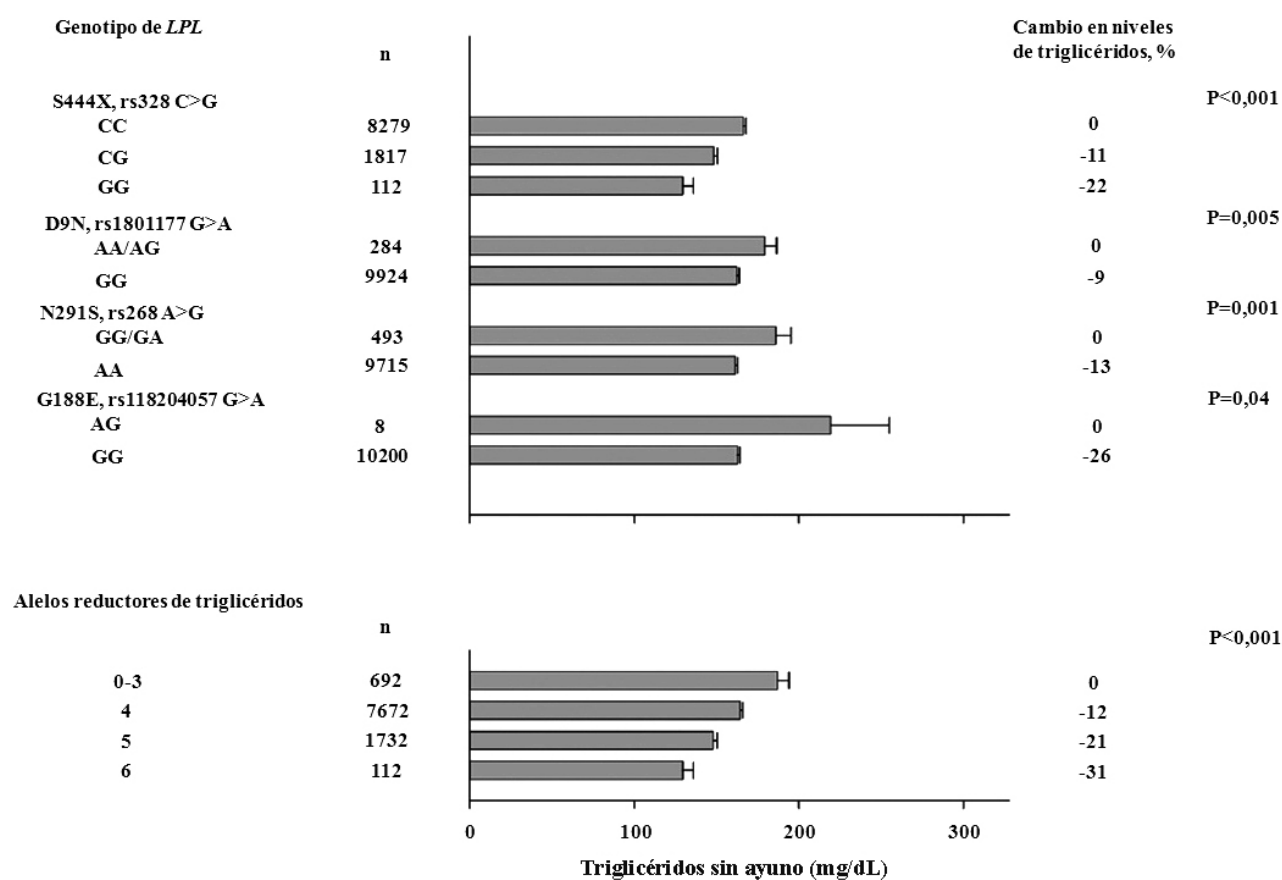


Figura 2. Triglicéridos sin ayuno en plasma en función del genotipo LPL y del número de alelos reductores de triglicéridos en 10.208 individuos del Copenhagen City Heart Study.

