

## Genética

### ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES DEL GEN USF1 CON HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

I. de Castro<sup>1</sup>, P. Mozas<sup>1</sup>, M. Cofán<sup>2</sup>, M. Junyet<sup>2</sup>, C. Gonzalvo<sup>3</sup>, E. Jarauta<sup>3</sup>, E. Ros<sup>2</sup>, M. Pocoví<sup>1</sup> y F. Civeira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, biología Molecular y celular. Universidad de Zaragoza. <sup>2</sup>Unidad de Lípidos, IDIBAPS, Hospital Clínico de Barcelona. <sup>3</sup>Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza.

La hiperlipemia familiar combinada (HFC) es una dislipemia que cursa con concentraciones elevadas de colesterol, triglicéridos, y, muy frecuentemente, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial y obesidad. Recientemente Pajukanta *et al.* (Nat Genet 2004;36:371) identificaron en familias finlandesas un locus en el cromosoma 1q21-23 ligado a HFC. Posteriormente encontraron un gen en este locus, que codifica para el factor de transcripción USF1, asociado con HFC. Analizaron varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en dicho gen, observando que usf1s1 (exón 11) y usf1s2 (intrón 7), mostraban evidencia de ligamiento con HFC y con niveles de triglicéridos elevados, concluyendo que el factor de transcripción USF1 contribuye al complejo fenotipo de la enfermedad. Con el objeto de conocer si existe esta asociación en sujetos afectados de HFC en población española, hemos analizado los SNPs rs3737787 (exón 11), rs2073658 (intrón 7) del gen USF1 en 90 recién nacidos (RN) consecutivos y en 57 sujetos afectados de HFC, mediante la técnica de "minisequencing". Para ello se utilizaron sondas frías de 18-25 pb que hibridan en la zona adyacente a la posición polimórfica y la química (MegaBACE SNUPe Genotyping Kit) y la tecnología (secuenciador automático MegaBACE 500<sup>TM</sup> y programa SNP Profiler<sup>TM</sup>) de GEHealthcare®. Nuestros resultados indican que el SNP 5606G>A rs2073658 presenta una frecuencia mayor en sujetos con HFC que en RN: frecuencia alélica A 0,362 vs 0,232 respectivamente ( $p < 0,01$ ) (I.C. 95% 0,220; 0,503). La frecuencia alélica del SNP 6845C>T rs3737787 también muestra un incremento en población afecta de HFC en comparación con RN: frecuencia alélica T 0,302 vs 0,232 respectivamente ( $p < 0,05$ ) (I.C. 95% 0,209; 0,394). Por otra parte se observa variación en la distribución genotípica, incrementando el número de heterocigotos de ambos polimorfismos en población afecta de HFC en relación con la población de RN, con niveles de significación  $p < 0,001$  y  $p = 0,01$  respectivamente. Nuestros resultados demuestran que el gen USF1 presenta una asociación con el fenotipo de HFC en población española, confirmando datos previos en población finlandesa.

### ASOCIACIÓN ENTRE EL GEN DE LA CELLULAR RETINOIC ACID BINDING PROTEIN (CRABP2) Y ELEVADOS NIVELES DE COLESTEROL LDL

J. Salazar<sup>a</sup>, M. Guardiola<sup>a</sup>, R. Ferré<sup>a</sup>, B. Coll<sup>a</sup>, C. Alonso-Villaverde<sup>a</sup>, B.M. Winklhofer-Roob<sup>b</sup>, E. Rock<sup>c</sup>, J.D. Fernández-Ballart<sup>a</sup>, F. Civeira<sup>d</sup>, M. Pocoví<sup>e</sup>, L. Masana<sup>a</sup> y J. Ribalta<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut de Recerca en Ciències de la Salut, Hospital Universitari Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. <sup>b</sup>Human Nutrition & Metabolism Research and Training Center, Institute of Molecular Biosciences, Karl-Franzens University, Graz, Austria.

<sup>c</sup>UMMM, INRA-Theix, St. Genes Champanelle, France. <sup>d</sup>Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain. <sup>e</sup>Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza, Spain.

**Objetivos:** La vía de señalización del ácido retinoico media la transcripción inducida por ligando de genes del metabolismo lipídico a través de los receptores nucleares, RXR y RAR, y del coactivador CRABP-II. En el mismo sentido se ha establecido una asociación entre esta vía de señalización y alteraciones lipídicas en trastornos como la hiperlipemia familiar combinada y la hiperlipemia inducida por el tratamiento con inhibidores de la proteasa (IP) en pacientes VIH. Nuestro objetivo ha sido comprobar la hipótesis según la cual el gen CRABP2 estaría involucrado en la regulación del metabolismo lipídico.

**Población y métodos:** Se ha realizado un estudio de asociación del polimorfismo -394T>C del promotor de CRABP2 en 3 poblaciones independientes (299 individuos sanos, 181 pacientes VIH y 151 pacientes con hipercolesterolemia familiar (HF)). Todas las analíticas se determinaron en ausencia de tratamiento hipolipemiente. Se realizó ANOVA ajustando por edad, IMC, género, y uso de IP cuando fue necesario.

**Resultados:** La frecuencia del alelo C fue del 0.03 en los 3 grupos estudiados. Entre los individuos sanos los portadores del alelo C presentaban un aumento en la concentración de colesterol total del 9% ( $p = 0,027$ ) y de cLDL del 13% ( $p = 0,020$ ). En los pacientes VIH se realizó un análisis multivariante de 4 medidas tomadas a lo largo de un año, y se observó que los valores de cLDL eran significativamente mayores en los portadores del alelo C ( $p = 0,001$ ), y que éstos oscilaban entre el 10 y el 31%. Asimismo, los pacientes HF portadores del alelo C presentaban un aumento significativo en la sobreconcentración de cLDL del 16% ( $p = 0,038$ ). El alelo C estaba sobrerrepresentado en individuos hipercolesterolémicos ( $p = 0,001$ ).

**Conclusión:** Nuestros resultados muestran que el gen CRABP2, involucrado en la vía de señalización del ácido retinoico, está asociado con elevadas concentraciones de cLDL en plasma.

### DETERMINACIÓN RÁPIDA Y A GRAN ESCALA DEL GENOTIPO Y DE DOS VARIANTES RARAS DE LA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE) MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN

