

# Análisis de las regiones reguladoras de la expresión de apo A-I en sujetos con hipoalfalipoproteinemia

D. Recalde<sup>a</sup>, A. Cenarro<sup>b</sup>, A.L. García-Otín<sup>a</sup>, T. Tejedor<sup>c</sup>, F. Civeira<sup>b,d</sup> y M. Pocoví<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. <sup>b</sup>Laboratorio de Investigación Molecular. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Miguel Servet. <sup>c</sup>Departamento de Anatomía, Embriología y Genética. Universidad de Zaragoza. <sup>d</sup>Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Zaragoza.

---

**Introducción/Objetivos.** La concentración de apolipoproteína (apo) A-I está directamente relacionada con la concentración de colesterol ligado a HDL (cHDL) e inversamente relacionada con el riesgo de padecer enfermedad coronaria. El gen de apo A-I forma parte de la agrupación génica A-I/C-III/A-IV, localizada en el cromosoma 11. La expresión de la proteína se encuentra regulada por una región promotora y una región exaltadora, situadas en 5' de los genes de apo A-I y apo C-III, respectivamente. Se han descrito varios sitios polimórficos, que podrían afectar la expresión de la proteína: g.(-78)G > A, en 5' del gen de apo A-I, g.(-636)C > A, g.(-625)G > A, g.(-620)T > del, g.(-479)C > T y g.(-452)T > C, en 5' del gen de apo C-III; SstI, en 3' de apo C-III.

**Métodos.** Hemos analizado el genotipo de los polimorfismos y la presencia de nuevas mutaciones en las regiones reguladoras del gen de apo A-I en un grupo de 66 sujetos españoles no relacionados con hipoalfalipoproteinemia (HALP) (cHDL < 35 mg/dl) primaria.

**Resultados.** Las frecuencias alélicas observadas para los polimorfismos fueron similares a las descritas en sujetos normolipémicos. Solamente se observó una asociación significativa entre el alelo menor del polimorfismo g.(-452)T > C con concentraciones bajas de cLDL ( $p < 0,05$ ). Los polimorfismos situados en 5' de apo C-III presentaron un fuerte desequilibrio gamético entre sí y, en menor medida, con el polimorfismo SstI en la región 3' del gen de apo C-III. No se detectó

ninguna nueva mutación en las regiones promotora ni exaltadora de la expresión de apo A-I.

**Conclusiones.** Nuestros resultados sugieren que la variabilidad genética del promotor y exaltador del gen de apo A-I no justifica un porcentaje significativo de casos de HALP en población española.

**Palabras clave:**  
Hipoalfalipoproteinemia. Apolipoproteína A-I. Promotor. Exaltador. Polimorfismos genéticos.

---

## ANALYSIS OF APO AI EXPRESSION REGULATORY REGIONS IN HYPOALPHALIPOPROTEINEMIA SUBJECTS

**Background.** Plasma apolipoprotein (apo) A-I levels are directly related to HDL-cholesterol (cHDL) concentration, and inversely correlated to coronary artery disease risk. Apo A-I gene lies in the A-I/C-III/A-IV gene cluster, located on chromosome 11. Hepatic and intestinal expression of apo A-I gene is transcriptionally regulated by both promoter and enhancer sequences, located at 5' regions of apo A-I and apo C-III genes, respectively. Several polymorphisms have been described, which could modify protein expression: g.(-78)G > A, upstream the apo A-I gene, g.(-636)C > A, g.(-625)G > A, g.(-620)T > del, g.(-479)C > T, and g.(-452)T > C, upstream the apo C-III gene; SstI, downstream the apo C-III gene.

**Material and methods.** We have analysed the genotype for these polymorphisms, as well as the presence of non described mutations in these regulatory regions in a group of 66 Spanish subjects with primary hypoalphalipoproteinemia (HALP) (cHDL < 35 mg/dl).

Correspondencia: Dr. Miguel Pocoví.  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.  
Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.  
50009 Zaragoza, España.  
Correo electrónico: mpocovi@posta.unizar.es

**Results.** Allelic frequencies of studied polymorphisms were close to those reported for normolipidemic subjects. The only significant association between lipid levels and genotypes was observed for the minor allele of g.(-452)T > C polymorphism, which was associated with low cLDL levels ( $p < 0.05$ ). The five polymorphic loci at 5' of apo C-III exhibited a strong gametic disequilibrium, among themselves, and, in a lesser degree, with the SstI polymorphism in the apo C-III 3' untranslated region. We have not detected any unknown mutation in the promoter nor enhancer regions of the apo A-I gene.

**Conclusions.** Therefore, our results suggest that the variability at the promoter and enhancer apo A-I gene locus do not significantly contribute to HALP in Spanish population.

**Key words:**  
Hypoalphalipoproteinemia. Apolipoprotein A-I. Promoter. Enhancer. Genetic polymorphism.

## Introducción

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que la concentración de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) presenta una fuerte correlación inversa con el desarrollo de enfermedad coronaria<sup>1</sup>.

La concentración de cHDL está regulada por factores genéticos, ambientales y hormonales. Diversos estudios de segregación han indicado que no existe un *locus* mayor que determine la variabilidad de cHDL. En cambio, los factores genéticos de carácter poligénico determinan una fracción importante (40-60%) de la variación fenotípica<sup>2,3</sup>.

El término hipoalfalipoproteinemia (HALP) designa a un grupo de dislipemias de origen y fenotipo clínico y bioquímico diversos, cuya característica común es la de presentar concentraciones de cHDL por debajo de 35 mg/dl<sup>4</sup> o inferiores al percentil 10, según la edad, la raza y el sexo<sup>5</sup>.

El principal componente estructural y funcional de las HDL es la apolipoproteína (apo) A-I. La concentración de apo A-I en plasma está directamente relacionada con la concentración de cHDL e inversamente relacionada con el riesgo de padecer enfermedad coronaria. El gen que codifica apo A-I se localiza en el cromosoma 11, y forma parte de la agrupación génica A-I/C-III/A-IV<sup>2</sup>.

