

## Genética

### ANÁLISIS GENÉTICO DE PACIENTES CON HIPERTRIGLICERIDEMIA GRAVE

<sup>1</sup>M.J. Ariza, <sup>2</sup>I. Coca, <sup>2</sup>C. García-Arias, <sup>2,3</sup>M.A. Sánchez-Chaparro, <sup>3</sup>J. Román-García, <sup>1</sup>J. Rioja, <sup>1,3</sup>A. Hornos, <sup>3</sup>E. Calvo-Bonacho, <sup>2</sup>P. González-Santos, <sup>4</sup>G. Olivecrona y <sup>2</sup>P. Valdivielso

<sup>1</sup>Laboratorio de Lípidos y Arteriosclerosis. Centro de Investigaciones Médico-Sanitarias, Universidad de Málaga. <sup>2</sup>Unidad de Lípidos, Servicio de Medicina Interna, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga y Departamento de Medicina, Universidad de Málaga. <sup>3</sup>Ibermutuamur, Madrid. <sup>4</sup>Department of Medical Biosciences, Umeå University, Umeå, Sweden.

La hipertrigliceridemia grave aparece cuando la concentración plasmática de TGs sobrepasa los 10 mmol/L. En esta situación aumenta el riesgo vascular y la posibilidad de sufrir episodios de pancreatitis aguda. A nivel genético, sólo un pequeño porcentaje de casos se explica por la presencia de mutaciones, en homocigosis, que provocan déficits familiares de LPL, APO CII o APO AV. Cabe pensar que otra parte de los casos pueda explicarse por la acumulación de variantes comunes en genes candidatos e incluso por la presencia de mutaciones en heterocigosis, junto con algún factor ambiental desencadenante.

**Objetivos:** 1. Calcular las frecuencias de los polimorfismos E2, E3, E4 (APO E), -1131T/C y S19W, (APO A5), D9N, N291S y S447X (LPL) en un grupo de 50 pacientes con hipertrigliceridemia grave para su comparación con las frecuencias de un grupo control. 2. Comprobar la frecuencia de mutaciones G188E (LPL), Q148X y Q139X (APO A5) en los pacientes.

**Métodos:** hemos estudiado 50 pacientes con HTG grave procedentes de nuestra unidad de lípidos, ninguno de ellos deficiente de LPL o Apo C-II. Los controles normolipémicos (N = 625) proceden de un grupo de población laboral malagueña, ajustados por edad, género e IMC respecto a los pacientes. El genotipado del polimorfismo de APO E y de las mutaciones se llevó a cabo mediante PCR y restricción. La determinación de las variantes comunes se realizó empleando ensayos TaqMan diseñados por nosotros.

**Resultados:** la mayoría de los 50 casos hipertrigliceridémicos y los 625 controles fueron hombres de alrededor de 46 años. La frecuencia del genotipo de APO E, E2E4, fue significativamente mayor en casos (4,0%) que en controles (0,9%) al igual que las de portadores de las variantes comunes N291S (pacientes 12%, controles 2%) y S19W (pacientes 32%, controles 13%). Por el contrario, la variante protectora de LPL, S447X, estuvo menos representada en los sujetos con HTG (8% frente al 22% de controles,  $p < 0,05$ ). La proporción de sujetos portadores de 2 o más variantes "hipertrigliceridémicas" fue mayor en los pacientes (8%) que en los controles (1%;  $p < 0,05$ ). Todos los portadores del polimorfismo S19W con HTG grave presentaban, además, al menos un factor ambiental predisponente (alcohol, tabaco, obesidad o diabetes) mientras que un 14% de controles portadores no presentaron ninguna de estas condiciones ( $p = 0,002$ ). No se encontraron portadores de las mutaciones G188E, Q148X ni Q139X en el grupo de 50 pacientes.

**Conclusiones:** en los sujetos estudiados, existe una asociación entre los polimorfismos N291S (LPL), S19W (APO A5) y el genotipo E2E4 de APO E y la hipertrigliceridemia grave. La variante S447X de LPL parece tener un efecto protector frente a este fenotipo extremo. Las asociaciones encontradas pueden estar influenciadas por la presencia de factores predisponentes no gé-

nicos. No se ha podido verificar la presencia de las mutaciones G188E (LPL), Q148X y Q139X (APO A5) en los pacientes.

### EFEECTO ADITIVO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS PARA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON ICTUS E IAM

<sup>1</sup>J. Orbe, <sup>2</sup>M.T. Zudaire, <sup>2</sup>M.J. Paloma, <sup>1</sup>J.A. Rodríguez, <sup>1</sup>A.I. Purroy y <sup>1</sup>J.A. Páramo

<sup>1</sup>Laboratorio de Aterosclerosis, CIMA, Universidad de Navarra. <sup>2</sup>Servicio de Hematología, Hospital Virgen del Camino. Pamplona.

La aterotrombosis, sustrato fisiopatológico del ictus e infarto agudo de miocardio (IAM), es una enfermedad poligénica y multifactorial, resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Mientras que los factores tradicionales de riesgo cardiovascular (hipertensión, hipercolesterolemia, tabaquismo y diabetes) son responsables de un 50% de los episodios trombóticos, un porcentaje importante de pacientes con IAM no puede explicarse por dichos factores, lo que sugiere la importancia del componente genético.

**Objetivos:** Determinar si en una población de sujetos menores de 60 años con antecedentes de ictus e IAM existe mayor prevalencia de polimorfismos genéticos relacionados con la trombosis arterial.

**Material y métodos:** Se obtuvo ADN de pacientes < 60 años que habían sufrido un ictus (65 pacientes) o IAM (102 pacientes) y de sujetos < 60 años del mismo hospital, sin historia de ictus o IAM (78 controles). Se estudiaron los siguientes polimorfismos genéticos (CVD strip assay, Izasa): Factor V R506Q (Leiden), Factor V H1299RR (R2), Protrombina G2021A, Factor XIII V34L, Fibrinógeno -455G/A, PAI-1 4G/5G, GpIIIa L33P (HPA-1), MTHFR C677T, MTHFR A1298C, ACE (del/ins), ApoB R3500Q y ApoE (E2, E3, E4).

**Resultados:** Se observó una mayor prevalencia del alelo 4G del PAI-1 en pacientes con ictus ( $p = 0,02$ ) e IAM ( $p = 0,004$ ) respecto al grupo control. Asimismo, había una mayor prevalencia de genotipo 1<sup>a</sup>/1b del polimorfismo HPA-1 tanto en ictus ( $P < 0,01$ ) como en IAM ( $p < 0,001$ ), sin diferencias en los restantes polimorfismos estudiados. En un modelo aditivo considerando los 12 polimorfismos, la prevalencia de infarto incrementó linealmente con el número de alelos desfavorables ( $\chi^2 = 6,13$ ,  $p = 0,013$ ).

**Conclusiones:** De todos los polimorfismos estudiados únicamente mostró diferencias significativas tanto en pacientes con ictus como con IAM, el polimorfismo 4G/5G del PAI-1. El genotipo 1<sup>a</sup>/1b presenta unas características fisiológicas similares al alelo normal 1<sup>a</sup>, por lo que no condiciona el desarrollo de eventos. La combinación de polimorfismos protrombóticos podría predecir IAM en pacientes con enfermedad arterial coronaria.