Los alelos reductores de triglicéridos fueron combinaciones de genotipos con efectos reductores de triglicéridos. Los valores se representan como media (DE). Los valores de P son para la tendencia o la comparación de 2 grupos.

lesterol de remanentes 23% más bajas y concentraciones de colesterol-HDL 15% más altas, mientras que las concentraciones de colesterol-LDL no se vieron afectadas (véase la figura Suplementario en línea 1).

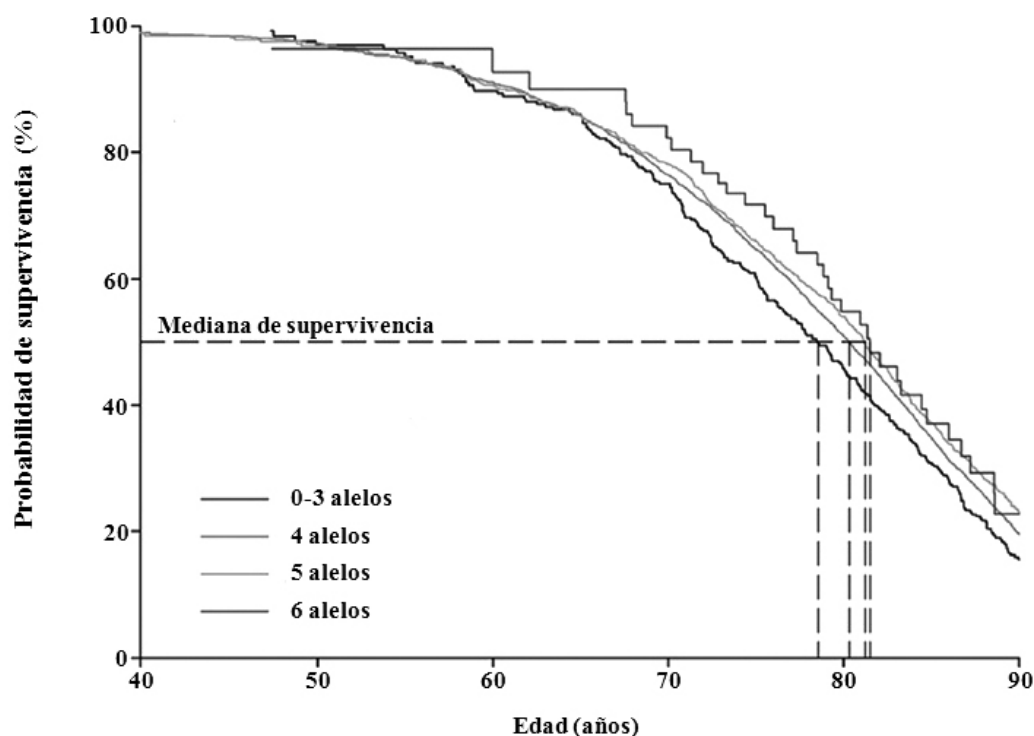
Entre todos los participantes, 3.031 personas tenían 3 mediciones separadas de triglicéridos plasmáticos sin ayuno, es decir, de las determinaciones de 1976-1978, 1991-1994, y 2001-2003. En las 3 determinaciones, que abarcan 25 años, las concentraciones de triglicéridos sin ayuno fueron más bajas en aquellos sujetos que tenían el mayor número de alelos reductores de triglicéridos (véase la figura Suplementario en línea 2). Esto demuestra que la disminución en las concentraciones de triglicéridos plasmáticos sin ayuno debido a variantes genéticas en LPL es constante a lo largo de toda la vida.

GENOTIPOS DE LPL Y MORTALIDAD POR CUALQUIER CAUSA

La probabilidad de supervivencia aumenta con el número de alelos reductores de triglicéridos (tendencia de rango logarítmico: $P=0,004$) (Fig. 3.). La edad mediana de supervivencia fue de 78 años en los indivi-

duos con 0-3 alelos reductores de triglicéridos, 80 años en personas con 4 alelos, y 81 años en personas con 5 ó 6 alelos.