La apo A-I se expresa principalmente en el hígado y el intestino. La regulación de la síntesis de la proteína se realiza fundamentalmente de forma transcripcional, a través de mecanismos complejos,

específicos para cada uno de los tejidos y que se conocen mejor en el caso de la síntesis hepática. La transcripción del gen de apo A-I está controlada por múltiples interacciones ADN-proteína, establecidas en varias regiones a lo largo de la agrupación génica apo A-I/C-III/A-IV<sup>3,6</sup>.

El promotor del gen de apo A-I, necesario para que se produzca la síntesis hepática e intestinal de la proteína, se localiza en las 2 kilobases (Kb) en 5' de apo A-I, siendo la región más importante la comprendida entre los nucleótidos -256 y -41<sup>3</sup>. Por otro lado, la transcripción de apo A-I se regula por la interacción de la región promotora con una región exaltadora de la expresión de apo A-I, situada en la zona intergénica entre los genes de C-III y A-IV, y que también intensifica la transcripción de dichos genes<sup>7</sup>. Esta región ha sido acotada entre los nucleótidos -194 y -770 en 5' de C-III<sup>6</sup>, si bien algunos autores la sitúan entre los nucleótidos -520 y -780, en 5' de C-III<sup>8</sup>.

Se han descrito varios polimorfismos en las regiones reguladoras de la expresión de apo A-I, cuyo genotipo podría afectar a la eficiencia de la expresión de la proteína. Diversos autores han propuesto que el alelo A del polimorfismo g.(-78)G > A, situado en el promotor en 5' del gen de apo A-I, se asocia con concentraciones elevadas de la proteína<sup>9-12</sup>, aunque esta observación no se ha confirmado en otros estudios<sup>13</sup>. Estudios *in vitro* han comparado la eficacia de transcripción del promotor de apo A-I portador de uno u otro alelo, pero sus resultados son contradictorios<sup>14,15</sup>. Aunque es probable que este polimorfismo no afecte directamente a la expresión de la proteína, podría estar en desequilibrio gamético con otros elementos reguladores, responsables de la asociación observada<sup>16</sup>.

En la región exaltadora localizada en 5' del gen de apo C-III se han descrito 5 sitios polimórficos, g.(-636)C > A, g.(-625)G > A, g.(-620)T > del, g.(-479)C > T y g.(-452)T > C. Estos polimorfismos se encuentran en fuerte desequilibrio gamético entre sí y con el polimorfismo SstI, en 3' del gen de apo C-III, y se asocian significativamente con hipertrigliceridemia (HPTG)<sup>17-19</sup>. Ginsburg et al<sup>20</sup> determinaron que las velocidades de síntesis de apo A-I y apo A-IV en el intestino y sus concentraciones de ARNm están estrechamente relacionadas entre sí y con el genotipo de los polimorfismos en 5' del gen de apo C-III. Naganawa et al<sup>21</sup> analizaron la influencia del genotipo de los polimorfismos -479 y -452 sobre la expresión intestinal de apo A-I. Demostraron que ésta no es constitutiva y que presenta una elevada variación interindividual, regulada, al menos parcialmente, de forma transcripcional.

Con el fin de conocer la posible influencia de las secuencias reguladoras de la expresión de apo A-I sobre el desarrollo de HALP, hemos analizado, en un grupo de sujetos españoles con valores de cHDL inferiores al percentil 10, el genotipo de los polimorfismos citados, así como la posible existencia de otras mutaciones no descritas en dichas regiones.

## Material y métodos

### Descripción de la muestra

El estudio se realizó sobre un grupo de 66 sujetos (56 varones y 10 mujeres) no relacionados entre sí con HALP primaria recurrente. Los sujetos fueron seleccionados durante los controles médicos anuales de una población laboral en Zaragoza. La HALP se definió por presentar una concentración de cHDL inferior al percentil 10, de acuerdo con la edad, el sexo y la distribución lipídica de esta población<sup>22,23</sup>, confirmada en al menos 4 ocasiones durante un período de seguimiento de 5 años. Se consideró HALP primaria tras excluir obesidad (índice de masa corporal [IMC] < 30 kg/m<sup>2</sup>), cáncer, diabetes mellitus tipo 2, y enfermedades inflamatorias crónicas, renales y hepáticas. Asimismo, fueron excluidos los sujetos con concentraciones de triglicéridos (TG) > 300 mg/dl. Entre los sujetos estudiados había algunos que presentaban HPTG moderada (TG > 177 mg/dl). Las características antropométricas y las concentraciones de lípidos plasmáticos medias ± desviación estándar (DE) fueron las siguientes: edad, 46 ± 14,8 años; IMC, 25 ± 3,1 kg/m<sup>2</sup>; colesterol total (CT), 203 ± 42,5 mg/dl; TG, 136 ± 50,4 mg/dl; colesterol en lipoproteínas de baja densidad (cLDL), 130 ± 40,1 mg/dl; cHDL, 28 ± 7,2 mg/dl. Cinco de las 10 mujeres participantes en el estudio eran posmenopáusicas. Quince de los sujetos presentaron síntomas clínicos de enfermedad coronaria. Dado que la región de origen de los sujetos seleccionados no presenta ninguna especificidad étnica, consideramos que este grupo es representativo de la población española.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Miguel Servet de Zaragoza, y todos los sujetos estudiados firmaron un consentimiento informado.

### Muestras de plasma y ADN

Se extrajeron 10 ml de sangre por punción venosa, entre las 8 y 10 de la mañana, tras 10-12 h de ayuno. La sangre se dispuso en tubos que contenían 1 mg/dl de EDTA como anticoagulante. Se centrifugaron las muestras a 3.500 rpm durante 15 min a 4 °C. El plasma se alicuotó y se congeló inmediatamente a -70 °C. Se extrajo ADN genómico a partir de las células sanguíneas.