### EL POLIMORFISMO R72T EN EL GEN DEL PÉPTIDO YY (PYY) SE ASOCIA CON LAS CONCENTRACIONES DE PYY Y VARIABLES RELACIONADAS CON LA OBESIDAD EN POBLACIÓN MEDITERRÁNEA DE ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR

<sup>1,2,3</sup>J.V. Sorlí, <sup>1,2</sup>C. Ortega-Azorín, <sup>1</sup>P. Carrasco, <sup>1,2</sup>P. Guillén-Sáiz, <sup>4</sup>V. Pascual, <sup>1</sup>M. Guillén y <sup>1,2</sup>D. Corella

<sup>1</sup>Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Universidad de Valencia. <sup>2</sup>CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, ISCIII. <sup>3</sup>Centro de Salud de Xirivella, Valencia. <sup>4</sup>Centro de Salud Palleter, Castellón.

**Antecedentes y objetivos:** El péptido YY (PYY) es un miembro de la familia del Neuropeptido Y, secretado por las células

L del tracto gastrointestinal. Se libera tras la ingesta de alimentos en función de la ingesta calórica, actuando sobre receptores Y2R, los cuales producen la sensación de reducción de apetito. Estudios en animales han mostrado que concentraciones plasmáticas elevadas de PYY se asocian con menor ingesta de alimentos, menor peso y menor riesgo de diabetes. En humanos, aunque se ha propuesto que el PYY plasmático puede ser un indicador precoz de riesgo de diabetes y de síndrome metabólico, todavía existen pocos estudios con resultados contradictorios. Además, tampoco se conoce bien el efecto de la variabilidad genética en el gen PYY sobre dichos parámetros. Nuestro objetivo ha sido estudiar la asociación entre el polimorfismo Arg72Thr (rs1058046; G/C) en el PYY con medidas antropométricas y concentraciones plasmáticas en ayunas de glucemia, triglicéridos, colesterol, adiponectina, leptina, ácidos grasos y de PYY en población mediterránea de alto riesgo cardiovascular.

**Métodos:** Se estudiaron 463 (294 mujeres y 169 hombres) participantes del estudio PREDIMED (PREvención con Dieta ME-Diterránea) reclutados en Valencia. Son personas de elevado riesgo cardiovascular, con media de edad 67,4±6,2 años y con un valor medio de IMC 30,5±4,9 kg/m<sup>2</sup>. Se ha determinado el polimorfismo A72T y concentraciones plasmáticas en ayunas de glucosa, lípidos, adiponectina, leptina, ácidos grasos libres y PYY, estudiándose sus asociaciones.

**Resultados:** La frecuencia del polimorfismo G/C (R72T) fue de 41,5% GG, 46,6% GC, y 11,9% CC. Aunque dicho polimorfismo no se asoció con el riesgo de obesidad ni de diabetes tanto en hombres como en mujeres, sí que se obtuvieron algunas asociaciones con variables antropométricas y bioquímicas. En mujeres, las concentraciones plasmáticas de PYY fueron significativamente más elevadas (26%; P < 0,05) en las RR que en las portadoras T. De manera consistente con ello, en mujeres RR se detectaron mayores concentraciones de adiponectina que en las portadoras T (12,5±5,6 vs 10,8±5,2 microg/ml; P = 0,022). Las concentraciones de colesterol total fueron significativamente inferiores en las RR (206±37 vs 218±39 mg/dL; P = 0,01). También fueron inferiores en las RR las concentraciones de ácidos grasos libres, la glucemia y el IMC, aunque en el límite de la significación estadística, al igual que ocurría en los hombres.

**Conclusiones:** En esta población de elevado riesgo cardiovascular, las concentraciones plasmáticas de PYY se asocian inversamente con el peso, estando muy determinadas en mujeres por el polimorfismo R72T. Además este polimorfismo se asocia con adiponectinemia, colesterolemia y otras variables del síndrome metabólico.

### EL POLIMORFISMO -514 C>T INFLUYE EN LA RESPUESTA DEL PROMOTOR DEL GEN DE LA LIPASA HEPÁTICA A INCREMENTOS DE LAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDOS GRASOS

<sup>1</sup>S. Pampín, <sup>2</sup>B. García-Bailo, <sup>2</sup>J.M. Ordovás y <sup>1</sup>J.C. Rodríguez-Rey

<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Avda Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain. <sup>2</sup>Nutrition and Genomics Laboratory, JM-USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University, Boston, MA 02111, USA

La lipasa hepática es un enzima que ocupa un papel central en el procesamiento de las lipoproteínas plasmáticas. Se han descrito varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el promotor del que la codifica (LIPC) siendo el -514 C>T el que ha recibido mayor atención. En general el alelo T se ha asociado a menores niveles de actividad lipasa en plasma y niveles

más elevados de c-HDL. Estos resultados están de acuerdo con los estudios funcionales, que indican que la sustitución de C por T produce una disminución de la fuerza del promotor.

En estudios llevados a cabo en los diferentes grupos étnicos de la población de Singapur se observó que el efecto del polimorfismo puede modularse modificando la cantidad de grasa en la dieta, pudiendo llegarse a una inversión de la asociación (Tai y cols 2003). Un efecto modificador del efecto del SNP sobre el perfil lipídico debido al aumento de las grasas saturadas en la dieta había sido anticipado en estudios anteriores en la población de Framingham (Ordovás y cols, 2002). Todo ello sugiere que existe una importante interacción genes - dieta que afecta de forma especial a este polimorfismo.

Con objeto de ver si este fenómeno puede ser atribuido al efecto directo de los propios ácidos grasos sobre la expresión del gen se llevaron a cabo experimentos en células en cultivo para medir la fuerza de los promotores en presencia de suplementos de ácidos esteáricos, linoleico y araquidónico respectivamente. Los resultados obtenidos en ausencia de suplementos, así como los ensayos de unión de proteínas indicaron que el promotor que contiene el alelo C es un 80% más fuerte que el que contiene el alelo T, lo que confirma los estudios funcionales previos. En presencia de los suplementos de ácidos grasos esta diferencia se amplifica pero solo de forma significativa cuando se suplementa el cultivo con ácido esteárico.

Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, la diferente respuesta de los portadores de los alelos del polimorfismo -514C>T a los cambios en la composición en grasas de la dieta.

### EPICARDPGENE': UN SERVICIO WEB PARA LA SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS A ESTUDIOS EPIGENÉTICOS SOBRE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

J. Ruano, P. Pérez-Martínez, F. Fuentes, J. Fernández, A. García, A.I. Jiménez, J.A. Paniagua, J. López-Miranda y F. Pérez-Jiménez

CIBER Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III. Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

**Introducción:** Las modificaciones epigenéticas permiten activar o inactivar genes en distintos tejidos de forma selectiva durante diferentes etapas de la vida. Las 'islas CpG' son regiones del genoma ricas en dinucleótidos CG, asociadas a estructuras de cromatina abierta y transcripcionalmente competente, que están implicadas en este tipo de regulación. Sin embargo se estima que, de las 109.270 islas CpG que existen en el genoma humano, sólo un 20% son funcionales, es decir, susceptibles de que modificaciones en su patrón de metilación determinen cambios en la expresión de dichos genes. Hasta el momento sólo se han identificado experimentalmente en humanos las islas CpG funcionales de los cromosomas 21 y 22. Recientemente un método de Biología Computacional ha permitido utilizar gran parte de la información anterior para elaborar un sistema de predicción del grado de funcionalidad de cualquier isla con una alta especificidad. Basados en este nuevo método, nos propusimos establecer una estrategia para identificar posibles islas funcionales localizadas en la región promotora de genes relacionados con el desarrollo de enfermedad cardiovascular que pudieran ser candidatos para estudios epigenéticos en humanos.