M. Mallén, R. Langarita y M. Pocoví

Grupo de Lípidos. Departamento Bioquímica. Universidad de Zaragoza

La apolipoproteína E (apoE) (OMIM 107741) es una proteína plasmática fundamental en el metabolismo lipídico y en el transporte de colesterol que forma parte de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y está implicada en su absorción hepática. Existen tres isoformas comunes de la proteína: apoE2, apoE3 y apoE4, determinadas por dos polimorfismos en el gen APOE que definen tres genotipos:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ , los cuales son

uno de los factores genéticos más importantes de la variabilidad de concentración de colesterol LDL en población general. La isoforma apoE2 se ha relacionado con hiperlipoproteíemia tipo III y la isoforma apoE4 se ha relacionado con arteriosclerosis, Alzheimer, función cognitiva disminuida y crecimiento reducido de las neuritas. En población española se ha descrito la variante R136S (apoE2-Christchurch) que causa hiperlipoproteíemia tipo III y la variante ?149L que cursa con hiperlipidemia y ocasionalmente esplenomegalia. La pirosecuenciación es un método de análisis genético que se basa en el principio de secuenciación por síntesis. Mediante una reacción multienzimática que incluye luciferasa, la incorporación de deoxinucleótidos (dNTPs) en la síntesis de DNA resulta en una señal luminosa, que además es proporcional a la cantidad de dNTPs incorporados. Empleando una sonda específica y una secuencia definida de inyección de dNTPs a la reacción puede determinarse la secuencia de DNA analizando la señal luminosa obtenida. Además la información que se obtiene es tanto cualitativa como cuantitativa. Para determinar los dos polimorfismos que definen el genotipo de APOE (C112R y R158C) y las variantes R136S y ?149L, se diseñó una amplificación de 305pb en el exón 4 del gen APOE que comprende todas las variantes a estudiar y cuatro sondas para cada una de las cuatro variantes. Se obtuvo DNA genómico a partir de células bucales mediante el kit de extracción *BuccalAmp* (Epicentre Biotechnologies). Se amplificó por PCR el fragmento indicado el oligonucleótido de la hebra reversa marcado con biotina en 5'. Se purificó la hebra reversa del producto de PCR marcada con biotina con estreptavidina-sepharosa mediante filtración por vacío. La hebra purificada se incubó con las sondas correspondientes y se llevó a cabo la reacción en el pirosecuenciador *PSQ96MA* (Biotage AB). Los resultados se analizaron automáticamente con el paquete informático incorporado. En conclusión, se ha puesto a punto una metodología que permite determinar el genotipo y dos variantes raras de apoE de una manera fiable, rápida, económica, fácilmente automatizable y a gran escala. Además el empleo de células bucales como material de partida facilita enormemente la toma de muestras y su transporte, permitiendo planificar estudios en grandes poblaciones.

#### EFFECTO COMPARATIVO DE VARIACIONES EN EL GEN DE LA APOLIPOPROTEÍNA B SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN HUMANO Y PORCINO

F. Francés<sup>1</sup>, R. Pena<sup>2</sup>, O. Portolés<sup>1</sup>, A. Cánovas<sup>2</sup>, J.V. Sorlí<sup>1</sup>, R. Quintanilla<sup>2</sup>, D. Corella<sup>1</sup> y J.I. González<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universitat de València. <sup>2</sup>Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries IRTA Lleida.

Tanto en humano como en porcino, mutaciones poco frecuentes en el gen de la apolipoproteína B (apoB) se han asociado con concentraciones elevadas de colesterol total (CT), del transportador por lipoproteínas de baja densidad (cLDL), y con mayor riesgo de cardiopatía isquémica precoz, con una clínica prácticamente indistinguible de la hipercolesterolemia familiar producida por mutaciones en el receptor de las LDL. Además de estas mutaciones en el gen APOB, existen polimorfismos más frecuentes que pueden asociarse a distintas alteraciones del metabolismo lipídico debidas a la influencia de los subsiguientes defectos de unión de la apolipoproteína B100. Nuestro objetivo ha sido estudiar comparativamente en humano y porcino la influencia de polimorfismos comunes en el gen APOB sobre el metabolismo lipídico en población general. Se estudiaron 403 cerdos, raza Duroc, nacidos entre

agosto y septiembre de 2003, trasladados al *Centre de Control Porci* (CCP-IRTA), donde todos recibieron la misma alimentación. Se analizaron los lípidos a los 55 días del nacimiento. Se genotiparon para el denominado alelo LPB5, consistente en el haplotipo Asp3164/Ala/3447. Paralelamente, se seleccionaron de manera aleatoria 532 individuos (161 hombres y 371 mujeres) de población general de Valencia. La edad media fue de 48 años y el IMC de 27 Kg/m<sup>2</sup>. Se aisló el ADN y se analizó el polimorfismo Arg3611Gln en el gen de la APOB. En humano, la prevalencia de Arg/Arg fue 75,4%; Arg/Gln 23%; y Gln/Gln 1%. Aunque las medias de CT, cLDL y triglicéridos (TG) fueron mayores en portadores de la mutación, no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en la población (para CT: Arg/Arg 212 ± 38, Arg/Gln 215 ± 40, Gln/Gln 219 ± 37 mg/dL; para LDL: Arg/Arg 138 ± 36, Arg/Gln 141 ± 67, Gln/Gln 140 ± 37 mg/dL; TG: Arg/Arg 119 ± 68; Arg/Gln 131 ± 73, Gln/Gln 141 ± 67 mg/dL). Al agrupar en portadores y no portadores y estratificar por género se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de TG, que fue mayor en mujeres portadoras del alelo Gln (122 ± 64 vs 109 ± 63; p = 0,04). En porcino, la prevalencia del haplotipo salvaje fue del 80% (n = 323), 19,8% para el heterocigoto mutado (alelo LPB5) (n = 80); y 0,2% (n = 1) para el homocigoto mutado. Aunque ligeramente más elevadas, no hubo diferencias estadísticamente significativas en las medias de lípidos plasmáticos al comparar portadores del alelo LPB5 frente a los demás, ni en el CT (84 ± 30 vs 81 ± 25); ni en el cLDL (40 ± 19 vs 42 ± 17) ni para TG (50 ± 22 mg/dL vs 43 ± 18 mg/dL). Estos resultados no modificaron su significación estadística al controlar por posibles variables de confusión. En conclusión, tanto en humano como en porcino los polimorfismos analizados en la zona homóloga del epítipo del gen APOB, que interacciona con el receptor de las LDL, tienen un impacto modesto en las concentraciones de CT y cLDL, siendo ligeramente más acusados en TG en humanos.

#### EL POLIMORFISMO APO A2 -265T/C REGULA PARCIALMENTE LA RESPUESTA POSTPRANDIAL TRAS UNA COMIDA RICA EN GRASA SATURADA

J. Delgado-Lista<sup>1,2</sup>, P. Pérez-Martínez<sup>1</sup>, L. Parnell<sup>3</sup>, R. Moreno<sup>1</sup>, J.M. García<sup>1</sup>, F. Fuentes<sup>1</sup>, J.M. Ordovas<sup>3</sup>, F. Pérez-Jiménez<sup>1</sup> y J. López-Miranda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. <sup>2</sup>Investigador en Formación FIS. <sup>3</sup>Nutrition and Genomics Lab, HNRCA at Tufts University, Boston,

**Introducción:** La apoproteína A2 es un componente importante de la estructura de las partículas HDL. Sin embargo, su papel en el metabolismo lipídico no está bien establecido, aunque podría antagonizar el efecto de la Apo A-I. Se ha indicado también que el polimorfismo -265T/C del gen del promotor de la Apo A2 influye en la lipemia postprandial, aunque este dato no ha sido confirmado.

**Objetivo:** Estudiar en cien hombres jóvenes y sanos el periodo postprandial tras una comida rica en grasa saturada, y su relación con el polimorfismo Apo A2 -265T/C.

**Material y métodos:** Los participantes realizaron un desayuno conteniendo un 60% de grasa (SAT: 35%; MONO: 19%; PUFA: 7%). Se evaluó la lipemia postprandial, midiendo las distintas fracciones lipídicas en las horas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8.5 y 11. Se utilizó PCR a tiempo real, usando sondas Taqman para la determinación genética de Apo A2 -265T/C. Para valorar las diferencias en la respuesta postprandial entre los distintos genotipos, se empleó la prueba de ANOVA para medidas repetidas.

