

# Descripción de la deficiencia de la proteína relacionada al receptor LDL tipo 6 (LRP6): implicaciones en la fisiopatología de la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial y la aterosclerosis

El estudio de enfermos con presentaciones clínicas atípicas ha sido el paso inicial para la identificación de un alto porcentaje de las enfermedades monogénicas, incluyendo las pocas etiologías primarias conocidas de la aterosclerosis. El éxito resulta de la interacción de un investigador clínico capaz de distinguir las características especiales del caso con un investigador básico que tenga los recursos suficientes para identificar el defecto causal. Así fue como se identificó la hipercolesterolemia familiar y la Enfermedad de Tangier. A esta lista se unen los defectos de la proteína relacionada con el receptor LDL tipo 6 (LRP6) como una causa potencial de aterosclerosis,<sup>1</sup> informada en marzo del 2007 en *Science*. La identificación del caso fue realizada en Teherán y los estudios moleculares fueron resultado de la colaboración de la Universidad de Teherán con la Universidad de Yale. El hallazgo abre nuevas líneas de investigación para conocer la función de LRP6. Es una prueba más de la conveniencia de la colaboración entre investigadores clínicos y básicos.

Los investigadores iraníes identificaron el caso entre un gru-

po de familias con cardiopatía isquémica. El alto porcentaje de casos afectados y la presentación prematura de los síntomas (antes de los 50 años) fueron las características que motivaron el estudio. El caso índice tuvo un infarto del miocardio a los 48 años; tenía hipertensión arterial, diabetes tipo 2, hiperlipidemia mixta y su índice de masa corporal era 24 kg/m.<sup>2</sup> Tuvo aterosclerosis de los injertos coronarios y oclusión de las arterias carotídeas. Falleció debido a un infarto cerebral a los 72 años. Tuvo osteoporosis severa y una fractura de cadera por un traumatismo menor a los 62 años. Los autores estudiaron a 58 familiares. La cardiopatía isquémica prematura ocurrió en 28 casos; 23 de ellos fallecieron por causas cardiovasculares, en promedio, a los 52 años. El patrón de herencia fue autosómico dominante. Los casos afectados compartían características clínicas con el caso índice. La mayoría tenía concentraciones altas de colesterol LDL (promedio 176.4 mg/dL) y triglicéridos (promedio 240 mg/dL). Pese a la presencia de hipertrigliceridemia, los casos tenían niveles normales de colesterol-HDL. Además tenían

hipertensión arterial severa (175/103 mm Hg) de aparición prematura y diabetes tipo 2, pese a que todos los casos tenían un índice de masa corporal normal.

El estudio genético fue realizado en 19 familiares: siete casos afectados, cinco sanos y siete considerados como no clasificables por su edad. Se realizó un escrutinio del genoma empleando múltiples marcadores (usando Affymetrix 10K Gene Chip). Se utilizaron diversos modelos para el análisis de los datos. Se encontró ligamiento con un segmento del brazo corto del cromosoma 12, independientemente del modelo usado. El intervalo tiene una longitud de 750,000 pares de bases y contiene sólo 6 genes (*ETV6*, *BCL2L14*, *LRP6*, *MANSC1*, *LOH12CR1* y *DUSP16*). El gen *LRP6* era el único candidato debido a sus funciones conocidas. Se secuenció el gen en la muestra del caso índice encontrándose una mutación homocigota (R611C) que afecta la región similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés). El defecto tuvo co-segregación en el resto de los casos afectados y no se encontró en 400 iraníes y 3,600 caucásicos. La mutación tuvo un

ligamiento significativo con las concentraciones altas de colesterol-LDL (LOD score 5.5). Todos los casos con la mutación tenían colesterol LDL alto ( $170 \pm 12$  mg/dL vs.  $98 \pm 5$  mg/dL en las personas sin la mutación), por lo cual los autores lo proponen como un dato que puede ser útil para la identificación de otros casos con el mismo defecto. También se encontraron diferencias en la concentración de triglicéridos ( $209 \pm 71$  mg/dL) y en los valores de presión sistólica ( $168 \pm 21$  mm Hg) y diastólica ( $100 \pm 14$  mm Hg). Todos los casos afectados tuvieron una densidad ósea baja y 4 de 11 tenían diabetes. Finalmente los autores demostraron que la capacidad para activar las vías postreceptor de la variante R611C es 50% menor a la normal al transfectarla en células NIH3T3, lo que confirma que la mutación altera la función de LRP6.