**Materiales y métodos:** Se realizó *text mining* usando iHOP (*Information Hyperlinked over Proteins*) para crear, a partir de información de los abstracts de publicaciones sobre estu-

dios llevados a cabo en humanos o con modelos animales (*knock-out*, *knock-down*, *floxed genes*, *cDNA cloning animals*), una red semántica de genes-términos relacionados con enfermedad cardiovascular (regulación de la ingesta, tasa metabólica basal y termogénesis inducida por la alimentación, equilibrio energético, metabolismo lipídico, grasa intracelular, tamaño del adipocito, diferenciación adipocitaria, adipogénesis, lipólisis, sensibilidad insulínica, niveles plasmáticos de lípidos, obesidad, IMC, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico, hipertensión arterial, infarto cerebral isquémico, infarto agudo de miocardio, etc). Un *script* de Python permitió automatizar el proceso de selección de aquellos genes que tenían islas CpG funcionales en una ventana de -500Kb respecto cada punto de inicio de transcripción. A partir de las bases de datos GNF y con el uso de BioMart se obtuvo información básica y los perfiles de expresión de cada uno de los genes en tejidos hepático, adiposo y muscular sanos con respecto al resto de tejidos.

**Resultados:** Se identificaron 435 genes relacionados con algún aspecto relacionado con la enfermedad cardiovascular. Para la consulta de los resultados (genes-rasgos fenotípicos, genes-islas, genes-expresión tisular) se creó *'EPICardpGene'*, un servicio web público construido con Ruby/Rails/Ajaxscripts, cuya gestión se realiza desde un servidor remoto basado en Apache® y MySQL.

#### ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE VARIANTES GENÉTICAS DE NPC1L1, ABCG5 Y ABCG8 Y LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL

<sup>1</sup>M. Solanas Barca, <sup>1</sup>A.L. García Otín, <sup>2</sup>M. Cofán, <sup>3</sup>I. de Castro, <sup>3</sup>B. Martín, <sup>2</sup>E. Ros, <sup>3</sup>M. Pocoví y <sup>1</sup>F. Civeira

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS), Zaragoza. <sup>2</sup>Hospital Clinic, Barcelona. <sup>3</sup>Laboratorio de Lípidos, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Zaragoza.

**Introducción:** La homeostasis de colesterol está controlada principalmente por absorción intestinal y síntesis endógena del esteroide, junto con la excreción biliar de ácidos biliares. Existe una correlación positiva entre las concentraciones séricas de C-LDL y la eficiencia de la absorción intestinal de colesterol. La absorción intestinal de colesterol y esteroles vegetales es un proceso complejo en el que intervienen numerosos enzimas y transportadores. La proteína NPC1L1 actúa internalizando el colesterol en el enterocito como paso previo a la formación de quilomicrones nacientes y en el hepatocito a partir del colesterol previamente excretado a la bilis. Por otra parte, el heterodímero ABCG5/ABCG8 actúa bombeando esteroles desde los enterocitos y hepatocitos al lumen intestinal y biliar, respectivamente. Los efectos combinados de estos tres genes podrían jugar un papel crítico en la regulación de la cantidad de colesterol que pasa a la sangre desde el lumen intestinal. Se ha demostrado que algunas variaciones en estos genes se asocian con aumentos del C-LDL.

**Objetivo:** Estudiar la posible asociación entre variantes genéticas de NPC1L1, ABCG5 y ABCG8 y la eficiencia de la absorción intestinal de colesterol.

**Material y métodos:** Se seleccionaron 114 individuos normolipémicos, en los cuales se determinaron las cifras de colesterol total (CT), C-LDL, C-HDL y triglicéridos (TG). Además, se calcularon los cocientes de absorción y síntesis de colesterol a partir de los valores de esteroles plasmáticos (campesterol, lanosterol, sitosterol y lanosterol). Mediante técnicas de secuenciación génica, se determinaron dos polimorfismos del promo-

tor de NPC1L1 (-133<sup>a</sup> > G y -18C > A) y dos del heterodímero ABCG5/G8 (Q604E y D19H).

**Resultados:** Los cocientes de absorción de colesterol fueron significativamente inferiores en sujetos portadores del alelo menor © del SNP D19H del gen ABCG8 (Campesterol/Latosterol 93 ± 60 vs 162 ± 113 p = 0,007; Campesterol/Colesterol 133 ± 43 vs 202 ± 82 p = 0,000; Sitosterol/Colesterol 111 ± 35 vs 173 ± 68 p = 0,000; cocientes esteroles/colesterol (x10<sup>2</sup> μmol/ mmol colesterol). Medias ± DE). Las variantes estudiadas en NPC1L1 y ABCG5 no se asocian con cifras de esteroles.

**Conclusiones:** Los resultados sugieren que la variante D19H del gen ABCG8 contribuye a la regulación de la absorción intestinal de esteroles.

#### ESTUDIO DE FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN CYP7A1 Y SU IMPLICACIÓN EN LA RESPUESTA HIPOCOLESTEROLEMIANTE A LOS ESTEROLES VEGETALES

<sup>1</sup>I. De Castro, <sup>2</sup>S. Pampín, <sup>3</sup>M. Cofán, <sup>3</sup>E. Ros, <sup>4</sup>X. Pintó, <sup>2</sup>J.C. Rodríguez-Rey, <sup>5</sup>F. Civeira y <sup>1</sup>M. Pocoví

<sup>1</sup>Dpto. Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. <sup>2</sup>Dpto. Biología Molecular. Universidad de Cantabria.

<sup>3</sup>Unidad de Lípidos, Servicio de Endocrinología y Nutrición.

<sup>4</sup>Hospital Clínico de Barcelona. <sup>5</sup>Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital de Bellvitge. <sup>5</sup>Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Miguel Servet de Zaragoza.

**Antecedentes:** El gen CYP7A1 codifica la enzima colesterol 7α-hidroxilasa de la biosíntesis de los ácidos biliares. El SNP -204<sup>a</sup> > C de CYP7A1 se ha asociado con concentraciones elevadas de cLDL. Este está regulado por citoquinas y ácidos biliares. Numerosos estudios han demostrado que los esteroles vegetales (EV) son eficaces para reducir el colesterol. Con objeto de conocer el efecto de este polimorfismo sobre la regulación del colesterol plasmático, hemos llevado a cabo estudios de intervención dietética y funcionalidad *in vitro*.

**Material y métodos:** A 70 sujetos con hipercolesterolemia moderada se les administró leche desnatada enriquecida con 2 g EV/día. El SNP -204<sup>a</sup> > C se analizó mediante la técnica de extensión de cebadores por secuenciación. Se realizó una búsqueda de sitios de unión de factores de transcripción mediante el programa Matinsepector. Se analizaron por retardo en gel (EMSA) las dos variantes alélicas del SNP -204<sup>a</sup> > C. Se estudió la funcionalidad de las dos variantes A/C del promotor clonado en el plásmido de expresión de la luciferasa pGL3-BASIC, transfectando a células HepG2, y se determinó la actividad luciferasa.

**Resultados:** Tras la intervención dietética, los portadores del alelo C presentaban un mayor descenso del cLDL y mayor aumento de fitoesteroles plasmáticos y precursores de síntesis de colesterol que los individuos AA. Las diferencias de respuesta fueron -0,13 mmol/L, 1,11 μmol/mmol y 0,59 μmol/mmol colesterol, respectivamente (p < 0,05). Los EMSAs, mostraron mayor afinidad de las proteínas nucleares por el alelo C que por el A. La actividad luciferasa fue 4,5 veces superior con el promotor que contenía el alelo C que con A.

**Conclusiones:** Los individuos portadores del alelo C para el SNP -204<sup>a</sup> > C tienen una mayor repuesta frente al tratamiento con esteroles vegetales, que los sujetos AA, este hecho se debe a una mayor actividad transcripcional del promotor del gen CYP7A1 con la variante -204C.