### Cuantificación de lípidos y apolipoproteínas

La concentración plasmática de CT y TG se determinó enzimáticamente (kit Boehringer Mannheim, Alemania) con un autoanalizador Beckman Synchron CX7. El cHDL se cuantificó tras la precipitación con Mg<sup>++</sup>fosfowlframato de las lipoproteínas que contienen apo B (Boehringer Mannheim, Alemania). El cLDL se estimó utilizando la fórmula de Friedewald. La concentración de las apolipoproteínas A-I y B se determinó por inmunonefelometría (Beckman, Palo Alto, EE.UU.).

### Análisis molecular de la región 5' del gen de apo C-III

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN situado en 5' del gen de apo C-III (-823, -158). La PCR se realizó con Taq

DNA polimerasa (Gibco BRL), ADN genómico como molde, y los oligonucleótidos indicados en la figura 1. Se amplificaron por PCR anidada 3 fragmentos que solapaban de 127-197 pares de bases (pb), empleando como ADN molde el producto de PCR (-823, -158) y los oligonucleótidos indicados en la figura 1, marcados en el extremo 5' con el fluoróforo Cy5<sup>TM</sup>. Los fragmentos amplificados incluyeron los siguientes polimorfismos: fragmento 1: g.(-636)C > A, g.(-625)G > A y g.(-620)T > del; fragmento 2: g.(-479)C > T; fragmento 3: g.(-452)T > C; fragmento 4: g.(-479)C > T y g.(-452)T > C. La numeración de los nucleótidos se realizó de acuerdo con la secuencia publicada para el promotor del gen de apo C-III<sup>24</sup>. Los fragmentos amplificados se analizaron por SSCP, como se describe a continuación.

### Análisis molecular de la región 5' del gen de apo A-I

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN situado en 5' del gen de apo A-I (-255, +3). La PCR se realizó con Taq ADN polimerasa (Gibco BRL), ADN genómico como molde, y los oligonucleótidos (-255, -236) <sup>5</sup>CACCCGGAGACCTGCAAGC<sup>3'</sup> y (-18, +3) <sup>5</sup>TCTAACGCCAGCTTGCA<sup>3'</sup>, marcados en el extremo 5' con el fluoróforo Cy5<sup>TM</sup>. La numeración de los nucleótidos se realizó de acuerdo con la secuencia publicada para el promotor del gen de apo A-I<sup>25</sup>. El fragmento amplificado (fragmento 5) incluyó el polimorfismo g.(-78)G > A y se analizó por SSCP, como se describe a continuación.

### Análisis de SSCP

Se añadió tampón de desnaturización (formamida al 95%) a una alícuota de los fragmentos amplificados por PCR. Las muestras se desnaturizaron a 95 °C durante 5 min y se enfriaron inmediatamente en hielo. Se realizó una electroforesis a 1.050 V durante 15 h, en tampón TBE × 0,6, a 15 °C (fragmentos 2 y 5) o 20 °C (fragmentos 1, 3 y 4) en geles de MDE sin glicerol, y a 22 °C (fragmentos 1 y 2) o 25 °C (fragmentos 3, 4 y 5) en geles de MDE al 5% de glicerol, en un secuenciador semiautomático equipado con un baño termostático (ALF-Express<sup>TM</sup>, Pharmacia). La temperatura de análisis óptima para cada fragmento se determinó analizando 5 muestras a ambas temperaturas.

### Polimorfismo SstI en 3' del gen de apo C-III

El genotipo del polimorfismo SstI (g.3238 C > G), en la región 3' no transcrita del gen de apo C-III<sup>26</sup>, se determinó por amplificación por PCR y análisis de restricción con la enzima SstI. Se amplificó un fragmento de 923 pb empleando los oligonucleótidos <sup>5</sup>CAGAAGGTGGATAGAGCG<sup>3'</sup> y <sup>5</sup>TGACCGATGGCTTCAGTT<sup>3'</sup>.

### Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media ± desviación estándar (DE). El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc.) versión 6.1.3. Se comprobó que las frecuencias de los genotipos observados no se desviaban significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg con el análisis de la  $\chi^2$ . Si el número de sujetos para cada genotipo fue inferior a 5, se utilizó el programa Genetix versión 4.0 (Belkhir Biosoft) para confirmar el equilibrio. Se analizaron las posibles asociaciones entre polimorfismos y parámetros lipídicos por ANOVA y test de Scheffé. Las frecuencias haplotípicas y la significación de los desequilibrios gaméticos se estimaron con el programa 3LOCUS.PAS versión 5.0, que resuelve el algoritmo de maximización de expectativa (E-M) de Long para sistemas de varios loci<sup>27</sup>. En todos los análisis realizados se consideró un ni-