**Resultados:** La frecuencia genotípica del estudio fue TT: 41; TC:47; CC:12. Estratificamos la muestra en dos grupos: homocigotos para el alelo más frecuente (TT), y portadores del alelo minoritario (TC/CC). Las personas TT presentaron mayores cifras basales de triglicéridos (89,3 mg/dl VS 73,2,  $p < 0,05$ ) y mayor respuesta postprandial de triglicéridos ( $p = 0,037$ ). En la comparación por pares (t-student para medidas independientes), los TT (homocigotos para el alelo más frecuente) mostraron una mayor concentración de triglicéridos que los TC/CC en las tres primeras horas. No existieron diferencias significativas en colesterol total, HDL-c, LDL-c, Apo A-I ni Apo B durante el postprandio.

**Conclusiones:** El polimorfismo Apo A2 -265 T/C influye en el metabolismo postprandial de la grasa, presentando los portadores de la mutación (TC/CC) una menor elevación de triglicéridos que los homocigotos para el alelo más frecuente (TT). Este hallazgo puede ayudar a interpretar el papel de la Apo A2 en el metabolismo lipídico.

### EL POLIMORFISMO -765 G>C EN EL GEN DE LA CICLOOXIGENASA-2 SE ASOCIA CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN EN EL ESTUDIO PREDIMED

P. Carrasco<sup>1</sup>, F. Francés<sup>1</sup>, C. Ortega<sup>1</sup>, J.V. Sorlí<sup>1</sup>, O. Portoles<sup>1</sup>, E. Sanchis<sup>1</sup>, J. Salas<sup>2</sup>, R. Estruch<sup>3</sup> y D. Corella<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Unidad de Nutrición Humana. Universitat Rovira i Virgili.

<sup>3</sup>Servei Med. Interna. Hospital Clínic, Barcelona.

La ciclooxigenasa (COX) es clave en el metabolismo de los eicosanoides. La isoforma 2 (COX-2) está aumentada en inflamación crónica. El polimorfismo -765G/C en el gen de la COX-2 se ha mostrado modulador de la respuesta inflamatoria. Nuestro objetivo es valorar el impacto de dicho polimorfismo sobre marcadores de inflamación en el estudio PREDIMED (PREvención con Dieta MEDiterránea), ensayo randomizado y multicéntrico para conocer los efectos de la dieta mediterránea en prevención primaria cardiovascular. Los participantes (hombres entre 55 y 80 años y mujeres entre 60 y 80 años con diabetes o reunieran dos o más de los siguientes factores de riesgo vascular: tabaquismo, hipertensión arterial, dislipemias, sobrepeso o antecedentes familiares), se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos: dieta mediterránea+frutos secos, dieta mediterránea+aceite de oliva virgen y dieta baja en grasa (control). Se incluyeron 120 participantes del nodo de Valencia, con mediciones de marcadores de inflamación basales y tras 3 meses de intervención. Se determinaron las concentraciones de: molécula de adhesión intracelular (ICAM), molécula de adhesión vascular (VCAM), proteína C reactiva ultrasensible (PCR) e interleucina-6 (IL-6); así como el polimorfismo -765G/C. Su prevalencia fue: 62%GG, 36%GC y 3%CC (en equilibrio Hardy-Weinberg). Se agruparon los portadores del alelo C y se compararon con los GG. Se observaron diferencias de medias ( $P = 0,040$ ) a nivel basal en las concentraciones de ICAM entre homocigotos GG ( $285 \pm 150$  ng/ml) y portadores del alelo C ( $225 \pm 98$  ng/ml); también se observaron diferencias significativas ( $P = 0,006$ ) en las concentraciones de IL-6 entre homocigotos GG ( $3,7 \pm 1,9$  pg/ml) y portadores del alelo C ( $2,7 \pm 1,3$  pg/ml). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,169$ ) en las concentraciones de VCAM ( $1053 \pm 409$  ng/ml para homocigotos GG y  $1161 \pm 404$  ng/ml para portadores de C) ni en las concentraciones de PCR ( $3,3 \pm 3,5$  g/ml para homocigotos GG y  $2,7 \pm 1,8$  g/ml para portadores de C;  $P = 0,472$ ). Tras 3 meses de intervención dietética, se observaron reducciones significativas ( $P < 0,05$ ) en las concentraciones de IL-6, ICAM y VCAM en los grupos con dieta mediterránea, y

no así en el grupo control. La influencia del genotipo permaneció tras la intervención ya que, a pesar de la reducción observada, se mantuvieron los valores más altos en los GG en comparación con los portadores C, tanto para ICAM ( $253 \pm 124$  vs.  $173 \pm 80$  ng/ml;  $P = 0,006$ ) como para IL-6 ( $3,2 \pm 1,5$  vs.  $2,4 \pm 1,2$  pg/ml;  $P = 0,022$ );  $P$  para la interacción genotipo\*intervención = 0,7 y 0,6 para ICAM e IL-6, respectivamente. En conclusión, el polimorfismo -765G/C en COX-2 se asocia con menores concentraciones de los marcadores de inflamación ICAM e IL-6 en el estudio PREDIMED, sin observarse una interacción significativa con la intervención dietética.

### EL SNP 5435A>G DEL GEN PPAR-ALFA MODULA EL METABOLISMO POSTPRANDIAL DE LOS REMANENTES DE LOS QUILOMICRONES

M.J. Gómez, Y. Jiménez-Gómez, P. Gómez, F. Fuentes, F. Martín, R.A. Fernández de la Puebla, F. López-Segura, F. Pérez-Jiménez y J. López-Miranda

Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

**Introducción:** Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) son una familia de factores de transcripción nucleares. Uno de sus miembros, PPAR-alfa, está involucrado en el metabolismo lipídico y de la glucosa, pudiendo influir en la expresión de la dislipidemia, arteriosclerosis, obesidad, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2. Hemos estudiado si el polimorfismo (SNP) 5435A>G en el gen del PPAR-alfa influye en el metabolismo lipoprotéico postprandial.

**Metodología:** A 51 voluntarios (20 AA, 31 AG/GG) normolipémicos y homocigotos para el alelo E3 de la Apo E, se les administró una comida rica en grasa (1 g de grasa/Kg de peso corporal, 60.000 UI de vitamina A y 7 mg de colesterol/Kg de peso) con 60% de calorías como grasas, 15% como proteínas y 25% como hidratos de carbono. Se realizaron extracciones en el tiempo 0 y cada hora, hasta las 11 horas. Se determinaron el colesterol (C) y triglicéridos (TG) plasmáticos, así como el C, TG, y retinil palmitato en las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y remanentes de quilomicrones). Los participantes fueron genotipados para el SNP 5435A>G mediante PCR a tiempo real, usando sondas Taqman.

**Resultados:** Los portadores del alelo G presentaron una menor respuesta postprandial en los niveles de retinil palmitato en los remanentes de quilomicrones, así como en el colesterol y triglicéridos vehiculizados en dichas partículas ( $p < 0,05$ ), en comparación con los participantes homocigotos para el alelo A.