Asumiendo que una reducción en los triglicéridos sin ayuno, a través del descenso del colesterol de remanentes, está causalmente asociada con una disminución de mortalidad por cualquier causa, disminuciones en las concentraciones de triglicéridos de por vida debido a variantes genéticas, deberían conferir un menor riesgo de muerte similar al de las estimaciones observacionales. Sobre la base de este supuesto y como se realizó anteriormente (22), se estima que la disminución en los triglicéridos sin ayuno debido al número de alelos reductores de triglicéridos predecirían un *hazard ratio* de mortalidad por cualquier causas teórica de 0,94 (0,93-0,95) para 4 alelos, 0,90 (0,88-0,92) para 5 alelos, y 0,86 (0,83-0,88) para 6 alelos, respectivamente, vs. 0-3 alelos (Fig. 4, panel superior). Es importante destacar que los *hazard ratios* observados correspondientes fueron 0,86 (0,76-0,97), 0,81 (0,71-0,93) y 0,77 (0,55 a 1,08) al aumentar el número de alelos reductores de triglicéridos; es decir, la reducción del riesgo de mortalidad por



Número de alelos reductores de triglicéridos	Número de sujetos en riesgo según edad					
	Edad	50 años	60 años	70 años	80 años	90 años
0-3		138	203	234	169	41
4		1.562	2.100	2.727	2.052	542
5		350	507	620	487	122
6		27	26	44	31	6

Figura 3. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia (%) por número de alelos reductores de triglicéridos y edad en 10.208 individuos del Copenhagen City Heart Study. Las líneas discontinuas indican la edad mediana de la supervivencia.

cualquier causa observado fue mayor que la predicha teóricamente. Para probar nuestro método, se examinó la asociación entre los genotipos de *PCR* y el riesgo de mortalidad por cualquier causa, como control negativo (23). El número de alelos reductores de *PCR* se asoció con una disminución en las concentraciones de *PCR* plasmática de hasta un 28%, resultando en un *hazard ratio* de mortalidad por cualquier causa previsto teóricamente de 0,89 (0,87-0,90) (Fig. 4, panel inferior). Sin embargo, los *hazard ratios* de mortalidad por cualquier causa observada para los alelos reductores de *PCR* no difieren de 1.0.

Entre los participantes, agrupados según el número de alelos reductores de triglicéridos, se distribuyen por igual varios factores de riesgo cardiovascular (véase la Tabla Suplementaria línea 2). Esto indica que la variable genotipo no está afectada por factores de riesgo cardiovascular convencionales.

ASOCIACIONES GENÉTICAS VS. OBSERVACIONALES

En los análisis de variable instrumental, el *odds ratio* para una disminución en la concentración de triglicéridos plasmáticos sin ayunas de 89 mg/dL (1 mmol/L) derivado genéticamente fue de 0,50 (0,30-0,82) ($f = 15$, $r^2 = 0,7\%$) (Fig. 5); el *hazard ratio* del análisis observacional correspondiente fue 0,87 (0,85-0,89). Además, el *odds ratio* correspondiente a una concentración de triglicéridos plasmáticos sin ayuno 50% menor derivada genéticamente fue de 0,43 (0,23-0,80), mientras que el *hazard ratio* observacional fue de 0,73 (0,70-0,77).

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

Cuando se estratificó la mortalidad por cualquier causa en la mortalidad por enfermedad cardiovascular y mortalidad por otras causas, los resultados de los análisis observacional y genético fueron muy similares a los