Trabajo realizado con fondos RECAVA y proyecto FIS 06/1238.

## ESTUDIO DE LOCI ASOCIADOS A HIPERCOLESTEROLEMIA AUTOSÓMICA DOMINANTE E HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA

<sup>1</sup>I. de Castro, <sup>2</sup>M. Solanas, <sup>2</sup>A.L. García-Otín, <sup>1</sup>P. Mozas, <sup>3</sup>E. Ros, <sup>2</sup>F. Civeira y <sup>1</sup>M. Pocoví

<sup>1</sup>Dpto. Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. <sup>2</sup>Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza. <sup>3</sup>Unidad de Lípidos, Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Clínico de Barcelona.

**Introducción:** La hipercolesterolemia autosómica dominante (HAD) es una de las enfermedades mendelianas autosómicas dominantes más frecuente, causada por mutaciones en los genes LDLR, APOB y PCSK9, o de origen desconocido. Por otra parte la hiperlipemia familiar combinada (HFC) es una dislipemia frecuente, pero su origen genético es desconocido. La HFC se ha asociado con un locus mayor 1q21-23, donde se encuentra el gen USF1, pero se cree que en la expresión de HFC pueden intervenir otros genes asociados a la absorción del colesterol y su circulación enterohepática.

**Objetivos:** Identificación de loci asociados a HAD y a HFC.

**Material y métodos:** Seleccionamos 200 sujetos controles normolipidémicos, 200 sujetos con HFC y 200 sujetos con HAD en los que se descartaron defectos de los genes LDLR y APOB. Analizamos los polimorfismos (SNPs) Q604E de ABCG5 y -204<sup>a</sup>>C de CYP7A1 por digestión con las enzimas de restricción XmnI y BsaI, respectivamente, y -19T>G y D19H de ABCG8 mediante secuenciación automática. En el caso de la población control y HFC, también se analizaron los SNPs usf1s1 (rs3737787) en el exón 11 y usf1s7 (rs2516839) en el exón 2 del gen USF1, mediante pirosecuenciación.

**Resultados:** Hemos encontrado que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP D19H (G > C) de ABCG8 en HAD frente a controles (0,023 vs 0,069). También se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los SNPs del gen USF1 en la población control frente a HFC, siendo las frecuencias de los alelos minoritarios las siguientes: usf1s1 C > T, 0,22 vs 0,32, y usf1s7 G > A, 0,47 vs 0,39. Además observamos diferencias significativas ( $p = 0,003$  y  $p = 0,01$ , respectivamente) entre las frecuencias genotípicas de los SNPs usf1s1 y usf1s7 en controles frente a HFC. Por otra parte, en la población HFC los portadores del alelo C para el SNP -204<sup>a</sup> > C de CYP7A1 mostraron concentraciones superiores de triglicéridos ( $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** El SNP D19H del gen ABCG8 está asociado a la HAD. Los SNPs usf1s1 y usf1s7 del gen USF1 están fuertemente ligados a la HFC, y en menor medida el 204<sup>a</sup> > C de CYP7A1. Nuestros resultados descartan que el transportador de esteroides ABCG5/G8 esté asociado a la HFC.

## INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS Q223R DEL RECEPTOR DE LA LEPTINA Y -2548G/A DEL GEN DE LA LEPTINA EN LOS HÁBITOS DIETÉTICOS EN POBLACIÓN MEDITERRÁNEA

<sup>1,2,3</sup>J.V. Sorlí, <sup>1,4</sup>O. Portolés, <sup>1,4</sup>M. Guillén, <sup>1,4</sup>J.I. González, <sup>5</sup>D. Godoy, <sup>4</sup>O. Coltell y <sup>1,2</sup>D. Corella

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Preventiva. Universidad de Valencia.

<sup>2</sup>CIBER Fisiopatología de la obesidad y nutrición (ISCIII).

<sup>3</sup>Centro de Salud de Xirivella, Valencia. <sup>4</sup>Departamento de lenguajes y sistemas informáticos, Universitat Jaume I, Castellón (RETIC COMBIOMED). <sup>5</sup>Hospital General de Valencia.

**Objetivos:** En respuesta al aporte dietético de triglicéridos, los adipocitos secretan la leptina. Esta hormona actúa como

señal nutricional en el Sistema Nervioso Central modulando los mecanismos neuroendocrinos que intervienen en la cantidad y en la temporalidad de la ingesta, así como en el nivel de saciedad. En relación con la variante -2548G/A en el promotor de la leptina (LEP) de ha descrito que los individuos AA presentan menores niveles de leptina plasmática. La mutación Q223R en el receptor de la leptina (RLEP) afecta la funcionalidad del receptor y altera su capacidad de unión a la leptina. Nuestro objetivo es estudiar la asociación entre estas variantes y los hábitos dietéticos en población mediterránea.

**Metodología:** Estudio transversal en una muestra de 711 individuos (229 hombres y 482 mujeres) con edad comprendida entre 16-88 años de población general mediterránea. Se administró un cuestionario validado de hábitos alimentarios para determinar las costumbres dietéticas de la población. Se determinaron los polimorfismos -2548G/A en el LEP y el Q223R en el RLEP por métodos estándar.

**Resultados:** Al estudiar la variante -2548G/A LEP se observó en los hombres que la ingesta más importante del día fue la comida para el 85,3% de los GG vs 66,5% de los portadores del alelo A, y la cena para el 8,8% de los GG vs 22,5% de los portadores del alelo A ( $p = 0,039$ ). Retiran la grasa de la carne el 82,5% de los GG vs el 72,7% de los portadores A ( $p = 0,007$ ). Han adaptado su alimentación a lo largo de su vida el 54,3% de los portadores G vs el 43,3% de los AA ( $p = 0,047$ ). Al analizar la variante Q223R RLEP se observó que almuerzan a mitad mañana el 42,5% de los portadores del alelo Q vs el 64,3% de los RR ( $p = 0,022$ ). En los portadores R se detectó una predilección por los alimentos a la plancha (64,2 vs 50,5%;  $p = 0,022$ ). A lo largo de la vida habían modificado su alimentación reduciendo el aporte de grasas el 25,2% de los RR vs 18,4% de los Q ( $p = 0,009$ ).

**Conclusión:** El polimorfismo -2548G/A en el gen de la leptina parece estar asociado con peores hábitos dietéticos, mientras que la variante Q223R en el receptor de la leptina parece estar asociada con hábitos dietéticos beneficiosos.

## INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO R335H DE CAPG EN EL DESARROLLO DE ATROSCLEROSIS CAROTÍDEA

<sup>1</sup>E. Burillo, <sup>1</sup>D. Recalde, <sup>1</sup>E. Jarauta, <sup>1</sup>F. Civeira y <sup>1</sup>A. Cénarro

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación Molecular. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza

**Objetivo:** Estudios previos de nuestro grupo de investigación detectaron variabilidad en los proteomas de macrófagos de sujetos con hipercolesterolemia familiar (HF) con y sin xantomas tendinosos (XT). Mediante espectrometría de masas se identificaron las proteínas con variabilidad, CapG y GSTO1. Posteriormente, mediante técnicas de biología molecular, se identificó a nivel genético la causa de la variabilidad: el SNP R335H en el gen CAPG y A140D en el gen GSTO1. CapG es una proteína necesaria en procesos relacionados con fagocitosis y formación de vesículas y en macrófagos representa el 1% de las proteínas citoplásmicas. GSTO1 pertenece a la superfamilia glutatión-S transferasa y se asocia con protección frente al estrés oxidativo. Nuestro objetivo fue evaluar si el genotipo del SNP R335H en CAPG y A140D en GSTO1 podrían estar relacionados con la presencia de XT y con la aterosclerosis valorada mediante el grosor íntima-media (GIM) carotídeo.