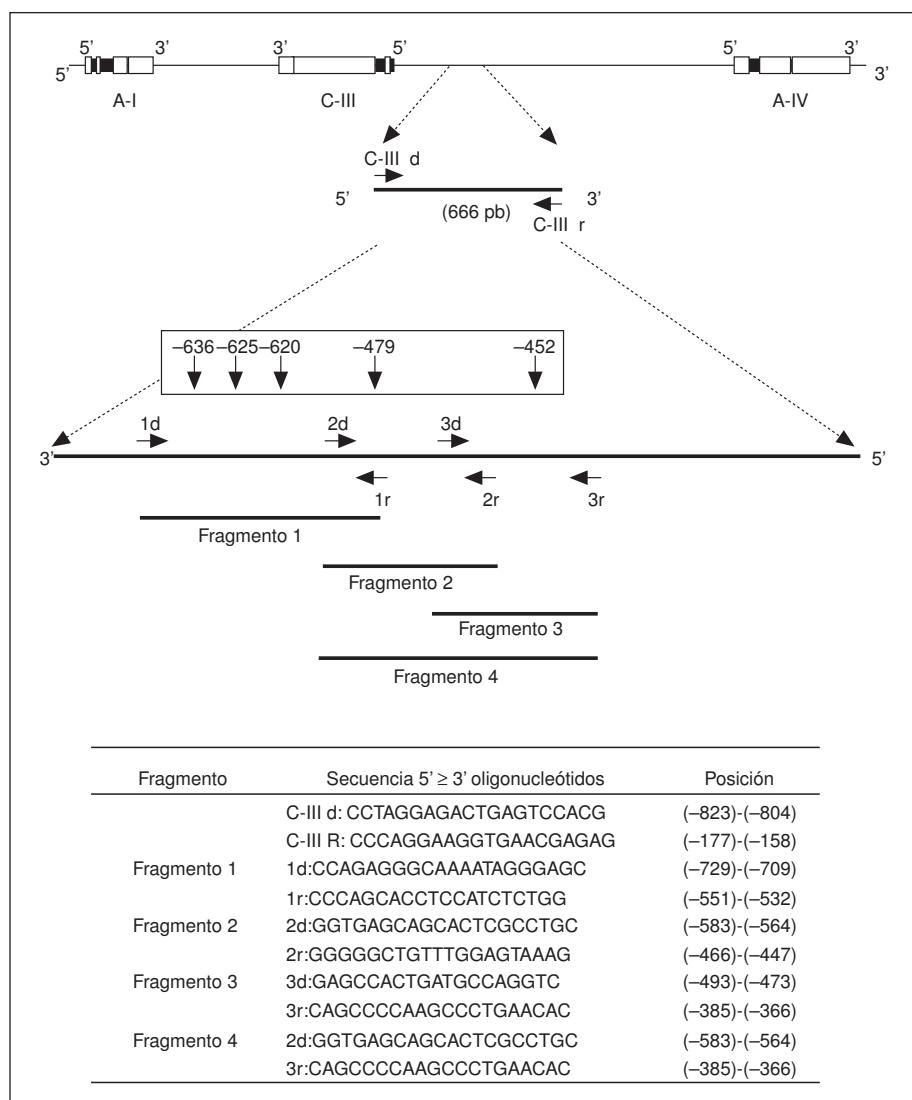


Figura 1. Esquema de los fragmentos en 5' del gen de apo C-III amplificados para su análisis por SSCP. Las flechas horizontales representan los cebadores empleados para amplificar por PCR los fragmentos de ADN a analizar. La flechas verticales indican la posición de los polimorfismos situados en la región analizada.

vel de significación global de  $\alpha = 0,05$ . En todos los polimorfismos analizados los alelos mayor y menor se designaron como 1 y 2, respectivamente.

## Resultados

En este trabajo, hemos realizado el análisis molecular de las regiones promotora y exaltadora de la expresión de apo A-I en un grupo de 66 sujetos con HALP primaria, con el fin de estudiar su posible contribución al desarrollo de dicha dislipemia.

En el análisis por SSCP del fragmento 1, en 5' del gen de apo C-III, se observaron 2 tipos de patrones electroforéticos diferenciados, o bien una combinación de ambos. Se comprobó por análisis de restricción que dichos patrones corresponden a los tres posibles genotipos del polimorfismo g.(-636)C > A (C/C, A/A y C/A). No se detectó nin-

gún patrón electroforético diferente de los tres citados. Dado que el fragmento 1 contiene, asimismo, los polimorfismos g.(-625)G > A y g.(-620)T > del, se asumió que los tres polimorfismos se encuentran en completo desequilibrio gamético. Todos los análisis estadísticos correspondientes a los tres loci se expresan en relación al polimorfismo g.(-636)C > A.

Análogamente, al analizar los fragmentos 2 y 3, en la región exaltadora, y 5, en la región promotora, se detectaron 2 tipos de patrones electroforéticos diferenciados, o bien una combinación de ambos. Se comprobó por análisis de restricción que dichos patrones correspondían a los genotipos de los polimorfismos g.(-479)C > T, g.(-452)T > C y g.(-78)G > A, respectivamente.

Por último, el análisis del fragmento 4 de la región exaltadora proporcionó el genotipo de los poli-

morfismos g.(-479)C > T y g.(-452)T > C en cada sujeto. Dado que existen 4 posibles haplotipos, se pueden encontrar hasta 10 patrones de SSCP diferentes, correspondientes a las distintas combinaciones de dos haplotipos. Se observaron 6 patrones de SSCP diferentes (fig. 2). Se dedujeron los haplotipos correspondientes a cada uno de los patrones a partir de los genotipos de los polimorfismos, que se habían determinado previamente (fragmentos 2 y 3).

No se detectó ningún patrón de SSCP diferente de los originados por el genotipo de los polimorfismos citados, en ninguno de los 5 fragmentos analizados.

Las frecuencias alélicas y genotípicas observadas para los polimorfismos se recogen en la tabla 1. Ninguno de los polimorfismos analizados presentó una distribución de genotipos significativamente diferente de la distribución de equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se analizó la posible asociación de estos polimorfismos con la concentración de diferentes parámetros lipídicos (tabla 2). Se excluyeron del análisis dos sujetos que presentaron perfiles lipídicos anómalos. No se observó una asociación significativa entre los genotipos de los polimorfismos g.(-78)G > A, g.(-636)C > A, g.(-479)C > T y SstI y los valores de lípidos en estos sujetos. El alelo menor del polimorfismo g.(-452)T > C se asoció significativamente ( $p < 0,05$ ) con concentraciones bajas de cLDL. El genotipo de este polimorfismo no presentó asociaciones significativas con la concentración de CT, TG ni cHDL, aunque los valores fueron cercanos a la significación estadística en los dos primeros parámetros. Asimismo, el genotipo del polimorfismo g.(-479)C > T presentó, con respecto a la concentración de cHDL, una asociación con un valor de  $p$  cercano a la significación estadística.