**Conclusión:** Nuestros datos sugieren que el SNP 5435A>G, del gen del PPAR-alfa, puede modular el metabolismo lipídico postprandial.

### ESTUDIO FARMACOGENÓMICO MEDIANTE MICROARRAYS EN MONOCITOS DE PACIENTES CON HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA TRATADOS CON ATORVASTATINA

J. Pou<sup>1</sup>, G. Llaverrías<sup>1</sup>, E. Ros<sup>2</sup>, D. Zambón<sup>2</sup>, J.C. Laguna<sup>1</sup> y M. Alegret<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. <sup>2</sup>Clinica de Lípidos, Servicio de Endocrinología y Nutrición, IDIBAPS, Hospital Clínic, Barcelona.

**Introducción:** La Hiperlipemia Familiar Combinada (HFC) es el tipo más común de hiperlipemia genética. En este estudio, se han utilizado arrays de expresión génica (Human Genome



U133A 2.0, Affymetrix) como herramientas para elucidar las vías fisiopatológicas implicadas en la HFC, y definir mecanismos de acción de fármacos utilizados en su tratamiento.

**Diseño y métodos:** A través de la Clínica de Lípidos del Hospital Clínico de Barcelona, se reclutaron 12 pacientes con HFC de sexo masculino y edad media  $54 \pm 9$  años, y un grupo control (CT) equiparable en sexo y edad. Se obtuvieron muestras de sangre para el aislamiento de monocitos, a partir de los cuales se obtuvo RNA total. Los pacientes del grupo HFC fueron tratados con atorvastatina (40 mg/día) durante un mes, y al final de este período se extrajeron muestras de sangre con idéntica finalidad (Grupo HFC + ATV). Los RNA individuales de 9 pacientes de cada grupo se unieron para formar 3 *pools* de RNA para cada condición destinados a la realización de los arrays (Progenika). Posteriormente se seleccionaron una serie de genes para validación por RT-PCR a tiempo real (PCR tr).

**Resultados:** Se obtuvieron 2 listas de genes diferencialmente expresados, mayoritariamente relacionados con el proceso inflamatorio: a) comparación HFC vs CT: 88 genes (58 reprimidos y 30 inducidos); entre ellos, destacan: myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDNA, *ratio* del array 0.32, *ratio* de PCR tr 0.37), interleukin-1 receptor type 2 (IL1R2, *ratio* del array 0.4, *ratio* de PCR tr 0.36), interleukin-1 receptor accessory protein (*ratio* del array 0.41, *ratio* de PCR tr 0.69), grancalcin (*ratio* del array 0.42, *ratio* de PCR tr 0.57), CD163 (*ratio* del array 0.46, *ratio* de PCR tr 0.45), retinoid X receptor a (*ratio* del array 0.74, *ratio* de PCR tr 0.69) tissue factor pathway inhibitor 2 (*ratio* del array 8.4, *ratio* de PCR tr 6), fibronectina 1 (*ratio* del array 2.49, *ratio* de PCR tr 2.44), syndecan 2 (*ratio* del array 2.35, *ratio* de PCR tr 2.33), histocompatibility complex class II DP beta 1 (*ratio* del array 2.38, *ratio* de PCR tr 1.37), activated leukocyte cell adhesion molecule (*ratio* del array 2.16, *ratio* de PCR tr 2.6), leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains-1 (LRIGL1, *ratio* 2.08 en ambos ensayos), microphthalmia-associated transcription factor (*ratio* del array 1.97, *ratio* de PCR tr 2.43) y TNF receptor superfamily, 25 (DR3, *ratio* del array 1.48, *ratio* de PCR tr 1.74). b) comparación HFC+ATV vs HFC: 44 genes (20 reprimidos y 24 inducidos), entre ellos: LRIG 1 (*ratio* del array 0.64, *ratio* de PCR tr 0.45), DR3 (*ratio* del array 0.72, *ratio* de PCR tr 0.49), CD96 (*ratio* del array 0.67, *ratio* de PCR tr 0.71), translocase of the outer mitochondrial membrane (*ratio* del array 0.69, *ratio* de PCR tr 0.8), nuclear orphan receptor 1 (NOR 1, *ratio* del array 1.70, *ratio* de PCR tr 1.39), IL1R2 y esteroil-CoA desaturasa 4 (SCD4), (*ratio* según análisis por PCR tr: 0.83 y 0.47, respectivamente).

### HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR (HF) EN ASTURIAS: ESTUDIO GENÉTICO

C. Martínez Faedo<sup>1</sup>, L. Cotoval Bellas<sup>1</sup>, P. Gómez Enterría<sup>1</sup>, C. Tuson Rovira<sup>b</sup>, C. Díaz de Greñu<sup>3</sup>, J.A. Alonso Marquiegui<sup>4</sup> y C. Pérez Rodríguez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Central de Asturias, <sup>2</sup>Hospital de Cabuñes, <sup>3</sup>Hospital Valle del Nalón, <sup>4</sup>Hospital Vital Álvarez-Buylla.

**Objetivos:** Conocer el tipo de alteraciones genéticas causantes de HF en nuestro medio.

**Material y métodos:** Entre mayo/05 y febrero/06 se han reclutado 91 casos índices entre los pacientes controlados en las consultas de Endocrinología y Nutrición de nuestra comunidad que tenían diagnóstico clínico de HF para realizar estudio genético mediante la plataforma Lipochip®, que detecta anomalías en el gen que codifica el receptor LDL y en ApoB. El

criterio de inclusión habitual fue la existencia de una puntuación MED-PED igual o superior a 8. Posteriormente se realizó el mismo estudio a 64 sujetos familiares de 26 casos índice.

**Resultados:** Disponemos de resultados de 78 de los 91 pacientes estudiados inicialmente. De ellos el estudio genético ha sido positivo en 54 casos (69,2%) todos ellos con mutaciones en el gen del receptor LDL. En 24 (30,7%) no se ha detectado ninguna mutación. Hemos hallado 16 mutaciones diferentes, tres de ellas constituyen el 72,2% del total y según los datos que manejamos son poco habituales fuera de nuestro ámbito. De los resultados positivos 27 (50%) mostraban la presencia de grandes reordenamientos mientras que en otras series descritas no suelen sobrepasar el 10%. No se observa ninguna diferencia clínica ni analítica a favor de los positivos si no todo lo contrario para xantomas y enfermedad cardiovascular. La edad media era de  $47,2 \pm 15,8$  años en los positivos frente al  $46 \pm 20,17$  años de los negativos, con una puntuación MED-PED de  $12,29 \pm 4,32$  vs  $10,5 \pm 4,59$ ; el LDL<sub>col</sub> inicial era de  $319,07 \pm 74,91$  mg/dl vs  $313,1 \pm 99,71$  mg/dl. Se objetivan xantomas en un 22,2% de los positivos frente a un 41,6% de los negativos. La presencia de enfermedad cardiovascular es de 6 casos (11,1%) en los positivos, y de 9 casos (37,5%) en los negativos. Durante este periodo se produjeron 2 fallecimientos siendo uno de cada grupo.

**Conclusiones:** La presencia de un porcentaje muy elevado de grandes reordenamientos en el gen del R-LDLc es el rasgo más significativo y diferenciador de nuestra población respecto a otras series publicadas. Es importante destacar que el porcentaje de estudios genéticos negativos es similar al descrito en la literatura. Dado que los rasgos fenotípicos sugieren claramente una HF, es necesario investigar la presencia de mutaciones en otros loci.