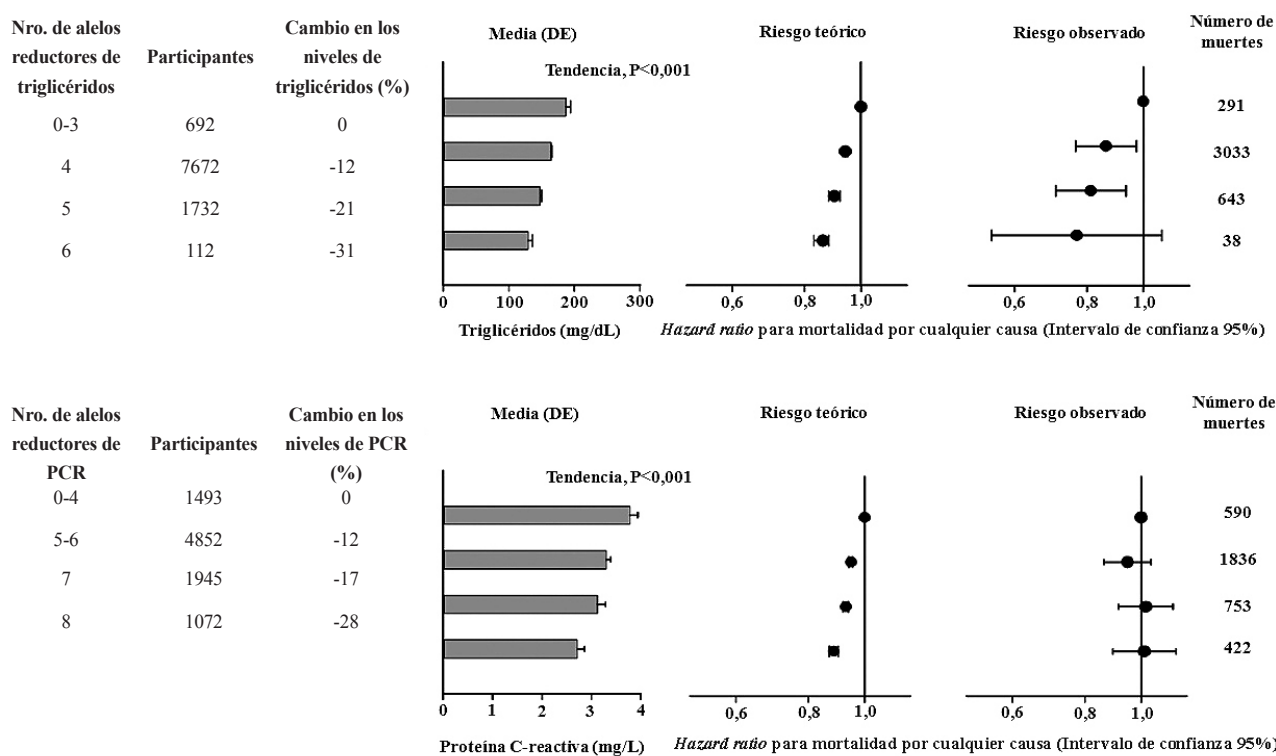


Figura 4. Mortalidad por cualquier causa teóricamente predicha y observado por número de alelos reductores de triglicéridos y alelos reductores de PCR.

Los hazard ratios se ajustaron por edad (como escala de tiempo), sexo, hipertensión, tabaquismo, consumo de alcohol, y el uso de medicamentos hipolipemiantes.