La distribución de frecuencias de la combinación de los diferentes genotipos de los polimorfismos -636, -479 y -452, y las concentraciones lipídicas asociadas a cada una de ellas se reflejan en la tabla 3. Se observaron 8 de las 27 posibles combinaciones. El genotipo del polimorfismo g.(-636)C >

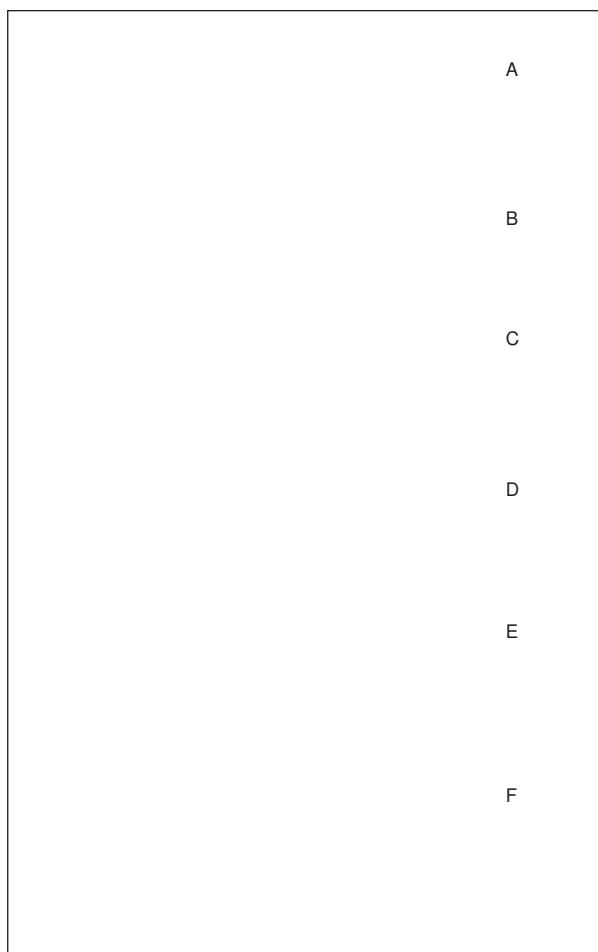


Figura 2. Resultados del análisis de SSCP del fragmento 4 (-583,-366) en 5' del gen de apo C-III. El patrón A corresponde a la combinación de haplotipos de los polimorfismos g.(-479)C > T y g.(-452)T > C 11/11; B, a la combinación 11/12; C, a la combinación 11/22; D, a la combinación 12/21; E, a la combinación 12/22; F, a la combinación 22/22.

A coincidió con el genotipo del polimorfismo g.(-452)T > C en 62 de los 66 sujetos analizados. Al añadir el genotipo del polimorfismo SstI, se obtuvieron 11 de las 81 posibles combinaciones. La combinación más frecuente fue 11, 11, 11, 11.

**Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados**

Polimorfismo	Frecuencias genotipos			Frecuencias alélicas		
	1/1	1/2	2/2	1	2	DE
g.(-78)G > A	0,697 (46)	0,288 (19)	0,015 (1)	0,841 (111)	0,159 (21)	±0,0624
g.(-636)C > A <sup>a</sup>	0,455 (30)	0,485 (32)	0,061 (4)	0,697 (92)	0,303 (40)	±0,0784
g.(-479)C > T	0,621 (41)	0,333 (22)	0,045 (3)	0,788 (104)	0,212 (28)	±0,0697
g.(-452)T > C	0,455 (30)	0,455 (30)	0,091 (6)	0,682 (90)	0,318 (42)	±0,0794
SstI	0,848 (56)	0,152 (10)	0,000 (0)	0,924 (122)	0,076 (10)	±0,0452

DE: desviación estándar, con intervalo de confianza del 95%; los números entre paréntesis indican el número de sujetos con cada genotipo o alelo;

<sup>a</sup>Los polimorfismos g.(-625)G > A y g.(-620)T > C se encuentran en completo desequilibrio gamético con g.(-636)C > A.

**Tabla 2. Genotipo de cada polimorfismo estudiado y concentraciones de lípidos y lipoproteínas**

Polimorfismo	Genotipo	N	CT (mg/dl)	p <sup>a</sup>	TG (mg/dl)	p <sup>a</sup>	cLDL (mg/dl)	p <sup>a</sup>	CHDL (mg/dl)	p <sup>b</sup>
g.(-78)G > A	11	45	207 ± 35,2	0,975	133 ± 47,5	0,759	153 ± 36,9	0,868	28 ± 6,0	0,799
	12	18	206 ± 37,8		143 ± 60,4		148 ± 35,6		29 ± 5,2	
	22	1	203		147		143		31	
g.(-636)C > A	11	30	208 ± 36,7	0,163	140 ± 52,9	0,218	151 ± 33,8	0,115	28 ± 4,3	0,312
	12	31	210 ± 33,8		127 ± 46,4		156 ± 37,3		29 ± 6,8	
	22	3	169 ± 22,3		177 ± 67,4		110 ± 25,7		23 ± 6,7	
g.(-479)C > T	11	41	213 ± 36,2	0,158	131 ± 48,7	0,167	158 ± 35,8	0,138	29 ± 5,0	0,059
	12	21	197 ± 33,1		139 ± 51,5		142 ± 35,2		28 ± 6,8	
	22	2	182 ± 7,8		200 ± 76,4		122 ± 22,3		20 ± 0,7	
g.(-452)T > C	11	30	208 ± 36,6	0,082	142 ± 52,4	0,076	151 ± 33,8	0,033*	29 ± 4,5	0,504
	12	29	211 ± 34,0		123 ± 45,2		158 ± 37,1		28 ± 6,8	
	22	5	173 ± 19,2		174 ± 56,6		113 ± 18,6		25 ± 6,7	
SstI	11	54	209 ± 34,4	0,286	136 ± 52,0	0,926	153 ± 34,7	0,302	28 ± 5,7	0,959
	12	10	196 ± 40,4		134 ± 39,8		141 ± 42,9		28 ± 6,2	
	22	0	-		-		-		-	

N: número de sujetos; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; cLDL: colesterol ligado a LDL; cHDL: colesterol ligado a HDL;

<sup>a</sup>Se consideró significación estadística a partir de p < 0,05. \*Valores estadísticamente significativos.**Tabla 3. Frecuencia y concentraciones lipídicas de diferentes combinaciones de genotipos en los polimorfismos situados en las posiciones -636, -479 y -452**