### IDENTIFICACIÓN DE 13 NUEVOS SITIOS POLIMÓRFICOS EN LA ZONA PROMOTORA DE LOS GENES NPC1L1 Y LXRα

B. Martín<sup>1</sup>, M. Mallén<sup>1</sup>, T. Tejedor<sup>2</sup>, M. Cofan<sup>3</sup>, M. Bulló<sup>4</sup>, J. Salas-Salvadó<sup>4</sup>, E. Ros<sup>3</sup>, M. Pocoví<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. <sup>2</sup>Laboratorio de Citogenética y Genética Molecular. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. <sup>3</sup>Unitat de Lípids. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. Hospital Clínic. Barcelona. <sup>4</sup>Unitat de Nutrició Humana, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de Reus, Universitat Rovira i Virgili, Reus.

La proteína Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) se expresa predominantemente a nivel intestinal y es crítica en la absorción de colesterol. NPC1L1 es la diana terapéutica de la ezetimiba. Los receptores nucleares LXRα y LXRβ son factores de transcripción esenciales para la regulación de la homeostasis del colesterol. Los LXR actúan como sensores de los niveles de colesterol ya que responden a niveles elevados de esteroides y activan un conjunto de genes que modulan el transporte, catabolismo y eliminación del colesterol. Recientemente ha sido identificado el gen NPC1L1 como diana del receptor nuclear LXRα.

**Material y métodos:** Se seleccionaron como zona de estudio 2 Kb de la región 5' del gen NPC1L1 y 3 Kb de la región 5' incluyendo la región de elementos de respuesta para LXRα. Se llevó a cabo una búsqueda en bases de datos para localizar variaciones previamente descritas en las secuencias seleccionadas. Se diseñaron tres amplificaciones para NPC1L1 y seis para LXRα para la determinación de los polimorfismos descritos en estas zonas y de otras posibles variantes no descritas con anterioridad. Se amplificaron por PCR dichos fragmentos

a partir de DNA procedente de 102 pacientes hipercolesterolémicos tipo IIa y se secuenciaron automáticamente en un secuenciador capilar MegaBACE 500 (GE-Healthcare). El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el paquete informático Helix Tree (Golden Helix).

**Resultados:** Se han identificado 5 nuevos SNPs en el gen NPC1L1 y 8 para LXR $\alpha$  cuyas coordenadas y frecuencias alélicas se detallan a continuación: NPC1L1 g.-1.485C> T (0.025), g.-1.425C> G (0.010), g.-982C> G (0.005), g.-292C> T (0.03) g.-18C> A (0.265); LXR $\alpha$  g.-2.711G> A (0.010), g.-1.013G> C (0.005), g.-434C> T (0.020), g.236G> A (0.150) g.399C> A (0.120), g.950A> G (0.005), g.1.000C> T (0.015), g.1.067A> G (0.005) Los estudios de ligamiento realizados demuestran la existencia de desequilibrios de unión entre los polimorfismos g.-1.473T> C, g.-1.128A> G, g.-133A> G para el gen NPC1L1 y en el caso de LXR $\alpha$  el polimorfismo g.-2.855A> G con los polimorfismos g.-1.877T> C, g.399C> A, g.1.124G> A, g.1.233G> A; el polimorfismo g.-2.711G> A con los polimorfismos g.-434C> T y g.1.233G> A; el polimorfismo g.-1.877T> C con los polimorfismos g.-592T> C, g.399C> A, g.1.124 G> A, g.1.233G> A; el polimorfismo g.-592T> C con los polimorfismos g.399C> A, g.950A> G, g.1.124G> A; el polimorfismo g.399C> A y g.1.124G> A y el polimorfismo g.1.067A> G y g.1.233G> A. En conclusión, estos nuevos SNPs y los previamente descritos facilitarán la realización de estudios de asociación y ligamiento con estos genes. Además el establecimiento de los desequilibrios de unión y frecuencias alélicas permitirán la selección de los polimorfismos más informativos de estos genes.

#### IMPACTO DE LOS POLIMORFISMOS -38C>T Y ALA67THR EN EL GEN DE LA PROTEÍNA RELACIONADA CON AGOUTI EN EL RIESGO DE OBESIDAD EN POBLACIÓN MEDITERRÁNEA

J.V. Sorlí<sup>1</sup>, F. Frances<sup>1</sup>, C. Ortega<sup>1</sup>, O. Coltell<sup>2</sup>, D. Godoy<sup>3</sup>, J. Valderrama<sup>1</sup>, J. Yuste<sup>1</sup>, A. Sabater<sup>1</sup>, F. Gimenez<sup>1</sup>, D. Corella<sup>1</sup> y O. Portolés<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento de Lenguajes y Sistemas Informáticos. Universitat Jaume I. c: Servicio de Endocrinología. Hospital General Universitario, Valencia.

La proteína similar a Agouti (AGRP) se ha descrito como un potente efector anabólico de la ingestión de alimentos dando lugar a un aumento del apetito. Su sobreexpresión provoca obesidad, y se encuentra inhibida por el ayuno. En humanos, los polimorfismos -38C/T en el promotor y G199A; (Ala67Thr) en el exon 3 se han relacionado de forma étnico-específica con obesidad, existiendo bastante consistencia en relacionar el alelo 67Thr con menor peso. Nuestro objetivo ha sido estudiar la asociación entre estos polimorfismos y el riesgo de obesidad en población mediterránea española. Se ha realizado un amplio estudio de casos y controles de base poblacional. Se incluyeron 303 obesos, 101 hombres y 202 mujeres, (índice de masa corporal, IMC, mayor de 30 kg/m<sup>2</sup>) y 606 controles (IMC menor de 30 kg/m<sup>2</sup>) apareados por edad y sexo. Se aisló el ADN genómico y se determinaron los polimorfismos -38C>T y Ala67Thr en el gen AGRP. Mediante análisis de regresión logística se estimó el riesgo de obesidad (odds ratio; OR) asociado a estas variantes. La prevalencia de la variante -38C>T en esta población ha sido muy baja (99,3% homocigotos CC y 0,7% heterocigotos CT), sin alcanzar el 1%, por lo que no resulta polimórfica. Estos resultados son consecuentes con los estudios que indican que esta variante tan sólo presenta una elevada frecuencia en la raza negra. Por el contrario, la variante Ala67Thr que no resulta frecuente en afro-americanos, ha

resultado polimórfica en esta población mediterránea. La prevalencia de cada uno de los genotipos ha sido: 90,8% Ala67Ala; 9,1% Ala67Thr y 0,1% Thr67Thr. No hubo diferencias en prevalencia de la variante -38C>T entre obesos y no obesos (0,7% vs 0,8%; P =0,854), aunque su bajísima prevalencia limita el poder estadístico de los resultados. Aunque los portadores del alelo 67Ala fueron más prevalentes en controles (10,1%) que en casos de obesidad (7,6%), las diferencias no alcanzaron la significación estadística. El riesgo de obesidad asociado al polimorfismo Ala67Thr fue OR =0,73 (IC al 95%: 0,43-1,42; P =0,247), por lo que a pesar de mostrar un efecto protector, no alcanzó la significación estadística. Al estratificar según género, el efecto protector fue ligeramente superior en mujeres, pero sin alcanzar tampoco la significación estadística (OR =0,66; P =0,19). Al estudiar la asociación de este polimorfismo con parámetros antropométricos, se observó que los portadores del alelo 67Thr presentaron un menor peso medio (71,4  $\pm$  17kg) que los homocigotos Ala67Ala (76,2  $\pm$  20kg), con diferencias en el límite de la significación estadística (P =0,057). No hubo diferencias en las medias de IMC, perímetro de la cintura o cadera en portadores y no portadores del alelo 67Thr. En conclusión, la variante -38C>T no resulta polimórfica en esta población, mientras que sí lo es la Ala67Thr, cuyo alelo mutado se asocia con menor peso, en el límite de la significación estadística.