La LRP6 es una proteína perteneciente a la familia del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés), junto con LRP1,-2,-4,-5 y -9, el receptor de apoE y el receptor VLDL. Fue descrito en 1998.<sup>2</sup> Tiene una homología alta con LRP-5 (73% en su porción extracelular y 64% en la región intracelular). Ambos receptores tienen una estructura distinta a la de los otros miembros de la familia: poseen 4 regiones similares al EGF, 3 repeticiones similares a las del receptor LDL y su porción intracelular contiene cinco copias de la secuencia PPP(S/T)P (P = prolina, S/T = serina o treonina). El estudio de las acciones de LRP6 tuvo un giro inesperado dos años después de su descripción.<sup>3</sup> La eliminación de su expresión en modelos animales resulta en un fenotipo similar al de las mutaciones en las proteínas Wnt (familia compuesta por 19 proteínas que regulan el crecimiento

celular, participan en la generación de diversas neoplasias y son fundamentales para el desarrollo embrionario). La eliminación completa de la expresión de LRP6 es letal en la vida embrionaria y resulta en defectos en el desarrollo del sistema nervioso central, falta de desarrollo del segmento posterior y de las extremidades. Las mismas anomalías ocurren con la eliminación de la expresión de las proteínas Wnt1, -3a y 7a; sin embargo, la severidad de los defectos es menor en la deficiencia de LRP6. La severidad de las anomalías es mayor al eliminar simultáneamente la expresión de LRP5 y LRP6; el fenotipo es similar al de la deficiencia de Wnt3. Estos datos sugieren que las proteínas Wnt requieren la presencia de LRP6 y/o LRP5, probablemente funcionando como su receptor. Estudios *in vitro* confirmaron que ambos receptores son ligandos de Wnt. Las Wnt3 y -1 se unen con afinidad similar a los dos receptores; en contraste, Wnt1, -3a y -7a tienen mayor afinidad por LRP6. La unión de ligandos distintos a las lipoproteínas de los receptores LRP ha sido descrita para los otros miembros de este grupo de receptores.

La unión de LRP6 a Wnt hace posible que LRP6 participe en una gran variedad de fenómenos biológicos. Las acciones relacionadas con las proteínas Wnt son múltiples,<sup>4</sup> entre ellas regular el crecimiento celular. Defectos en varias Wnt han sido implicados en la génesis de diversas neoplasias. Además, regulan la respuesta a diversas infecciones. La cascada de señalización de las Wnt depende del aumento de concentración de la β-catenina, la cual se activa o reprime la expresión de múltiples genes al unirse con otros cofactores (Figura 1). En ausencia de la estimulación

Wnt, la concentración de la β-catenina se mantiene baja debido a que forma un complejo con otras proteínas como la Axina, la APC (*adenomatous polyposis coli*) y la cinasa 3 β de la glucógeno sintetasa (GSK-3). La β-catenina es fosforilada por la GSK-3, lo que permite que se une a radicales ubiquitina y sea degradada en el proteosoma. La unión de Wnt a sus receptores (incluyendo el receptor Frizzled (receptor FZ), LRP5 y LRP6) impide la interacción de la β-catenina con las proteínas que determinan su fosforilación. Como resultado, aumenta su concentración intracelular y su transferencia al núcleo donde interactúa con diversos factores de transcripción de la familia TCF/LEF (factor de transcripción específico de las células T/ factor 1 de unión-incremto linfoide) para activar o reprimir un gran número de genes.