Polimorfismos -636	-479	-452	Frecuencia (N = 64)	CT (mg/dl)	TG (mg/dl)	cLDL (mg/dl)	cHDL (mg/dl)
1/1	1/1	1/1	0,452 (29)	208 ± 37,2	142 ± 53,3	151 ± 34,4	28 ± 4,4
1/2	1/1	1/1	0,016 (1)	205	135	144	34
1/1	1/1	1/2	0,016 (1)	196	100	146	30
1/2	1/1	1/2	0,161 (10)	229 ± 33,2	103 ± 18,0	178 ± 37,3	30 ± 6,6
1/2	1/2	1/2	0,274 (18)	202 ± 32,2	136 ± 52,6	148 ± 34,3	27 ± 7,1
1/2	1/2	2/2	0,032 (2)	180 ± 18,4	171 ± 60,8	117 ± 1,6	28 ± 7,8
2/2	1/2	2/2	0,016 (1)	144	130	87	31
2/2	2/2	2/2	0,032 (2)	182 ± 7,8	200 ± 76,4	122 ± 22,3	20 ± 0,7

N: número de sujetos; CT: colesterol total; TG: triglicéridos; cLDL: colesterol ligado a LDL; cHDL: colesterol ligado a HDL.

**Tabla 4. Desequilibrio gamético entre polimorfismos de la agrupación génica A-I/C-III/A-IV**

	g.(-78)G > A	SstI	g.(-636)C > A	g.(-479)C > T	g.(-452)T > C
g.(-78)G > A					
SstI	3,62				
g.(-636)C > A	0,41		6,78*		
g.(-479)C > T	0,02		7,35*	58,44*	
g.(-452)T > C	0,21	13,86*	89,19*	52,67*	

Los valores de G señalados con un asterisco fueron estadísticamente significativos (para p < 0,05 y 1 df;  $\chi^2 = 3,841$ ).

Se estimaron las frecuencias haplotípicas de los polimorfismos -636, -479 y -452 y se calcularon los correspondientes desequilibrios gaméticos. Las frecuencias haplotípicas de los polimorfismos estimadas con el programa 3LOCUS.PAS fueron muy diferentes de las esperadas en el equilibrio. El sistema de tres *loci* presentó desequilibrio gamético global ( $G = 150,11$ ;  $p < 0,05$ ). El desequilibrio a tres vías no fue estadísticamente significativo ( $G = 0,00$ ;  $p > 0,05$ ). Los polimorfismos (-479 frente a -452), (-636 frente a -452) y (-636 frente a -479)

demonstraron fuertes desequilibrios gaméticos entre sí (tabla 4).

Asimismo, se analizó si los *loci* de la región promotora del gen de apo A-I, 3' del gen de apo C-III y 5' del gen de apo C-III se encontraban en desequilibrio gamético. El polimorfismo SstI se encuentra en desequilibrio gamético con los cinco polimorfismos en 5' de apo C-III, aunque éste es muy inferior al que presentan dichos polimorfismos entre sí. El polimorfismo g.(-78)G > A no presenta desequilibrio gamético con ninguno de los *loci* analizados.

## Discusión

En un grupo de 66 sujetos españoles con HALP primaria hemos determinado el genotipo de los polimorfismos g.(-636)C > A, g.(-479)C > T y g.(-452)T > C, en 5' del gen de apo C-III, SstI, en 3' del gen de apo C-III y g.(-78)G > A, en 5' del gen de apo A-I.

Las frecuencias alélicas de los polimorfismos en 5' del gen de apo C-III en los sujetos con HALP de nuestro estudio fueron similares a las descritas en trabajos realizados sobre grupos de sujetos normolipémicos. En dichos estudios se observó una asociación significativa del alelo menor de estos polimorfismos con la concentración de TG, pero no con el resto de parámetros lipídicos<sup>17,18</sup>. Sin embargo, en el grupo de sujetos con HALP analizado en este trabajo, únicamente se observó una asociación significativa entre el genotipo del polimorfismo g.(-452)T > C y la concentración de cLDL. Tal y como han afirmado Dammerman et al<sup>17</sup> y Li et al<sup>28</sup>, el alelo menor de dicho polimorfismo se asocia a una expresión elevada de apo C-III. La apo C-III presenta un efecto inhibidor sobre la actividad de lipoprotein lipasa (LPL), responsable de la hidrólisis de TG de lipoproteínas ricas en TG<sup>29</sup>. Por tanto, el incremento en la expresión de apo C-III podría impedir o retardar la cascada lipolítica en la que se producen partículas LDL. De acuerdo con esta hipótesis, los sujetos que hemos estudiado con genotipo 2 para el polimorfismo g.(-452)T > C presentan un valor de TG superior a los sujetos con genotipo 1, si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En el grupo de sujetos con HALP estudiados, la frecuencia alélica del alelo menor (S2) del polimorfismo SstI fue del 7,6%, muy similar a la descrita en sujetos caucásicos normolipémicos<sup>17,30,31</sup>, y no presentó una asociación significativa con ninguno de los parámetros lipídicos analizados. Algunos autores han propuesto que el alelo S2 se relaciona con valores bajos de cHDL, pero existen datos contradictorios en este sentido<sup>32,33</sup>. En cambio, la asociación del alelo menor de SstI con HPTG y enfermedad coronaria se ha demostrado en numerosos trabajos<sup>23,30</sup>. La ausencia en nuestro estudio de dicha asociación podría deberse en parte a que los sujetos analizados fueron seleccionados dentro de un rango de concentración de TG limitado (< percentil 95).

Las frecuencias alélicas observadas para el polimorfismo g.(-78)G > A en los sujetos con HALP analizados no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las frecuencias alélicas observadas previamente en 60 sujetos del

mismo origen geográfico, con CT y TG por debajo del percentil 60 y cHDL > percentil 75<sup>34</sup>. Nuestros resultados son, asimismo, muy similares a los descritos en sujetos normolipémicos, en los que la frecuencia del alelo A es aproximadamente de 0,15-0,20<sup>14</sup>.