**Métodos:** Se seleccionaron 465 sujetos, 237 hombres y 228 mujeres: 130 sujetos control, 130 sujetos con HF con mutación detectada en el LDLR y 190 sujetos con hipercolesterolemia autosómica dominante (HAD) sin mutación en LDLR ni

APOB. En todos ellos se determinó el perfil lipídico, la presencia de XT (mediante ecografía del tendón de Aquiles) y el GIM carotídeo (mediante ecografía de la arteria carótida). El genotipo del SNP R335H (G/A) en CAPG y A140D (C/A) en GSTO1 se determinó mediante PCR y posterior digestión con las enzimas de restricción Hsp92II y Cac8I, respectivamente.

**Resultados:** En el grupo de hombres HAD, el GIM carotídeo máximo fue mayor (1,2684 mm (0,8051-2,9650)) que en controles (0,9940 mm (0,7153-2,0228)),  $p = 0,037$ , para aquellos sujetos con el genotipo más frecuente, GG. Asimismo, en el grupo de hombres con hipercolesterolemia (HF+HAD), el GIM medio de la carótida interna fue mayor en los sujetos con genotipo GG (0,7613 mm (0,3829-1,7138)) que en controles (0,6145 mm (0,4530-1,6293)),  $p = 0,039$ . La presencia del alelo menor A resultó un factor independiente negativo en el GIM carotídeo, tanto en carótida común en su valor máximo ( $p = 0,032$ ) como en el valor medio ( $p = 0,042$ ), en el grupo de hombres HAD y con hipercolesterolemia, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables estudiadas en función del genotipo del SNP A140D de GSTO1.

**Conclusión:** El genotipo del SNP R335H de CAPG se relaciona con el GIM carotídeo en el grupo de hombres con hipercolesterolemia estudiados. Por lo tanto, CAPG podría ser un nuevo gen involucrado en el desarrollo de aterosclerosis carotídea en sujetos con hipercolesterolemia.

#### INTERACCIÓN ENTRE EL GENOTIPO DE LA APO-E Y EL CONSUMO DE ÁCIDOS GRASOS SATURADOS EN LA INCIDENCIA DE INFARTO DE MIOCARDIO EN LA COHORTE EPIC ESPAÑA

<sup>1,2</sup>J.V. Sorlí, <sup>1,2</sup>C. Ortega-Azorín, <sup>1</sup>P. Carrasco, <sup>1,2</sup>F. Francés, <sup>3,4</sup>C. Moreno, <sup>4,5</sup>C. Navarro, <sup>6</sup>J.R. Quirós, <sup>4,6</sup>N. Larrañaga, <sup>4,8</sup>M.J. Sánchez, <sup>9</sup>C.A. González y <sup>1,2</sup>D. Corella

<sup>1</sup>Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Universidad de Valencia. <sup>2</sup>CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, ISCIII. <sup>3</sup>Instituto de Salud Pública de Navarra, Pamplona. <sup>4</sup>CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII. <sup>5</sup>Consejería de Sanidad, Murcia. <sup>6</sup>Consejería de Sanidad y Servicios Sociales, Asturias. <sup>7</sup>Dirección de Salud de Guipúzcoa, San Sebastián. <sup>8</sup>Escuela Andaluza de Salud Pública, Granada. <sup>9</sup>Unidad de Epidemiología. Institut Català d'Oncologia.

**Antecedentes y objetivos:** El genotipo de la APO-E (alelos E2, E3 y E4) ha sido consistentemente asociado con concentraciones de colesterol LDL en múltiples estudios, sin embargo su relación con el riesgo de infarto ha sido más controvertida. Además, aunque se ha propuesto una interacción del genotipo de la APO-E con el consumo de grasa de la dieta, el nivel de evidencia es muy bajo. Nuestro objetivo ha sido estudiar la asociación entre el genotipo de la APO-E, su modulación por los ácidos grasos saturados (AGS) de la dieta, y la incidencia de infarto agudo de miocardio (IAM) en población española.

**Métodos:** Se ha realizado un estudio de casos y controles en la cohorte EPIC-España compuesta por 41440 personas sanas (29-69 años) reclutadas entre 1992 y 1996. Tras 9,1 años de seguimiento, se han identificado los casos de IAM incidentes y sus correspondientes controles apareados por sexo, edad y lugar reclutamiento. Se ha medido el consumo de alimentos mediante una detallada historia dietética previamente validada, y se ha determinado el genotipo de la APO-E mediante el análisis de curvas de fusión. Se han incluido 514 casos y 1088 controles (excluidos los E2/E4).

**Resultados:** En los casos, la prevalencia de portadores E2, homocigotos E3/E3 y portadores E4 fue de 6,4%; 75,9% y

17,5%. En los controles fue, respectivamente de 9,5%; 74,8% y 15,5%;  $P = 0,056$ ). En un modelo de regresión logística multivariante ajustado por sexo, edad, diabetes, consumo de tabaco y alcohol se obtuvo un mayor riesgo de IAM en los portadores del alelo E4 ( $OR = 1,94$ ;  $P = 0,007$ ), y en los E3/E3 ( $OR = 1,66$ ;  $P = 0,018$ ), en comparación con los portadores del alelo E2. Sin embargo, dicha estimación fue diferente en función del consumo de AGS (que se situó en promedio en un 10,7% de la energía), alcanzando la interacción gen-dieta significación estadística ( $P < 0,05$ ). Así, en aquellas personas con consumo bajo de AGS ( $< 10\%$ ), el genotipo de la APO-E no se asociaba significativamente con el riesgo de IAM ( $OR = 1,14$ ;  $P = 0,647$  para E3/E3, y  $OR = 1,19$ ;  $P = 0,589$  para E4, en comparación con los E2). Sin embargo, con un consumo alto de AGS ( $> 10\%$ ), el genotipo de la APO-E se asociaba muy significativamente con el riesgo de IAM ( $OR = 2,6$ ;  $P = 0,004$  para E3/E3 y  $OR = 3,33$ ;  $P = 0,001$  para E4, en comparación con los portadores E2). Un ajuste adicional por el índice de masa corporal y por la energía total de la dieta, no modificó estos resultados.

**Conclusiones:** Un mayor consumo de AGS aumenta el riesgo de IAM asociado al genotipo de la APO-E en población española.

#### INTERACCIÓN ENTRE LA INGESTA AGUDA DE GRASA Y LA PRESENCIA DEL SNP RS1121980 EN EL GEN FTO

<sup>1</sup>P. Pérez Martínez, <sup>1</sup>J. Ruano, <sup>1</sup>J. Delgado Lista, <sup>1</sup>A. García Ríos, <sup>1</sup>J. Criado, <sup>1</sup>E. Galán, <sup>2</sup>J.M. Ordovas, <sup>1</sup>J. López Miranda y <sup>1</sup>F. Pérez Jiménez

<sup>1</sup>Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Reina Sofía. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN). Córdoba.

<sup>2</sup>Nutrition and Genomics Laboratory, J.M.-US Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, MA, USA

**Objetivos:** Variaciones en el gen FTO se han asociado recientemente con el riesgo de presentar obesidad. Nuestro objetivo fue determinar si la presencia del polimorfismo rs1121980C > T en dicho gen podría influir en el metabolismo postprandial.