Los mecanismos por los que LRP6 activa la vía de señalización Wnt son parcialmente conocidos. La activación del receptor resulta en su unión con la Axina, lo que impide que esta última interactúe con la β-catenina y determine su destrucción por el proteosoma. La región de LRP6 que se une a la axina es las repeticiones PPP(S/T)P, las cuales deben estar fosforiladas; este proceso ocurre por la acción de las cinasas CK1 y GSK3.<sup>5</sup> La ausencia de dichas cinasas disminuye la capacidad de LRP6 para activar las acciones inducidas por Wnt. Otras proteínas (como la proteína Dishevelled) participan en el proceso, sin embargo su papel no se conoce con certeza.

La transferencia de la β-catenina inicia o reprime la expresión de múltiples genes. Para ello, requiere unirse a los factores de transcripción TCF/LEF, los cuales en condiciones basales se en-

cuentran formando un complejo (con el factor Groucho y la desacetilasa de histonas) que tiene funciones como co-represor. La  $\beta$ -catenina desplaza al factor Groucho lo que le permite unirse a otros co-activadores (acetilasa de histonas CBP/p300, el miembro Brøg-1 del complejo SWI/SNF), los cuales hacen posible la remodelación de la cromatina que rodea los sitios que reconocen a los factores TCF/LEF. El complejo  $\beta$ -catenina/TCF se une a otros factores (como los Legless, Pygopus y el hyrax/parafibromina); su unión aumenta la interacción del complejo con las regiones cromosómicas a las que se unen. Los genes blanco son múltiples; frecuentemente sus acciones son redundantes u opuestas. Entre ellos se encuentran factores transcripcionales que regulan la secreción de insulina (como HNF-4 alfa, Tcf1, Tcf2), la glucocinasa, el receptor IGF-1 e IRS2 (uno de los mediadores intracelulares de la acción de la insulina). Sin embargo, se desconocen los determinantes finales de la respuesta biológica a la activación de LRP6, la cual parece ser órgano-específica y modulada por múltiples factores.

LRP6 se une a otros ligandos distintos de las Wnt, lo que aumenta la complejidad para entender las funciones biológicas del receptor. Es un ligando del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF). Además, se une a diversas proteínas de la familia Dickkopf (DKK 1 a 4), las cuales contrarrestan la actividad de LRP6 como mediador de las acciones inducidas por Wnt. Se desconoce si LRP6 es un ligando de la apolipoproteína E. La actividad del receptor es modulada por su interacción con otros receptores. LRP6 forma complejos con LRP5 y el receptor Fz para inducir las acciones mediadas por Wnt. En

contraste, su interacción con los receptores Kremen disminuye su capacidad para mediar las acciones de Wnt.

La descripción del fenotipo resultante de la eliminación de LRP5 aumentó el interés por el estudio de esta familia de receptores y aporta información útil para entender las características clínicas observadas en el paciente con deficiencia de LRP6 (ya que ambos receptores comparten funciones y vías postreceptor). La ausencia homocigota de LRP5 es causa del síndrome osteoporosis-pseudoglioma, descrito en niños. La mayoría de los casos se debe a mutaciones sin sentido o que cambian la secuencia del dominio extracelular del receptor. La asociación con la osteoporosis se explica porque LRP5 se expresa en los osteoblastos y traduce la señal Wnt, la cual induce el crecimiento del hueso acral. La relevancia de LRP5 en el metabolismo óseo se confirmó con la descripción de mutaciones activantes de LRP5, las cuales son causa de aumento de la densidad ósea que se transmite en forma autosómica dominante. La asociación entre LRP5 y osteoporosis se confirmó en ratones, donde se elimina la expresión del gen.<sup>6,7</sup> El desarrollo embrionario es normal (contrario a lo que ocurre con LRP6). Los ratones alcanzan la vida adulta y son fértiles. Sin embargo, los animales tienen menor densidad mineral ósea detectable a los seis meses de edad. Además, los ratones tienen dislipidemia y alteraciones del metabolismo de los carbohidratos. La dislipidemia es evidente sólo durante el consumo de una dieta alta en grasa; se caracteriza por un retraso moderado de la eliminación de los remanentes mediada por la apolipoproteína E (proteína que es un ligando de LRP5). Como resulta-