La interpretación de los resultados relativos a la frecuencia alélica de un polimorfismo ha de realizarse con precaución. En primer lugar, en polimorfismos con contenidos informativos (PIC) intermedios es necesario analizar al menos a varios cientos de individuos para demostrar la asociación de uno de los alelos con un determinado rasgo. Si el PIC es menor, el número de sujetos que debemos analizar se incrementa inversamente<sup>35</sup>. Por otro lado, si comparamos las frecuencias alélicas y los fenotipos de diferentes grupos de sujetos, es conveniente que todos ellos tengan el mismo origen geográfico y posición socioeconómica. En este sentido, los resultados contradictorios observados en numerosos estudios podrían deberse a que los polimorfismos estudiados sean específicos de ciertos grupos de población, o bien a que, a pesar de no ser funcionales, presenten una asociación imperfecta con un determinado fenotipo debido a que estén en desequilibrio gamético con otros polimorfismos o mutaciones funcionales, cuya frecuencia varíe entre las distintas poblaciones<sup>36</sup>. Asimismo, es preciso no olvidar que las diferencias ambientales pueden desempeñar aún un papel importante en las diferencias fenotípicas observadas, a juzgar por los valores de heredabilidad estimados por diversos autores para la concentración de cHDL. Debe recordarse que se entiende por factores ambientales todos aquellos efectos que no corresponden a la acción de los genes, ya sea aditiva, de dominancia o epistática.

Los desequilibrios gaméticos calculados a partir de la estimación de los haplotipos indicaron que los polimorfismos g.(-479)C > T, g.(-452)T > C y g.(-636)C > A se encuentran en desequilibrio gamético entre sí, y, en menor medida, con el locus SstI, lo que está de acuerdo con observaciones previas<sup>17,18</sup>. El polimorfismo g.(-78)G > A no presenta desequilibrio gamético con los otros loci estudiados. Dado que al analizar el fragmento (-729, -532) solamente se observaron tres patrones de SSCP diferentes, se asumió que los polimorfismos g.(-636)C > A, g.(-625)G > A y g.(-620)T > del se encontraban en completo desequilibrio gamético. Dammerman et al<sup>17</sup> determinaron que los tres polimorfismos tenían el mismo genotipo en 173 sujetos analizados, mientras que Surguchov et al<sup>18</sup> obtuvieron idéntico resultado en 624 de 626 sujetos estudiados. El ge-

notipo del polimorfismo g.(-636)C > A coincidió con el genotipo del polimorfismo g.(-452)T > C en el 94% de los sujetos analizados, proporción ligeramente inferior a la observada por Dammerman (98%).

Por tanto, los resultados observados en el grupo de sujetos con HALP estudiados indican que el genotipo de los polimorfismos g.(-78)G > A, en 5' del gen de apo A-I, g.(-636)C > A, g.(-625)G > A, g.(-620)T > del, g.(-479)C > T y g.(-452)T > C, en 5' el gen de apo C-III, y SstI, en 3' del gen de apo C-III, no tiene un efecto significativo sobre la concentración de cHDL, por lo que es probable que tampoco sean importantes en la regulación de la concentración de apo A-I en plasma. Es posible que existan múltiples factores, además de la expresión hepática, que determinen la concentración plasmática de apo A-I, como las modificaciones postraduccionales, el catabolismo y la secreción, sin olvidar los factores ambientales, en el más amplio sentido del término (edad, sexo, tipo de vida, nivel socioeconómico y cultural, etc.). El análisis por SSCP no detectó ninguna mutación no descrita previamente en las regiones promotoras (-256,+3) en 5' del gen de apo A-I, ni exaltadora (-729, -366) en 5' del gen de apo C-III. Por tanto, nuestros resultados sugieren que las mutaciones en las regiones reguladoras de la expresión de apo A-I no justifican un porcentaje significativo de casos de HALP, si bien para confirmar este hecho sería necesario estudiar un número mayor de sujetos que el analizado en el presente trabajo. Futuros estudios en este sentido permitirán conocer en mayor profundidad el significado biológico de las mutaciones en regiones reguladoras de la expresión génica.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (Proyectos FIS 00/0952, 00/0546 y 99/0048-01). D.R. ha disfrutado una beca FPI del Ministerio de Educación. Agradecemos su colaboración a los Dres. J. González-Bonillo y M.A. Lasunción, que proporcionaron algunas de las muestras, y al Dr. J.C. Long, que cedió amablemente su programa 3LOCUS.PAS.