**Métodos:** Se seleccionaron 88 voluntarios normolipémicos, 27 homocigotos para el alelo mayoritario C (C/C), 44 heterocigotos C/T, y 17 homocigotos para el alelo minoritario T en el SNP rs1121980. Recibieron una comida grasa (1 g/Kg de peso corporal, 60000 unidades de vitamina A por m<sup>2</sup> de superficie corporal y 7 mg de colesterol/kg de peso), con un 60% de calorías como grasa, 15% como proteínas y un 25% como hidratos de carbono. Se realizaron extracciones en el tiempo 0 y cada hora hasta las 6 horas y otras dos últimas a las 8,5 y 11 horas, determinándose los niveles de colesterol total (CT) y triglicéridos (TGs) en plasma y CT, y TGs en las lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRT) grandes y pequeñas.

**Resultados:** Los portadores del genotipo T/T presentaron menores concentraciones postprandiales de TGs vehiculizados en las LRT pequeñas que los portadores del alelo mayoritario C ( $p = 0,015$ ). Además, los individuos T/T mostraron menores concentraciones de TGs plasmáticos durante el periodo postprandial comparados con los sujetos C/C y C/T ( $p = 0,019$ ). Igualmente, el área bajo la curva de los TGs plasmáticos (0,016) y los TGs en las LRT pequeñas ( $P = 0,021$ ) fueron consistentemente menores en los portadores T/T comparados con los otros grupos.

**Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que la presencia del genotipo T/T en el gen FTO se asocia con una menor respuesta postprandial, lo que podría sugerir, un menor riesgo cardiovascular en dichos individuos.

## LA INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO R219K DE ABCA1 SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE C-HDL ESTÁ MODULADA POR NIVELES DE LA HORMONA DHEA-S EN POBLACIÓN PREPUBERAL

P. Riestra, L. López-Simón, B. Cano, M. Benavente, S. Schoppen, \*H. Ortega, M. de Oya y C. Garcés

Unidad de Lípidos Fundación Jiménez Díaz, Madrid. \*Servicio de Bioquímica-Investigación Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

**Introducción:** El transportador ABCA1 es una proteína fundamental en el metabolismo del C-HDL que participa en el transporte reverso de colesterol. Polimorfismos genéticos en esta proteína transportadora se han asociado con niveles plasmáticos de C-HDL de forma diferente en hombres y mujeres sugiriéndonos una posible influencia hormonal.

**Objetivos:** Analizar la influencia del polimorfismo R219K del gen ABCA1 sobre los niveles plasmáticos de lípidos en la población prepuberal del Estudio Cuatro Provincias y su posible modulación por los niveles de la hormona dehidroepiandrosterona sulfato (DHEA-S).

**Metodología:** La población estudiada está constituida por 1255 niños de 6 a 8 años de edad (633 niños y 622 niñas). El polimorfismo R219K de ABCA1 se determinó mediante amplificación por técnica PCR y análisis de restricción y los niveles de DHEA-S mediante técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

**Resultados:** La frecuencia del alelo mutado K en nuestra población es de un 29%. No hemos encontrado diferencias en los niveles plasmáticos de lípidos entre los genotipos del polimorfismo R219K ni en niños ni en niñas, sin embargo hemos observado que los niños portadores del polimorfismo con menores niveles de DHEA-S presentan niveles de C-HDL y Apo AI significativamente más elevados que los que no son portadores del polimorfismo (tabla a pie de página). Esta asociación no se ha observado en niñas.

**Conclusión:** En nuestra población el alelo K del polimorfismo R219K de ABCA1 se asocia con niveles más altos de C-HDL y Apo AI en el tercil más bajo de DHEA-S en niños.

## LA INTERACCIÓN DEL POLIMORFISMO PDZK1\_I33968C>T CON LA DIETA DETERMINA EL RIESGO DE SÍNDROME METABÓLICO EN OBESOS

<sup>1</sup>M. Junyent, <sup>2</sup>D.K. Arnett, <sup>3</sup>M.Y. Tsai, <sup>2</sup>E.K. Kabagambe, <sup>4</sup>R.J. Straka, <sup>5</sup>M. Province, <sup>6</sup>P. An, <sup>1</sup>C.Q. Lai, <sup>1</sup>L.D. Parnell, <sup>1</sup>J. Shen, <sup>1</sup>Y.C. Lee, <sup>5</sup>I. Borecki y <sup>1</sup>J.M. Ordovas

<sup>1</sup>Nutrition and Genomics Laboratory, JM-USDA-HNRCA at Tufts University, Boston, MA. <sup>2</sup>Dep. of Epidemiology, School of Public Health, and Clinical Nutrition Research Center, University of Alabama at Birmingham, AL. <sup>3</sup>Laboratory of Medicine and Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, MN. <sup>4</sup>Dep. of Experimental and Clinical Pharmacology, College of Pharmacy University of Minnesota, Minneapolis, MN. <sup>5</sup>Division of Biostatistics, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO. <sup>6</sup>Dep. of Genetics, Division of Statistical Genomics, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.

**Objetivo:** PDZK1 actúa como cofactor de SCARB1, y la interacción entre ambas proteínas tiene un papel importante en el

transporte reverso del colesterol, apoyado por modelos animales. El objetivo del estudio fue evaluar la posible asociación de los polimorfismos i33968C> T, i15371G> A e i19738C> T del gen PDZK1 con los lípidos y el riesgo de síndrome metabólico (SM), y estudiar su interacción con la dieta.

**Métodos:** Se genotiparon 3 polimorfismos de PDZK1 en 1000 sujetos (481 varones y 519 mujeres) que participaron en el estudio GOLDN (*Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network*). El perfil lipídico se determinó con los procedimientos habituales mientras que para el tamaño de las lipoproteínas se utilizaron técnicas de espectroscopía por resonancia magnética nuclear. La ingesta dietética se evaluó con un cuestionario validado.

**Resultados:** PDZK1\_i33968C> T se relacionó con el SM (P = 0,034), a expensas de la elevación de los triglicéridos (P = 0,004) y de la VLDL (P = 0,007) y de la disminución de los valores de adiponectina (P = 0,022) en los portadores del alelo T, comparado con los homocigotos para el alelo C. Se encontró una interacción gen-IMC-dieta significativa (P = 0,026) por la que el efecto deletéreo del alelo i33968T con el SM se observó en obesos con un alto consumo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), proteínas y carbohidratos (valores de P entre 0,025 y 0,049), mientras que en los no-obesos, el elevado consumo de PUFA tenía un efecto protector (P = 0,063).

**Conclusión:** Nuestros resultados destacan la importancia del polimorfismo PDZK1\_i33968C> T en la prevalencia del SM. Asimismo, este riesgo puede ser modulado mediante cambios en el peso corporal y en la dieta. La replicación de nuestros resultados en otras poblaciones con elevado riesgo de SM es necesaria.

## LOS POLIMORFISMOS RS11774572 Y TAIQIB DEL GEN DE LA PROTEÍNA TRANSFERIDORA DE ÉSTERES DEL COLESTEROL (CETP) INTERVIENEN EN LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL HDL

<sup>1</sup>M. Junyent, <sup>1</sup>Y.C. Lee, <sup>2</sup>D.K. Arnett, <sup>3</sup>M.Y. Tsai, <sup>2</sup>E.K. Kabagambe, <sup>4</sup>R.J. Straka, <sup>5</sup>M. Province, <sup>6</sup>P. An, <sup>1</sup>C.Q. Lai, <sup>1</sup>L.D. Parnell, <sup>1</sup>J. Shen, <sup>5</sup>I. Borecki y <sup>1</sup>J.M. Ordovas

<sup>1</sup>Nutrition and Genomics Laboratory, JM-USDA-HNRCA at Tufts University, Boston, MA; <sup>2</sup>Department of Epidemiology, School of Public Health, and Clinical Nutrition Research Center, University of Alabama at Birmingham, AL; <sup>3</sup>Laboratory of Medicine and Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, MN; <sup>4</sup>Department of Experimental and Clinical Pharmacology, College of Pharmacy University of Minnesota, Minneapolis, MN; <sup>5</sup>Division of Biostatistics, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO; <sup>6</sup>Department of Genetics, Division of Statistical Genomics, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.