do, se observó hipercolesterolemia moderada. Los autores extendieron sus observaciones generando un ratón con eliminación de la expresión de la apoE y de LRP5. La magnitud del cúmulo de remanentes fue aún mayor en el ratón con el doble defecto, en especial, después de una carga de grasa. El tamaño de las placas de ateroma fue tres veces mayor en los ratones con la doble anomalía comparada contra aquellos sin la apoE. Estos datos hacen factible que la deficiencia de LRP5 sea causa potencial de dislipidemia y aterosclerosis.

El ratón con deficiencia de LRP5 aportó información nueva sobre el papel del receptor y de las Wnt en la función de la célula beta. A la edad de 6 meses, los ratones tenían intolerancia a la glucosa, explicada por la disminución de la secreción de insulina. La acción de la insulina en los tejidos periféricos era normal. La deficiencia de la secreción de la insulina es mediada por la ausencia de LRP5, ya que la corrección del defecto *in vitro* normalizó la capacidad de la célula beta para secretar insulina. El defecto en la secreción de insulina asociado a la deficiencia de LRP5 está relacionado a su capacidad para mediar las acciones de las proteínas Wnt. La infusión de Wnt3a aumenta la secreción de insulina y el efecto opuesto se observa con la administración de un antagonista. Estos datos demuestran que la activación Wnt es un determinante de la secreción de insulina y que sus acciones son mediadas en parte por LRP5.

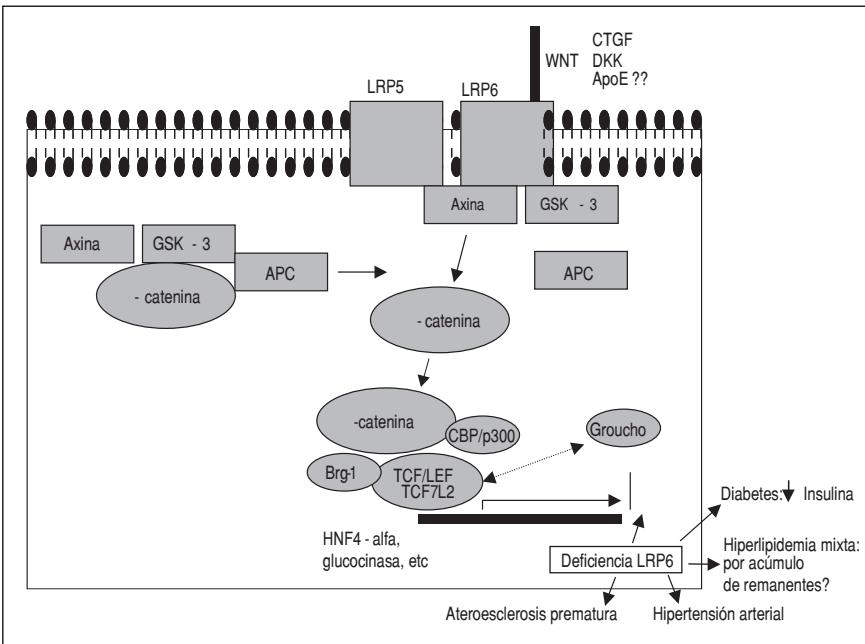
La información descrita permite postular algunos mecanismos que explican los hallazgos clínicos de la familia con deficiencia de LRP6. La asociación con diabetes puede ser explicada de varias maneras (Figura 1). Las Wnt indu-