#### INTERACCIÓN ENTRE LA INGESTA AGUDA DE GRASA Y LA PRESENCIA DEL POLIMORFISMO -516C/T EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE LA APOB

P. Pérez-Martínez<sup>1</sup>, A. García-Ríos<sup>1</sup>, B. Cortés<sup>1</sup>, C. Marín<sup>1</sup>, F. Fuentes<sup>1</sup>, J. Ruano<sup>1</sup>, J.M. Ordovás<sup>2</sup>, F. Pérez-Jiménez<sup>1</sup> y J. López-Miranda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, España. <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:** Nuestro objetivo fue determinar si la presencia del polimorfismo -516C/T en la región promotora del gen de la APOB podría influir en el metabolismo postprandial.

**Métodos:** se seleccionaron a 47 voluntarios normolipémicos, homocigotos para el alelo E3 de la apoE (30 homocigotos para el genotipo C/C y 17 heterocigotos para el alelo minoritario -516T (C/T). Recibieron una comida grasa (1 g/Kg de peso corporal, 60.000 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, TGs y retinil palmitato en las lipoproteínas ricas en triglicéridos grandes y pequeñas.

**Resultados:** Los portadores del genotipo C/T presentaron mayores concentraciones postprandiales de TGs vehiculizados en las lipoproteínas ricas en triglicéridos pequeñas que los portadores del genotipo C/C (p =0,022). Además, los individuos C/T mostraron mayores concentraciones de TGs plasmáticos durante el periodo postprandial comparados con los sujetos C/C (p =0,039). No se objetivaron diferencias significativas en el resto de los parámetros analizados.

**Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que la presencia del genotipo C/T en el promotor de la APOB se asocia con una mayor respuesta postprandial, lo que podría explicar, al menos en parte, el mayor riesgo cardiovascular asociado al alelo -516T.

### LA DISLIPEMIA ASOCIADA A INHIBIDORES DE LA PROTEASA EN PACIENTES VIH ESTÁ INFLUENCIADA POR EL GEN APOLIPOPROTEÍNA A5

M. Guardiola, R. Ferré, C. Alonso-Villaverde, B. Coll, J. Salazar, L. Masana y J. Ribalta

*Institut de Recerca en Ciències de la Salut, Hospital Universitari Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, Reus.*

**Objetivo:** Dado que la apolipoproteína AV es un elemento clave en la regulación del metabolismo de los triglicéridos, hemos estudiado cómo el gen apolipoproteína A5 (APOA5) modula la dislipemia y el riesgo cardiovascular asociados al tratamiento con inhibidores de la proteasa (IP) en pacientes VIH.

**Métodos:** Hemos estudiado a 235 pacientes VIH de los que disponíamos de determinaciones de lípidos y lipoproteínas plasmáticas durante 5 años de seguimiento clínico y a los que hemos determinado el genotipo -1131T> C del gen APOA5. Del total de 235 pacientes, 148 estaban tratados con IP y disponíamos del registro de dos medidas del grosor de la íntima-media obtenidas con 2 años de diferencia.

**Resultados:** La frecuencia del alelo C fue 0.08. Los dos grupos resultantes de separar a los 148 pacientes tratados con inhibidores de la proteasa según su genotipo eran comparables al inicio del tratamiento, en cuanto a edad, sexo, índice de masa corporal, lípidos y estatus inflamatorio e inmunológico. Los portadores del alelo C presentaban mayores niveles de triglicéridos en plasma después de 1 año de tratamiento (43%,  $p=0.009$ ), 2 años (38%,  $p=0.050$ ), 3 años (44%,  $p=0.013$ ), 4 años (45%, NS) y 5 años (150%, NS). Encontramos el mismo efecto sobre los niveles de colesterol en plasma después de 1 año (16%,  $p=0.006$ ), 2 años (21%,  $p=0.001$ ), 3 años (20%,  $p=0.009$ ), 4 años (19%, NS) y 5 años (29%, NS) de tratamiento. Los niveles de colesterol-HDL tendían a disminuir con el tiempo y a los 3 años de tratamiento la ratio colesterol total/HDLc aumentó significativamente ( $p=0.036$ ). No encontramos diferencias significativas en el grosor de la íntima-media entre genotipos.

**Conclusiones:** La variante -1131T> C del gen APOA5 predispone a la hiperlipidemia en pacientes VIH tratados con IP. Los efectos hiperlipidémicos no influyen significativamente el grosor de la íntima-media durante un periodo de 2 años.

### LA PRESENCIA DEL POLIMORFISMO S19W (56C>G) EN EL GEN DE LA APOAV MODIFICA LA RESPUESTA POSTPRANDIAL EN PERSONAS SANAS

R. Moreno, M.J. Gomes, R. Gallego, J.A. Moreno, C. Marín, P. Pérez-Martínez, R. Fernández de la Puebla, F. Pérez-Jiménez y J. López-Miranda

*Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.*

**Introducción:** Recientemente hemos demostrado que el polimorfismo -1131C>T en el gen de la APOAV (16% en la raza caucásica) se relaciona con un incremento en los niveles de triglicéridos plasmáticos durante el estado postprandial. Asimismo se ha establecido que otro polimorfismo del gen de la APOAV (56C>G), que determina un cambio de una serina por un triptófano en el codón 19 se asocia independientemente con niveles altos del triglicérido plasmáticos en diversas poblaciones. Nuestro objetivo fue evaluar si el polimorfismo (56C>G) en el gen de la APOAV podría influir sobre la respuesta postprandial en personas sanas.

**Diseño y métodos:** Cien voluntarios sanos Apo E3E3, (89 con el genotipo 56CC y 11 con el genotipo 56CG y 56GG). Fueron sometidos a un test de sobrecarga oral de grasa con Vitamina A, que consistió en 1 g de grasa por kg de peso corporal y 60.000 UI de vitamina A x m<sup>2</sup> de superficie corporal. La sangre

fue obtenida en el tiempo 0 y cada hora hasta la hora sexta y a partir de aquí cada dos horas y media hasta las once horas. Se determinó los niveles de colesterol (C), ApoB y los triglicéridos (TG) plasmáticos, así como el de C, TG, apo B100, apo B48 y retinil palmitato (RP) de las fracciones lipoproteicas.