**Objetivo.** Aunque el polimorfismo rs11774572 se encuentra localizado en el cromosoma 8p23, región relacionada con el metabolismo lipídico, se desconoce el gen responsable y el mecanismo implicado en su regulación. Dado que el polimorfismo TAIQIB del gen de la proteína transferidora de ésteres del colesterol (CETP) es uno de los mayores reguladores de los ni-

	TERCIL 1 (0,9-14,8) µg/dl		TERCIL 2 (14,9-32,9) µg/dl		TERCIL 3 (33,1-302,5) µg/dl	
	RR n = 85	RK/KK n = 99	RR n = 84	RK/KK n = 98	RR n = 83	RK/KK n = 101
CT	181,3±22,5	183,5±23,7	184,0±29,4	181,6±25,8	180,1±30,4	186,6±25,8
CHDL	58,0±11,9	62,6±13,1*	60,3±13,5	59,5±13,8	58,7±15,1	59,7±11,5
APOAI	135,6±14,8	142,3±19,3**	139,4±20,1	138,0±20,0	136,8±21,2	139,1±17,1
CLDL	107,9±24,2	106,9±23,8	109,8±26,4	108,8±25,5	106,0±28,5	112,8±24,8
APOB	69,0±13,8	69,0±13,1	69,8±15,0	68,8±14,1	67,5±15,2	70,5±14,2
TG	75,2±37,5	70,1±23,6	69,4±23,1	67,1±21,3	76,9±26,5	70,7±22,1

Valores expresados en mg/dl t-test: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01

veles de HDL, el objetivo del estudio fue estudiar la posible asociación entre ambos polimorfismos en relación con los niveles lipídicos, en una población blanca Norte-Americana.

**Métodos.** Los polimorfismos TaqIB del gen CETP y rs11774572 fueron genotipados en 1002 sujetos (482 varones y 520 mujeres) que participaron en el estudio GOLDN (*Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network*). El perfil lipídico se determinó mediante los procedimientos habituales. El genotipado se realizó mediante el empleo de ensayos TaqMan.

**Resultados.** La interacción entre los polimorfismos rs11774572 y TaqIB del gen de la CETP para la determinación de los niveles de HDL fue significativa ( $P = 0,001$ ). Los valores de HDL ajustados por las variables edad, sexo, enfermedad coronaria, diabetes, hábitos tóxicos, ejercicio físico y tratamientos previos, eran superiores en los homocigotos para el alelo T del polimorfismo rs11774572, sólo si eran portadores del alelo B2 del gen de la CETP (51 vs 47, mg/dL;  $P < 0,001$ ). En cambio, los valores ajustados de HDL eran inferiores en los sujetos TT con el genotipo B1/B1 del gen de la CETP (44 vs 46, mg/dL;  $P = 0,138$ ).

**Conclusión.** La interacción entre ambos polimorfismos para los niveles de HDL sugiere que el gen responsable del polimorfismo rs11774572 puede estar implicado en la misma ruta metabólica que el gen de la CETP. Es necesaria la replicación de nuestros resultados en otras poblaciones.

#### OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO DE CRIBADO DE MUTACIONES EN EL GEN PCSK9

<sup>1</sup>A.L. García-Otín, <sup>2</sup>M. Strunk, <sup>4</sup>M. Pueyo García, <sup>1</sup>M. Solanas Barca, <sup>1</sup>A. Cenarro Lagunas, <sup>1,3</sup>E. Jarauta Simón, <sup>4</sup>M. Poció Mieras<sup>d</sup> y <sup>1,3</sup>F. Civeira Murillo

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS). Zaragoza. <sup>2</sup>UATI de Genómica. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS). Zaragoza. <sup>3</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.

**Introducción:** Las Hipercolesterolemias Autosómicas Dominantes (HAD) están causadas principalmente por defectos en los genes LDLR, APOB y PCSK9, siendo éste último el que más recientemente se ha descrito como causante de la enfermedad y mostrando variantes asociadas a muy bajas concentraciones de colesterol. Hasta el momento han sido descritas muy pocas mutaciones en PCSK9 causantes de HAD y constituye un claro gen candidato cuando se han excluido defectos en LDLR y APOB.

**Objetivo:** Desarrollar una técnica de cribado que permita la detección rápida de variantes génicas de PCSK9 susceptibles de un análisis específico posterior mediante secuenciación de DNA.

**Metodología:** Se utilizó la técnica de HPLC desnaturizante (dHPLC), basada en cromatografía de fase reversa a alta presión, que es capaz de distinguir heterodúplex de DNA en condiciones parcialmente desnaturizantes. Para ello se diseñaron 12 amplificaciones por PCR delimitando las regiones codificantes del gen PCSK9 y zonas intrónicas próximas a los nexos exón-intrón de forma que todas compartieran unas condiciones de reacción únicas. Se utilizó el programa Navigator (Transgenomics) para calcular la serie de temperaturas de análisis adecuadas para cada fragmento amplificado y se optimizó el método con muestras reales en un equipo WAVE 3500HT (Transgenomics).

**Resultados:** Se lograron optimizar unas condiciones de PCR

adecuadas para amplificar de forma simultánea las regiones codificantes de PCSK9 y se obtuvieron cromatogramas útiles en todas las condiciones analizadas. Se observaron diferencias de patrón entre cromatogramas para distintas muestras que son portadoras de polimorfismos comunes, lo cual valida la técnica empleada como capaz de detectar diferencias a nivel genómico en el gen PCSK9.

**Conclusiones:** Se ha puesto a punto un método de cribado de mutaciones en el gen PCSK9 que permite el análisis completo de 8 muestras en 48 horas. La metodología está disponible para ser aplicada a grandes series de muestras de pacientes con HAD no dependiente de los genes LDLR o APOB.

#### POLIMORFISMO C-514T DEL GEN DE LA LIPASA HEPÁTICA, DIETA Y NIVELES PLASMÁTICOS DE C-HDL EN POBLACIÓN INFANTIL

P. Riestra, L. López-Simón, S. Schoppen, A. García-Anguita, I. de Oya, \*M.A. Lasunción, M. de Oya, y C. Garcés

Laboratorio de Lípidos, Fundación Jiménez Díaz, Madrid. \*Servicio de Bioquímica-Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Madrid

La lipasa hepática (LIPC), es una enzima lipolítica que desempeña un papel fundamental en el transporte reverso de colesterol. El polimorfismo (C-514T) situado en la región promotora del gen de la LIPC se relaciona con niveles más elevados de C-HDL y Apo AI, sin embargo se ha observado que la dieta modula dicha asociación.

**Objetivo:** Analizar la influencia del polimorfismo C-514T sobre los niveles plasmáticos de lípidos en función de la ingesta dietética en población de edad prepuberal.

**Métodos:** La población de estudio la constituyen 1.279 niños (636 niños y 637 niñas) de 6 a 8 años, integrantes del estudio Cuatro Provincias. El polimorfismo C-514T se analizó mediante amplificación por PCR y análisis de restricción con la enzima Hsp 92 II. La dieta se analizó a través de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA).