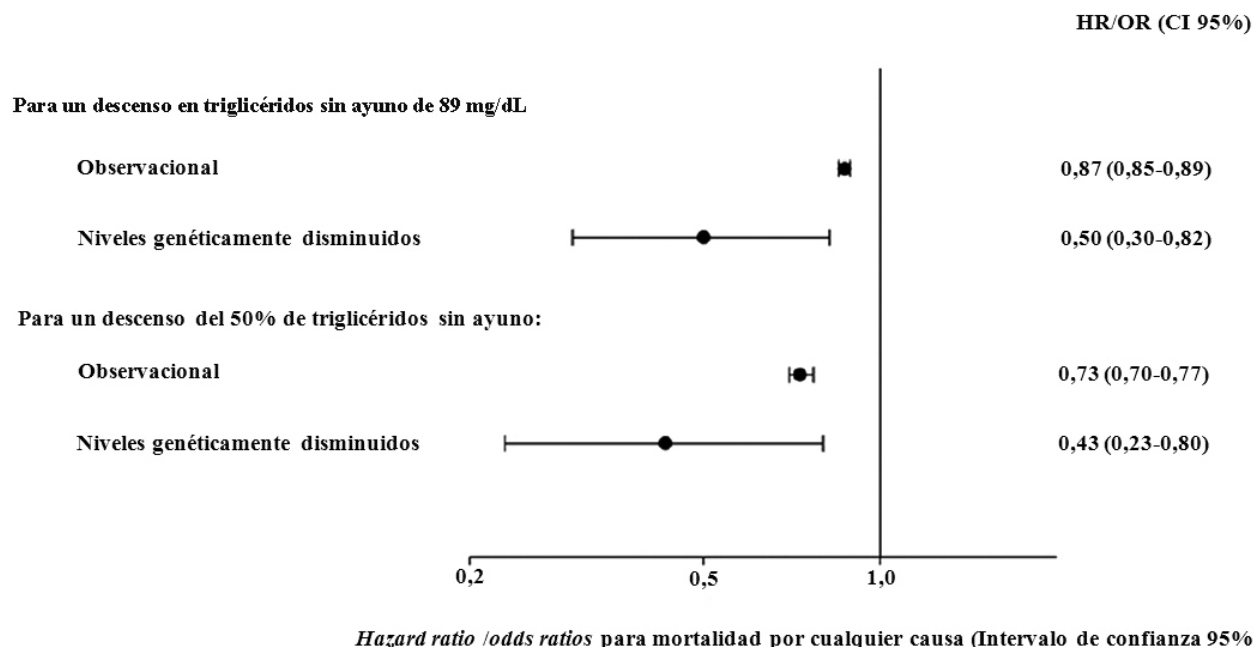


Figura 5. Estimaciones genéticas y observacionales de riesgo de mortalidad por cualquier causa para una reducción de 89-mg/dL (1 mmol/L) y una disminución del 50% de los triglicéridos sin ayuno plasmáticos.

Se utilizó análisis de variables instrumentales para estimar los odds ratios derivados genéticamente. Los hazard ratios se ajustaron por edad (como escala de tiempo), sexo, hipertensión, tabaquismo, consumo de alcohol, y uso de medicamentos hipolipemiantes. HR, hazard ratios; OR, odds ratio.

presentados para mortalidad por cualquier causa (véase Figs. 3 y 4 del Suplemento *online*). También, incluyendo en los análisis genéticos el ajuste por colesterol-HDL, los resultados obtenidos fueron similares (véase Fig. 5 del Suplemento *online*). Por último, examinamos otras 3 variantes genéticas en *TRIB1*, *GCKR* y *APOA5* que también afectan las concentraciones de triglicéridos postprandiales (véase Fig. 6 Suplemento *online*). Los *hazard ratio* de mortalidad por cualquier causa de estas 3 variantes solas y en combinación con los 4 genotipos de *LPL* se muestran en la Figura 7 del Suplemento *online*. Los *hazard ratios* de mortalidad por cualquier causa se redujeron de manera similar en todas las combinaciones de genotipos; sin embargo, los IC fueron más amplios en los análisis que incluyeron sólo los genotipos *TRIB1*, *GCKR* y *APOA5*, explicado por el bajo poder estadístico debido al número relativamente pequeño de individuos en el grupo de referencia. La Figura 7 del Suplemento *online* ilustra también que las variantes genéticas de *LPL* elegidas son instrumentos genéticos óptimos para examinar el efecto de las bajas concentraciones de triglicéridos, debido a la inclusión de la variante común S447X, de ganancia de función, que resulta en un grupo de referencia lo suficientemente grande para una comparación estadísticamente significativa.