cen la secreción de insulina mediante su unión con LRP6, LRP5 y el receptor Fz. El aumento de la secreción de insulina se debe a un aumento de la expresión de varios factores transcripcionales involucrados en el control de la secreción de insulina (HNF-4 alfa) y de la glucocinasa (enzima requerida para la utilización intracelular de la glucosa). Además, la  $\beta$ -catenina (mediador intracelular de la acción de LRP) requiere la interac-

ción con los factores transcripcionales de la familia TCF/LEF; entre ellos, el TCF7L2 (conocido previamente como TCF4) ha sido asociado con mayor riesgo de sufrir diabetes tipo 2, probablemente al regular la expresión del gen de GLP-1, una incretina que estimula la secreción de insulina. Por tanto, la deficiencia de LRP6 puede resultar en una menor secreción de insulina debido a una menor expresión de los diversos

factores transcripcionales que regulan la expresión del gen de la insulina. Por ello, es posible especular que otros casos con anomalías en el gen de LRP6 serán identificados en pacientes con diabetes tipo 2 de aparición temprana (antes de los 40 años). La deficiencia de la secreción de la hormona explica la aparición prematura de la hiperglucemia. Además, la deficiencia de LRP6 podría ser causa de hipercolesterolemia al disminuir la depuración de los remanentes. Los datos incluidos en el reporte son insuficientes para identificar el tipo de lipoproteínas acumuladas en el plasma. El aumento del colesterol-LDL no es una anomalía propia de la acumulación de remanentes. Se requieren estudios adicionales que incluyan una descripción detallada de las lipoproteínas acumuladas en el plasma en la deficiencia de LRP6, ya que no se ha demostrado que LRP6 sea un ligando funcionalmente importante de la apoE y de los remanentes.

Los hallazgos descritos para la deficiencia de LRP-6 abren nuevas líneas de investigación. Quedan por ser identificados los mecanismos por los que la anomalía se asocia a hipertensión arterial severa y de aparición temprana. Mecanismos frecuentemente implicados en la hipertensión arterial como la resistencia a la insulina y las anomalías relacionadas a la adiposidad abdominal pueden ser descartados, ya que la mayoría de los casos no tenían sobrepeso. Una posibilidad es la producción anormal de alguna citosina del tejido adiposo (ej. adiponectina o RBP4), ya que las Wnt juegan un papel importante en la diferenciación de los pre-adipositos.<sup>8</sup> Asimismo, se requieren estudios sobre los fenómenos que explican la aterosclerosis acelerada.



**Figura 1.** Mecanismos potenciales por los que la deficiencia de LRP6 se asocia a la diabetes, dislipidemia y la aterosclerosis. DKK = Dickkopf CTGF = Factor de crecimiento del tejido conectivo

biológico. La unión de LRP6 a Wnt hace posible que LRP6 participe en una gran variedad de fenómenos biológicos. La cascada de señalización de las Wnt depende del aumento de concentración de la  $\beta$ -catenina, la cual se activa o reprime la expresión de múltiples genes al unirse con otros cofactores. En ausencia de la estimulación Wnt, la concentración de la  $\beta$ -catenina se mantiene baja debido a que forma un complejo con otras proteínas como la Axina, la APC (adenomatous polyposis coli) y la cinasa 3  $\beta$  de la glucógeno sintetasa (GSK-3). La  $\beta$ -catenina es fosforilada por la GSK-3, lo que permite que se una a radicales ubiquitina y sea degradada en el proteosoma. La unión de Wnt a sus receptores (incluyendo LRP5 y LRP6) impide la interacción de la  $\beta$ -catenina con las proteínas que determinan su fosforilación. Como resultado, aumenta su concentración intracelular y su transferencia al núcleo donde interactúa con diversos factores de transcripción de la familia TCF/LEF (factor de transcripción específico de las células T/factor 1 de unión-incremento linfóide), los cuales en condiciones basales se encuentran formando un complejo (con el factor Groucho y la desacetilasa de histonas) que funciona como co-represor. La  $\beta$ -catenina desplaza al factor Groucho, lo que le permite unirse a otros co-activadores (acetilasa de histonas CBP/p300, el miembro Brøg-1 del complejo SW1/SNF) que hacen posible la remodelación de la cromatina que rodea los sitios que reconocen los factores TCF/LEF. Los genes blanco son múltiples; entre ellos se encuentran factores transcripcionales que regulan la secreción de insulina (como HNF-4 alfa, Tcf1, Tcf2), la glucocinasa, el receptor IGF-1 e IRS2 (uno de los mediadores intracelulares de la acción de la insulina).