## Bibliografía

- Miller NE, Thelle DS, Førde OH, Mjos OD. The Troms. Heart Study: high-density lipoprotein and coronary heart disease. A case-control study. *Lancet* 1977;1:1965-8.
- Tall AR, Breslow JL. Plasma high-density lipoproteins and atherosclerosis. En: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers, 1996;7: p. 105-28.
- Breslow JL. Familial disorders of high-density lipoprotein metabolism. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995; p. 2031-52.
- National Cholesterol Education Program. Detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). National Institutes of Health, NIH Publication N° 93-3095. *Circulation* 1993;89:1329-45.
- Third JLHC, Montag J, Flynn M, Freidel J, Laskarzewski P, Glueck CJ. Primary and familial hypoalphalipoproteinemia. *Metabolism* 1984;33:136-46.
- Ginsburg GS, Ozer J, Karathanasis SK. Intestinal apolipoprotein AI gene transcription is regulated by multiple distinct DNA elements and is synergistically activated by the orphan nuclear receptor, hepatocyte nuclear factor 4. *J Clin Invest* 1995;96:528-38.
- Walsh A, Azrolan N, Wang K, Mascigiano A, O'Connell A, Breslow JL. Intestinal expression of the human apo A-I gene in transgenic mice is controlled by a DNA region 3' to the gene in the promoter of the adjacent convergently transcribed apo C-III gene. *J Lipid Res* 1993;34:617-23.
- Jones DR, Leffak M. A bifunctional regulatory element of the human apo A-I gene responsive to a distal enhancer. *DNA Cell Biol* 1999;2:107-19.
- Jeeah M, Kessling A, Miller N, Humphries SE. G to A substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI and high density lipoprotein cholesterol concentrations. *Mol Biol Med* 1990;7:233-41.
- Pagani F, Giudici GA, Baralle FE, Vergani C. Association of a polymorphism in the ApoAI gene promoter with hyperalphalipoproteinemia. *Eur J Epidemiol* 1992;8:54-8.
- Marasco O, Melina F, Mele E, Quaresima B, Zingone A, Focarelli E, et al. Linkage disequilibrium of three polymorphic RFLP markers in the apolipoprotein AI-CIII gene cluster on chromosome 11. *Hum Genet* 1993;91:169-74.
- Talmud PJ, Ye S, Humphries SE. Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A-I gene associated with differences in apolipoprotein levels: the European Atherosclerosis Research Study. *Genet Epidemiol* 1994;11:265-80.
- López-Miranda J, Ordovás JM, Espino A, Marín C, Salas J, López-Segura F, et al. Influence of mutation in human apolipoprotein A-I gene promoter on plasma LDL cholesterol response to dietary fat. *Lancet* 1994;343:1246-9.
- Angotti E, Mele E, Costanzo F, Avvedimento EV. A polymorphism (G->A transition) in the -78 position of the apolipoprotein A-I promoter increases transcription efficiency. *J Biol Chem* 1994;269:17371-4.
- Smith JD, Brinton EA, Breslow JL. Polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene promoter region. Association of the minor allele with decreased production rate in vivo and promoter activity in vitro. *J Clin Invest* 1992;89:1796-800.
- Danek GM, Valenti M, Baralle FE, Romano M. The A/G polymorphism in the -78 position of the apolipoprotein A-I promoter does not have a direct effect on transcriptional efficiency. *Biochim Biophys Acta* 1998;1398:67-74.
- Dammerman M, Sandkuyl LA, Halaas JL, Chung W, Breslow JL. An apolipoprotein CIII haplotype protective against hypertriglyceridemia is specified by promoter and 3' untranslated region polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4562-6.
- Suruchov AP, Page GP, Smith L, Patsch W, Boerwinkle E. Polymorphic markers in apolipoprotein C-III gene flanking regions and hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:941-7.
- Shoulders CC, Grantham TT, North JD, Gaspardone A, Tomai F, De Fazio A, et al. Hypertriglyceridemia and the apolipoprotein CIII gene locus: lack of association with the variant insulin response element in Italian school children. *Hum Genet* 1996;98:557-66.
- Ginsburg GS, Satoshi N, Ginsberg H, Glickman RM. A common genetic variant upstream of the apoCIII gene coordinately controls intestinal expression of the human apoAI and apoAIV genes. *Circulation* 1996;94:1591.
- Naganawa S, Ginsberg HN, Glickman RM, Ginsburg GS. Intestinal transcription and synthesis of apolipoprotein AI is regulated by five natural polymorphisms upstream of the apolipoprotein CIII gene. *J Clin Invest* 1997;99:1958-65.

22. Civeira F, Pocoví M, Moreda A, Alamillo JA, Cía P, Grande F. Niveles de colesterol y triglicéridos y distribución del colesterol en lipoproteínas en una población laboral. Varones (I). *Clin Invest Arterioscler* 1990;2:43-7.
23. Moreda A, Alamillo JA, Pocoví M, Civeira F, Blasco M, Ordovás JM. Niveles de colesterol y triglicéridos y distribución del colesterol en lipoproteínas en una población laboral. Mujeres (II). *Clin Invest Arterioscler* 1990;2:48-54.
24. Ogami K, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Zannis VI. Promoter elements and factors required for hepatic and intestinal transcription of the human apo CIII gene. *J Biol Chem* 1990;265: 9808-15.
25. Shoulders CC, Komblith AR, Munro BS, Baralle FE. Gene structure of human apolipoprotein AI. *Nucleic Acids Res* 1983;11: 2827-37.
26. Rees A, Shoulders CC, Stocks J, Galton DJ, Baralle FE. DNA polymorphism adjacent to human apoprotein A-1 gene: relation to hypertriglyceridemia. *Lancet* 1983;1:444-6.
27. Long JC, Williams RC, Urbanek M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 1995;56:799-810.
28. Li WW, Dammerman MM, Smith JD, Metzger S, Breslow JL, Leff T. Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1995;96:2601-5.
29. Wang C, McConathy WJ, Kloer HJ, Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins: effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest* 1985;75:384-90.
30. Ordovás JM, Civeira F, Genest J, Craig S, Robbins AH, Meade T, et al. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1991;87:75-86.
31. Shoulders CC, Harry PJ, Lagrost L, White SE, Shah NF, North JD, et al. Variation at the apo AI-CIII-AIV gene complex is associated with elevated plasma apo CIII. *Atherosclerosis* 1991;87:238-47.
32. De Lorenzo F, Monticelli A, Cocozza S. SstI apo AI-CIII DNA polymorphism associated with lower levels of HDL cholesterol in a young population from south of Italy. *Aust J Hum Genet* 1993; 23:711-2.
33. Price WH, Morris SW, Burgon R, Donald PM, Kitchin AH. Apolipoprotein CIII polymorphism and coronary heart disease. *Lancet* 1986;2:1041.
34. Cenarro A. Bases genéticas de la hipoalfalipoproteinemia y disbetaalipoproteinemia [tesis doctoral]. Universidad de Zaragoza, 1994.
35. Cooper DN, Clayton JF. DNA polymorphism and the study of disease associations. *Hum Genet* 1988;78:299-312.
36. Paul H, Galton D, Stocks J. DNA polymorphic patterns and haplotype arrangements of the apo A-I, apo C-III, apo A-IV gene cluster in different ethnic groups. *Hum Genet* 1987;75:264-8.