Discusión

El principal hallazgo novedoso de este estudio es que las bajas concentraciones de triglicéridos plasmáticos sin ayuno, resultado de variaciones genéticas en la enzima hidrolizante de triglicéridos lipoproteína lipasa están asociadas con reducción de la mortalidad por cualquier causa, probablemente a través de la disminución en la cantidad de colesterol de lipoproteínas remanentes. Esta es una observación valiosa para el diseño de futuros ensayos de intervención aleatorizados dirigidos a reducir los niveles de triglicéridos en personas con concentraciones elevadas. Mecánicamente, estos hallazgos son fáciles de entender, dado que la lipoproteína lipasa hidroliza los triglicéridos contenidos en quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (17). Así, la homocigosidad para mutaciones deletéreas raras en *LPL* conduce al síndrome de hiperquilomicronemia caracterizado por triglicéridos severamente aumentados con acumulación excesiva de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad de gran tamaño en el plasma. Este síndrome rara vez conduce a enfermedad cardiovascular, lo que probablemente es debido a que estas partículas de lipoproteínas plasmáticas son demasiado grandes como para entrar en la íntima arterial (26) (27). Sin embargo, las variantes más comunes en *LPL*, como las examinadas en este estudio, llevar a triglicéridos moderadamente aumentados o disminuidos con presencia de remanentes de quilomicrones y

de lipoproteínas de muy baja densidad en el plasma. Estas lipoproteínas remanentes con colesterol más pequeñas son capaces de penetrar en la íntima (28) y parecen ser preferentemente retenidas dentro de la pared arterial (29), promoviendo la aterosclerosis. Por lo tanto, concentraciones disminuidas de triglicéridos que reflejan bajas cantidades de colesterol en lipoproteínas remanentes podrían prevenir el desarrollo de la aterosclerosis y en última instancia reducir mortalidad por cualquier causa, como se ha visto en nuestro estudio. En la misma línea, un estudio de todo el genoma en la *Antigua Orden Amish* endogámica identificó la heterocigosidad para una mutación nula (R19X) en *APOC3* (apolipoproteína C-III) que resulta en niveles bajos de triglicéridos y una disminución de la calcificación de la arteria coronaria como marcador de aterosclerosis subclínica (8), lo que sugiere que la deficiencia de por vida de apolipoproteína C-III promoviendo la hidrólisis de los triglicéridos puede tener un efecto cardioprotector. Nuestro estudio sugiere que este aparente efecto cardioprotector de los triglicéridos permanentemente reducidos se traduce en una reducción de mortalidad por cualquier causa.

La reducción similar de la mortalidad por enfermedad cardiovascular y la mortalidad por otras causas podría ser el resultado de las muertes cardiovasculares que no han sido registradas correctamente en los registros daneses. Desde 1990, las autopsias en Dinamarca se han vuelto raras, y por lo tanto la causa de muerte en la mayoría de los casos se basa en la mejor estimación post-mortem los médicos tratantes, lo que naturalmente lleva a un cierto grado de clasificación errónea. Por lo tanto, en los análisis primarios, se utilizaron todas las causas de mortalidad con el mayor poder estadístico, sin errores de clasificación, y con el 100% averiguación en Dinamarca debido a que cada persona tiene un número en el Centro de Registro de las Personas. Sin embargo, es tranquilizador que bajas concentraciones de triglicéridos plasmáticos medidos sin ayuno estén asociadas con una reducción de mortalidad por cualquier causa y cardiovascular por igual.

Algunas limitaciones de nuestro estudio deben ser consideradas en la evaluación de los resultados. La asociación inversa entre los triglicéridos y las concentraciones de colesterol-HDL en el plasma representa probablemente los efectos pleiotrópicos más importantes de las variantes genéticas en *LPL* (3); sin embargo, aunque los estudios observacionales han encontrado una asociación entre concentraciones altas de colesterol-HDL y reducción del riesgo de cardiopatía isquémica (9), esta asociación no se ha confirmado en estudios genéticos (30-32), lo que indica que esta relación no sea causal. Además, el aumento del colesterol en las lipoproteínas ricas en triglicéridos o remanente tiene una relación causal con el aumento del riesgo de enfermedad cardíaca isquémica, así como con la inflamación de bajo gra-