Con la información disponible, no es posible estimar la contribución de la hipertensión, la diabetes y la hiperlipidemia asociada a la deficiencia de LRP6. La severidad de la dislipidemia es moderada, lo que hace improbable que este sea el factor más importante en la génesis de las lesiones vasculares. Es probable que otros mecanismos distintos participen, ya que LRP6 regula la proliferación y el ciclo celular de las células musculares lisas de la pared arterial. Wang, et al. sugieren que LRP6 inhibe la apoptosis de las células musculares lisas de la pared arterial; esta anomalía forma parte de la fisiopatología de la placa ateromatosa.<sup>9</sup> La resolución de estas preguntas será compleja, ya que la eliminación de la expresión de LRP6 en modelos animales resulta en alta letalidad *in utero*. Técnicas de rescate tendrán que ser implementadas para poder mejorar la deficiencia de LRP6 ocurrida en el humano.

En conclusión, el trabajo conjunto entre un investigador clínico con investigadores básicos de primera línea resultó en la identificación de la participación de LRP6 en la fisiopatología de varios de los problemas de salud más importantes que confronta el mundo occidental. Por lo cual, LRP6 se vuelve un gen de interés

en poblaciones como la nuestra donde la diabetes de aparición temprana y las dislipidemias tienen una prevalencia alta y mayor a la descrita en otros grupos étnicos.<sup>10,11</sup>

#### REFERENCIAS

- Mani A, Radhakrishnan J, Wang H, Mani A, Mani M, Nelson-Williams C, et al. LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* 2007; 315: 1278-82.
- Brown SD, Twells RC, Hey PJ, Cox RD, Levy ER, Soderman AR, et al. Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 879-88.
- He Xi, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/β-catenin signaling: Arrows point the way. *Development* 2004; 131: 1663-77.
- Gordon M, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006; 281: 22429-33.
- Price MA. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Gen Develop* 2006; 20: 399-410.
- Fujino T, Asaba H, Kang M, Ikeda Y, Sone H, Takada S, et al. Low density lipoprotein receptor related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose induced insulin secretion. *Proc Nat Acad Sci USA* 2003; 100: 229-34.
- Magoori K, Kang M, Ito M, Kakuuchi H, Ioka R, Kamataki A, et al. Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein re-
- ceptor related protein 5 and apolipoprotein E. *J Biol Chem* 2003; 278: 11331-6.
- Christodoulides C, Laudes M, Cawthon W, Schinner S, Soos M, O'Rahilly S, et al. The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *J Cell Science* 2006; 119: 2613-20.
- Wang X, Adhikari N, Li Q, Hall J. LDL receptor related protein LRP6 regulates proliferation and survival through the Wnt cascade in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H2376-H2383.
- Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Rios JM, Gómez Pérez FJ, Rull JA, et al. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nation wide survey. *J Lipid Research* 2001; 42: 1298-307.
- Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, García E, Valles V, Ríos-Torres JM, et al. Early onset type 2 diabetes in a Mexican population-based, nation-wide survey. *Am J Med* 2002; 113: 569-74.



Dr. Carlos Alberto

Aguilar-Salinas

Departamento de  
Endocrinología y  
Metabolismo del Instituto  
Nacional de Ciencias Médicas  
y Nutrición Salvador Zubirán.  
Vasco de Quiroga 15, Tlalpan,  
14000, Mexico, D.F.  
Tel.: 52-5513-38-91,  
Fax: 52-5513-00-02  
Correo electrónico:  
caguilarsalinas@yahoo.com