**Resultados:** Los datos de la lipemia postprandial revelan que los sujetos con el genotipo 56GC y GG tienen una mayor respuesta postprandial en los niveles plasmáticos de TG ( $p=0.025$ ), C-HDL ( $p=0.014$ ) y ApoB ( $p=0.024$ ), TG vehiculizados en las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) grandes ( $p=0.026$ ) y TG-TRL pequeñas ( $p=0.049$ ), en comparación con los portadores del genotipo 56CC.

**Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que el polimorfismo 56CG situado en el exón tercero del gen de la APOAV podrían influir sobre la diferente respuesta postprandial en personas sanas y explicar al menos en parte el aumento en los niveles de TG plasmáticos previamente descritos en los portadores del alelo G.

### LOS FACTORES GENÉTICOS DETERMINAN LA ACTIVIDAD PARAOXONASA EN LA POBLACIÓN DEL ESTUDIO CUATRO PROVINCIAS

C. Garcés<sup>1</sup>, R. Rubio<sup>1</sup>, M. Benavente<sup>1</sup>, B. Cano<sup>1</sup>, E. Viturro<sup>1</sup>, I. de Oya<sup>1</sup>, J. Fernández-Pardo<sup>2</sup>, L. López-Simón<sup>1</sup> y M. de Oya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Lípidos. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

<sup>2</sup>Medicina Interna. Hospital General Universitario. Murcia.

**Introducción:** La paraoxonasa (PON1) es una éster hidrolasa relacionada con la eliminación de componentes oxidados de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y, por tanto, con el riesgo cardiovascular.

**Objetivo:** El presente estudio analiza la actividad PON1 en suero y los polimorfismos genéticos PON 192 Q/R y PON 55 M/L en los niños de edad prepuberal integrantes del Estudio Cuatro Provincias.

**Metodología:** La población de estudio la constituyen 1275 niños de 6 a 8 años. La actividad PON1 en suero se determinó mediante análisis de la hidrólisis de paraoxon. Los polimorfismos de la PON1 en las posiciones 192 y 55 se analizaron mediante amplificación por PCR y análisis de restricción.

**Resultados:** No hemos encontrado diferencias significativas entre provincias en la frecuencia de los genotipos, ni de los alelos, de ninguno de los dos polimorfismos estudiados. La frecuencia del alelo R en nuestra población es del 30% y la del alelo M de un 38%. Sin embargo, hemos observado que la actividad paraoxonasa es más elevada en Orense y más baja en Murcia, tanto en la población total como para cada uno de los genotipos. Los análisis de regresión muestran que la actividad paraoxonasa está asociada significativamente con los polimorfismos PON 192 Q/R y PON 55 M/L.

**Conclusiones:** Los factores genéticos son los principales determinantes de la actividad paraoxonasa en los niños de edad prepuberal de las cuatro provincias analizadas. Ninguno de los restantes factores analizados (variables antropométricas y bioquímicas) se relacionan con la actividad paraoxonasa en nuestra población.

### NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DE LIPASA ENDOTELIAL EN SUJETOS CON HDL-COLESTEROL ELEVADO

A. Cenarro, F. Ghisoni, P. Martín-Fuentes, D. Recalde, A.L. García-Otín y F. Civeira

*Laboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet, I+CS, Zaragoza.*

**Objetivo:** La lipasa endotelial (LE), miembro de la familia de las lipasas de triglicéridos, influye en el metabolismo de las li-



poproteínas de alta densidad (HDL). La variación en el gen LIPG, que codifica LE, podría explicar parte de la variación en los niveles de HDL-colesterol en la población. El objetivo del presente trabajo fue identificar variaciones en la secuencia de LIPG en sujetos con niveles elevados de HDL-colesterol que pudieran explicar este fenotipo.

**Métodos:** Se seleccionaron 5 sujetos no relacionados con niveles de HDL-colesterol superiores al percentil 90 de la población. Se aisló el DNA y se amplificaron por PCR el promotor y los 10 exones y nexos exón-intrón del gen LIPG. Cada fragmento amplificado se secuenció en ambas direcciones con los cebadores directo y reverso, diseñados con el software Primer3, con el kit DYEnamic ET y el secuenciador automático MegaBace.

**Resultados:** Hemos identificado varios cambios de nucleótido en el gen LIPG en 3 de los 5 sujetos estudiados. 1: Un sujeto presentó 3 cambios de nucleótido en el mismo alelo, definiendo un haplotipo, en el exón 1 y el intrón 1: 229T>G, 349+51C>T, 349+55C>G. 2: Otro sujeto presentó 2 mutaciones en 2 intrones: 1410-146G>A en el intrón 7 y 1733+92A>G en el intrón 9. 3: El tercer sujeto presentó una mutación en estado homocigoto: 1629-248insT en el intrón 8. Las posiciones de los nucleótidos corresponden a la secuencia AF118767 de LIPG del GenBank.

**Conclusiones:** Las variaciones en la secuencia del gen LIPG son frecuentes en sujetos con niveles elevados de HDL-colesterol. Se necesitan más estudios para conocer el significado biológico de estas variaciones y su implicación en el metabolismo de HDL.

#### OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS TAQMAN PARA EL GENOTIPADO DE LOS POLIMORFISMOS D9N Y N291S DEL GEN LPL

M.J. Ariza, E. Ulzurrun, J. Rioja, A. Hornos, M.A. Sánchez-Chaparro, P. Valdivielso y P. González-Santos

Laboratorio de Lípidos y Arteriosclerosis. Centro de Investigaciones Médico-Sanitarias (CIMES). Universidad de Málaga.

La evolución de las técnicas utilizadas para la detección de polimorfismos genéticos ha desembocado en el desarrollo de metodologías alternativas al método clásico de genotipado por PCR-RFLP con objeto de mejorar diferentes aspectos relacionados con la sensibilidad, la especificidad, la rapidez, la facilidad del diseño, el coste y el número de muestras y polimorfismos que se pueden analizar simultáneamente. Una de estas metodologías es el ensayo TaqMan, basado en la actividad 5' exonucleasa del enzima Taq polimerasa. Se trata de un ensayo homogéneo, realizado mediante PCR en tiempo real, que combina la sensibilidad de la reacción de amplificación, la especificidad de la hibridación de sondas específicas de cada alelo y el alto rendimiento de la detección fluorescente de tales sondas que es simultánea a la PCR.

**Objetivo:** Diseñar en el laboratorio ensayos TaqMan para la determinación de los polimorfismos D9N y N291S del gen LPL para el genotipado de una muestra de población laboral.

**Métodos:** El ADN genómico se aisló a partir de sangre congelada, recogida con EDTA-K3 como anticoagulante. Las extracciones se realizaron de forma automatizada en un BioRobot® EZ1 de QIAGEN, utilizando los reactivos disponibles comercialmente. Para el diseño de cebadores y sondas se emplearon portales de internet de uso público. Las sondas correspondientes a los alelos más frecuentes se sintetizaron marcadas en el extremo 5' con Fam y en el 3' con Tamra y las correspondientes a los alelos menos frecuentes con Hex en el

extremo 5' y en el 3' con Tamra. Las reacciones para los ensayos TaqMan se realizaron en una máquina de PCR en tiempo real iCycler iQ™ de BioRad. La verificación de genotipos mediante PCR y restricción se realizó utilizando cebadores y protocolos térmicos previamente descritos, con modificaciones menores. Los polimorfismos en estudio fueron analizados en dos ensayos separados, recogiendo la fluorescencia emitida por cada sonda específica. Los experimentos en gradiente permitieron la optimización de los protocolos térmicos estableciéndose las concentraciones de cebadores y sondas más adecuadas.