do (12) (13) (33) independiente de las concentraciones de la reducción de colesterol-HDL (13). Además, en el presente análisis genético el ajuste por las concentraciones de HDL arrojó resultados similares a los presentados sin ajuste. Por tanto, es más probable que nuestros resultados sean explicados por el efecto de reductor de triglicéridos y colesterol de remanentes por parte de los genotipos *LPL* que por el aumento paralelo en el colesterol-HDL. Una comprensión más acabada de la variabilidad en los efectos genéticos sobre diferentes sub-fracciones lipídicas y metabolitos podría ser útil en el diseño de estudios futuros de randomización mendeliana para entender completamente los procesos biológicos que conducen a la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular. Además, los participantes prescritos con medicamentos hipolipemiantes tardíamente en el seguimiento pueden haber confundido los resultados.

La intervención en el estilo de vida y el mejor tratamiento vigente están dirigidos a reducir el colesterol-LDL, reducir la presión arterial y la prevención de eventos trombóticos, lo que reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular en los pacientes. Sin embargo, el riesgo residual persistente incluso entre individuos con el tratamiento óptimo e hipertrigliceridemia parece estar implicado en este riesgo excedente (34). De hecho, los análisis de subgrupos en los estudios aleatorios muestran que entre los sujetos que tienen aumento de los triglicéridos, la disminución de triglicéridos lleva a la reducción de la enfermedad cardiovascular (34-36). Los estudios genéticos son generalmente libres de confundidores y causalidad inversa y pueden proporcionar información en los efectos beneficiosos de los triglicéridos bajos permanentes. De hecho, los triglicéridos bajos, a lo largo de toda la vida, resultantes de polimorfismos genéticos están asociados con una disminución en la calcificación de las arterias coronarias como un marcador de aterosclerosis subclínica (8) y en última instancia también parecen reducir la mortalidad por cualquier causa, como se ve en el presente estudio. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de ensayos clínicos de nuevos fármacos dirigidos a reducir el colesterol de lipoproteínas remanentes, quizás a través de la modulación de la actividad de la lipoproteína lipasa, para reducir el riesgo cardiovascular residual.

Referencias bibliográficas

1. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Abildgaard S, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common substitution (Asn291Ser) in lipoprotein lipase is associated with increased risk of ischemic heart disease. *J Clin Invest* 1997; 99: 1606-13.
2. Nordestgaard BG, Abildgaard S, Wittrup HH, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Heterozygous lipoprotein lipase deficiency: frequency in the general population, effect on plasma lipid levels, and risk of ischemic heart disease. *Circulation* 1997; 96: 1737-44.
3. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation* 1999; 99: 2901-7.
4. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007; 298: 299-308.
5. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 2007; 298: 309-16.
6. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S *et al.* Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007; 115: 450-8.
7. Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting lipids and apolipoproteins for predicting incident cardiovascular events. *Circulation* 2008; 118: 993-1001.
8. Pollin TI, Damcott CM, Shen H, Ott SH, Shelton J, Horenstein RB *et al.* A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science* 2008; 322: 1702-5.
9. Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A *et al.* Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 2009; 302: 1993-2000.
10. De CR, Talmud PJ, Merlini PA, Foco L, Pastorino R, Altshuler D *et al.* Strong association of the APOA5-1131T_C gene variant and early-onset acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2011; 214: 397-403.
11. Varbo A, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Jensen GB, Benn M. Nonfasting triglycerides, cholesterol, and ischemic stroke in the general population. *Ann Neurol* 2011; 69: 628-34.
12. Jorgensen AB, Frikke-Schmidt R, West AS, Grande P, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction. *Eur Heart J* 2013; 34: 1826-33.
13. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jorgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2013; 61: 427-36.
14. Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Faergeman G *et al.* Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). 1994. *Atheroscler Suppl* 2004; 5: 81-7.
15. Smith GD, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? *Int J Epidemiol* 2003; 32: 1-22.
16. Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JA, Timpson N, Davey SG. Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in epidemiology. *Stat Med* 2008; 27: 1133-63.