**Resultados:** El 60,6% de los niños eran homocigotos no mutados (CC), el 35,7% eran heterocigotos (CT) y el 3,7% homocigotos para la mutación (TT). Al analizar el efecto del polimorfismo sobre los niveles de lípidos en función de los terciles de ingesta de grasa, observamos que los niveles de Apo AI fueron significativamente más altos en portadores del alelo mutado (T) que en los no portadores en los terciles medio y alto de ingesta de grasa, pero no en el tercil bajo (tabla en página siguiente). Los niveles de C-HDL fueron significativamente más elevados en portadores del alelo T en el tercil alto (tabla). Así mismo los niveles de Apo AI en niños portadores del alelo T eran significativamente más elevados en el tercil 3 de consumo de grasa saturada y monoinsaturada.

**Conclusión:** Nuestros datos indican que el consumo de grasa de la dieta condiciona la asociación del polimorfismo C-514T con niveles elevados de C-HDL y Apo AI en la edad prepuberal.

#### PRODUCCIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA APO AI ZARAGOZA (L144R) RECOMBINANTE PARA SU CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

<sup>1,2</sup>S. Fiddyment Puertas, <sup>2</sup>M. Poció Mieras y <sup>1</sup>A.L. García-Otín

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS). Zaragoza. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.

**Introducción:** La apolipoproteína AI (ApoAI) es el principal componente de las partículas HDL donde ejerce funciones es-

	TERCIL 1		TERCIL 2		TERCIL 3	
	CC n = 208	CT/TT n = 135	CC = 212	CT/TT n = 133	CC n = 213	CT/TT n = 131
CT	185,2±26,8	183,3±26,7	183,3±29,5	182,8±25,7	180,1±27,2	185,3±27,6
C-HDL	57,6±13,2	58,4±12,6	58,7±14,2	61,2±13,1	58,4±12,0	61,3±14,9*
APOAI	134,9±20,6	136,4±19,6	135,7±18,6	140,4±17,5*	136,1±19,9	141,9±18,0**
C-LDL	113,9±25,7	110,1±25,3	109,5±28,3	106,9±26,9	106,9±25,9	110,1±25,5
APOB	73,0±14,1	70,2±15,2	71,4±14,8	69,2±14,3	68,9±14,7	70,5±14,7
TG	72,9±21,3	75,7±29,7	74,9±26,5	72,8±23,8	73,6±23,0	68,9±18,0*

Valores expresados en mg/dl t-Test: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01

estructurales y como cofactor de enzimas como LCAT y activador de procesos de eflujo de colesterol. Nuestro grupo descubrió la variante de ApoAI L144R, denominada apolipoproteína AI-Zaragoza (ApoAI-Z), que se asocia a valores muy bajos de colesterol HDL en sujetos que paradójicamente parecen estar protegidos frente a enfermedad cardiovascular. La causa de esta cardioprotección puede ser debida a un aumento del catabolismo de la variante ApoAI-Z que podría dar lugar a un transporte reverso de colesterol muy eficaz, aunque no se han acometido estudios en mayor profundidad para elucidar los efectos de la mutación L144R.

**Objetivo:** Obtener un sistema de expresión y purificación de ApoAI-silvestre y ApoAI-Z que permita producir ambas proteínas en cantidad y pureza adecuadas para realizar ensayos de caracterización estructural y funcional.

**Metodología:** Se utilizó como material de partida un clon de cDNA de ApoAI y se amplificó mediante PCR de alta fidelidad la secuencia correspondiente al péptido maduro de ApoAI introduciendo sitios adecuados en los oligonucleótidos cebadores para el posterior clonaje en el vector de expresión. Se introdujo el fragmento de DNA amplificado en el plásmido pET45 que añade una cola 6xHis en el extremo N-terminal de la proteína a expresar y se realizó mutagenesis dirigida para introducir la mutación L144R de la variante ApoAI-Z. La expresión de proteína recombinante fue inducida con IPTG en cultivos de E.coli BL21(DE3) y se utilizó un protocolo no desnaturizante para purificar la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel.

**Resultados:** Las secuencias de ApoAI clonada en pET45 y de ApoAI-Z obtenida tras mutagenesis dirigida se comprobaron mediante secuenciación de DNA. El resultado de la expresión y de la purificación fue observado en gel de poliacrilamida y confirmado mediante Western-blot. El rendimiento final del cultivo fue superior a 20 mg de proteína purificada por litro de cultivo.

**Conclusiones:** Mediante la metodología adecuada y las modificaciones relevantes se ha conseguido un buen sistema de expresión y purificación para ApoAI y ApoAI-Z. A partir de esto se puede proceder a la producción continuada de la proteína recombinante necesaria para su posterior caracterización estructural y funcional.

### VARIACIONES EN EL GEN DE LA ADIPONECTINA MODULAN LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA AL INTERACCIONAR CON LA GRASA DE LA ALIMENTACIÓN EN HOMBRES SANOS

<sup>1</sup>P. Pérez Martínez, <sup>1</sup>C. Cruz Teno, <sup>1</sup>F. Fuentes, <sup>1</sup>C. Marín, <sup>1</sup>E. Galán, <sup>1</sup>J. Criado, <sup>2</sup>J.M. Ordovás, <sup>1</sup>J. López Miranda y <sup>1</sup>F. Pérez Jiménez

<sup>1</sup>Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Reina Sofía. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN). Córdoba.

<sup>2</sup>Nutrition and Genomics Laboratory, J.M.-US Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, MA, USA

**Objetivo:** Polimorfismos (SNPs) en el gen de la adiponectina (adipoQ) (-11391 G> A, -11377 C> G, 45 T> G and 276 G> T) han sido previamente asociados con la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y con la resistencia a la insulina. Nuestro objetivo fue estudiar si dichos SNPs influyen sobre la sensibilidad a la insulina, en función del tipo de alimentación ingerida.

**Métodos:** Se seleccionaron 30 hombres y 29 mujeres, que recibieron tres tipos distintos de alimentación, en periodos de 4 semanas cada uno. Comenzaron con una fase rica en grasa saturada (SAT) (38% grasa, 20% SAT) y, seguidamente, se les administró de forma aleatorizada y cruzada una dieta rica en hidratos de carbono (CHO) (30% grasa, < 10% SAT, 55% hidratos de carbono) y una dieta mediterránea, rica en aceite de oliva (MONO) (38% grasa, 22% MONO). Al final de cada periodo se determinó la sensibilidad a la insulina mediante el test de supresión con somatostatina, determinando la glucosa media en la fase de equilibrio, como medida directa de la sensibilidad periférica a la insulina y además se determinaron las concentraciones plasmáticas de adiponectina.

**Resultados:** Los hombres homocigotos C/C para el locus -11377 C> G presentaron un descenso en los niveles de glucemia media, en la fase de equilibrio, tras sustituir la dieta SAT (8,95±0,6 mmol/L), con respecto a la dieta CHO (6,35±0,38 mmol/L) y la dieta MONO (6,04±0,31 mmol/L) comparados con los portadores del alelo minoritario G (SAT 6,65±0,4, CHO 5,83±0,3 y MONO 6,45±0,4) (P interacción gen-dieta = 0,016). Por el contrario dicho efecto no se observó en las mujeres. Además, los hombres con el genotipo C/C presentaron menores concentraciones plasmáticas de adiponectina comparado con las mujeres C/C, independientemente de las diferentes dietas. No se observaron diferencias asociadas al resto de los SNPs (-11426 A> G, 45 T> G, 276 G> T).

**Conclusiones:** los hombres homocigotos C/C para el locus -11377 C> G del gen de la adipoQ, presentan una menor resistencia a la insulina tras el consumo de las dietas MONO y CHO comparados con la dieta SAT. Así, la identificación y caracterización de variantes genéticas que se relacionen con una respuesta diferente a la dieta permitirán generar recomendaciones específicas para el óptimo beneficio de cada individuo.