**Resultados:** Tras la comprobación de la sensibilidad y repetitividad de los ensayos, empleando ADN de personas con genotipo conocido, estos se aplicaron a una muestra de población laboral (1.407 casos para cada ensayo). Se confirmó la especificidad del método al comprobar por restricción los casos de sujetos heterocigotos y homocigotos para los alelos menos frecuentes y un número suficiente de homocigotos para el alelo salvaje seleccionados al azar (100 comprobaciones en total por cada ensayo), siendo la concordancia entre los dos métodos del 100%.

**Conclusión:** Los ensayos TaqMan diseñados permiten el genotipado de los polimorfismos D9N y N291S de forma rápida y precisa.

#### POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LOS GENES LPL, LIPC Y APOE: ASOCIACIONES CON LÍPIDOS PLASMÁTICOS EN UNA MUESTRA DE POBLACIÓN LABORAL MALAGUEÑA

M.J. Ariza<sup>1</sup>, E. Ulzurrun<sup>1</sup>, J. Rioja<sup>1</sup>, A. Hornos<sup>1</sup>, G. Requena<sup>2</sup>, M.A. Sánchez-Chaparro<sup>2</sup>, J. Román-García<sup>2</sup>, P. Valdivielso<sup>1</sup> y P. González-Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Lípidos y Arteriosclerosis. Centro de Investigaciones Médico-Sanitarias (CIMES). Universidad de Málaga.

<sup>2</sup>Ibermutuamur. Mutua de accidentes de trabajo y enfermedades profesionales de la Seguridad Social nº 274.

Actualmente, se sabe que la susceptibilidad personal a padecer determinadas alteraciones en el metabolismo lipídico puede explicarse, en parte, por la existencia de polimorfismos genéticos. Puesto que el papel que juegan tales polimorfismos depende de la interacción con variables ambientales y con otros polimorfismos, es decir, del contexto ambiental y genético en el que aparecen, es posible encontrar asociaciones diferentes para los mismos polimorfismos en distintos grupos de personas, de ahí la necesidad de ampliar los estudios de asociación a las distintas poblaciones de interés.

**Objetivo:** Determinar los polimorfismos N291S y D9N del gen LPL, -250G/A del gen LIPC y ε2, ε3, ε4 del gen Apo E en una muestra de población laboral malagueña para buscar posibles asociaciones con lípidos plasmáticos.

**Métodos:** El ADN genómico se extrajo de forma automatizada a partir de sangre congelada. Los polimorfismos de LPL y LIPC se determinaron empleando sondas TaqMan diseñadas en el laboratorio y los de ApoE mediante PCR y análisis de los fragmentos de restricción. Los datos clínicos se obtuvieron de las exploraciones llevadas a cabo por el equipo médico de vigilancia de la salud de Ibermutuamur. Los análisis bioquímicos se realizaron en el laboratorio central de Murcia. La influencia de los alelos sobre las variables en estudio se analizó aplicando un modelo lineal general ajustando para edad, sexo, IMC, hábito de fumar, ingesta de alcohol, HTA y grupo de actividad económica. Al evaluar la influencia de los alelos sobre la concentración de HDL-C se ajustó, además, por los niveles de triglicéridos y a la inversa.

**Resultados:** Se determinaron los genotipos de 1.407, 614 y 702 muestras para los polimorfismos mencionados de los genes *LPL*, *LIPC* y *ApoE* respectivamente. Los portadores del alelo 291S presentan concentraciones menores de HDL-C que los no portadores ( $p = 0,003$ ). El alelo 9N se asocia a mayores niveles de triglicéridos ( $p = 0,005$ ). En relación al polimorfismo de lipasa hepática, el alelo -250A se asocia a concentraciones mayores de HDL-C ( $p = 0,015$ ) y, finalmente, el alelo  $\epsilon 2$  de apoE se asocia a menores niveles de colesterol total ( $p < 0,001$ ) y colesterol LDL ( $p < 0,001$ ), al contrario que el  $\epsilon 4$ , cuyos portadores presentan concentraciones más altas de colesterol total y LDL ( $p = 0,002$  y  $p = 0,021$  respectivamente) además de concentraciones mayores de triglicéridos ( $p = 0,018$ ).

**Conclusiones:** Las asociaciones encontradas en nuestra población confirman los resultados obtenidos en otros estudios y sugieren un efecto perjudicial de los alelos menos frecuentes de los polimorfismos de *LPL* así como un efecto beneficioso del polimorfismo de *LIPC* y un efecto opuesto entre los alelos  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 4$  de apoE.

#### VARIABILIDAD DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO LIPÍDICO ENTRE UNA POBLACIÓN ESPAÑOLA, UNA PUERTORRIQUEÑA Y OTRA NORTEAMERICANA

J. Delgado-Lista<sup>1,2</sup>, J. Mattei<sup>3</sup>, C. Marin<sup>1</sup>, P. Gómez<sup>1</sup>,  
R. Moreno<sup>1</sup>, J.A. Paniagua<sup>1</sup>, J.M. Ordovas<sup>3</sup>, F. Pérez-Jiménez<sup>1</sup>  
y J. Lopez-Miranda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. <sup>2</sup>Investigador en Formación FIS.

<sup>3</sup>Nutrition and Genomics Lab, HNRCA at Tufts University, Boston, USA

**Introducción:** Las frecuencias genotípicas de determinados polimorfismos (SNPs) pueden variar entre diferentes poblaciones, dando lugar a patrones genéticos más o menos favorables sobre la salud cardiovascular poblacional.

**Objetivo:** Comparar los resultados del genotipado de tres muestras distintas, realizado en el mismo laboratorio y utilizando los mismos métodos.

**Material y métodos:** 3 poblaciones distintas, formadas por 203 españoles, 960 norteamericanos y 375 puertorriqueños fueron genotipadas mediante PCR a tiempo real, usando sondas Taqman para 10 genes implicados en metabolismo lipídico: Apo A1\_2630, Apo A1\_2803, Apo B A618V, MTPm1498, PPAR $\alpha$ L162V, PPAR $\alpha$ i5522, APO A-V m1123, APO A-V S16W, LPL m107 y LPL D9N.

**Resultados:** Las tres muestras seleccionadas estuvieron en equilibrio según la prueba de Hardy-Weinberg para todos los SNPs evaluados. Las frecuencias genotípicas de la población de España difirieron en 4 de los SNPs con las de Norteamérica, y en otros 4 distintos con las de Puerto Rico, pero en ninguno de ellos la española se diferenció de las otras dos a la vez. Por su parte, la de Puerto Rico se distinguió de la Norteamericana en 6 de los 10 polimorfismos. Sólo en los dos SNPs de los PPAR $\alpha$  no se encontraron diferencias entre las tres. Ningún SNP presentó frecuencias distintas en las tres muestras.

**Conclusiones:** Este trabajo demuestra la elevada diversidad en las frecuencias genotípicas de genes implicados en el metabolismo lipídico. Estas diferencias pueden explicar en parte la distinta prevalencia de enfermedad cardiovascular entre las poblaciones seleccionadas.