17. Brunzell JD, Deeb SS. Familial lipoprotein lipase deficiency, Apo C-II deficiency, and hepatic lipase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet *al*, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York: McGraw-Hill; 2001; 2789-816.
18. Gaudet D, Methot J, Kastelein J. Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Lipidol* 2012; 23: 310-20.
19. Eriksson M, Larsson M, Caraballo R, Enquist PA, Elofsson M, Olivecrona G, Nilsson SK. Novel small molecule lipoprotein lipase activator LP071 improves plasma lipid parameters in vivo [Abstract]. Oral session presented at: 81st Congress of the European Atherosclerosis Society; 2013 Jun 2-5; Lyon. http://www.eas-society.org/fileArchive/Press%20release_LP071_lipoprotein%20lipase%20activator-June%202013_2013.pdf (Accessed January 2014).
20. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Deeb SS, Brunzell JD, Jensen G, Nordestgaard BG. Mutations in the lipoprotein lipase gene associated with ischemic heart disease in men. The Copenhagen City Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1535-40.
21. Wittrup HH, Nordestgaard BG, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Effect of gender on phenotypic expression of the S447X mutation in LPL: the Copenhagen City Heart Study. *Atherosclerosis* 2002; 165: 119-26.
22. Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, Grande P, Sillesen H, Nordestgaard BG. Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease. *N Engl J Med* 2008; 359: 1897-908.
23. Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein and all-cause mortality: the Copenhagen City Heart Study. *Eur Heart J* 2010; 31: 1624-32.
24. Clarke R, Shipley M, Lewington S, Youngman L, Collins R, Marmot M, Peto R. Underestimation of risk associations due to regression dilution in long-term follow-up of prospective studies. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 341-53.
25. Palmer TM, Sterne JA, Harbord RM, Lawlor DA, Sheehan NA, Meng S *et al*. Instrumental variable estimation of causal risk ratios and causal odds ratios in Mendelian randomization analyses. *Am J Epidemiol* 2011; 173: 1392-403.
26. Nordestgaard BG, Stender S, Kjeldsen K. Reduced atherogenesis in cholesterol-fed diabetic rabbits. Giant lipoproteins do not enter the arterial wall. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 421-8.
27. Nordestgaard BG, Zilversmit DB. Large lipoproteins are excluded from the arterial wall in diabetic cholesterol-fed rabbits. *J Lipid Res* 1988; 29: 1491-500.
28. Shaikh M, Wootton R, Nordestgaard BG, Baskerville P, Lumley JS, La Ville AE *et al*. Quantitative studies of transfer in vivo of low density, Sf 12-60, and Sf 60-400 lipoproteins between plasma and arterial intima in humans. *Arterio scler Thromb* 1991; 11: 569-77.
29. Nordestgaard BG, Wootton R, Lewis B. Selective retention of VLDL, IDL, and LDL in the arterial intima of genetically hyperlipidemic rabbits in vivo. Molecular size as a determinant of fractional loss from the intima-inner media. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 534-42.
30. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Stene MC, Sethi AA, Remaley AT, Schnohr P *et al*. Association of loss-of-function mutations in the ABCA1 gene with high-density lipoprotein cholesterol levels and risk of ischemic heart disease. *JAMA* 2008; 299: 2524-32.
31. Johannsen TH, Kamstrup PR, Andersen RV, Jensen GB, Sillesen H, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Hepatic lipase, genetically elevated high-density lipoprotein, and risk of ischemic cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 1264-73.
32. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK *et al*. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* 2012; 380: 572-80.
33. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated remnant cholesterol causes both low-grade inflammation and ischemic heart disease, while elevated low-density lipoprotein cholesterol causes ischemic heart disease without inflammation. *Circulation* 2013; 128: 1298-309.
34. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Boren J, Catapano AL *et al*. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J* 2011; 32: 1345-61.
35. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P *et al*. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987; 317: 1237-45.
36. Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, Crouse JR, III, Leiter LA, Linz P *et al*. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2010; 362: 1563-74.