

# Asociación entre el gen de la *cellular retinoic acid binding protein (CRABP2)* y valores elevados de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad

Juliana Salazar<sup>a</sup>, Montse Guardiola<sup>a</sup>, Raimon Ferré<sup>a</sup>, Blai Coll<sup>a</sup>, Carlos Alonso-Villaverde<sup>a</sup>, Brigitte M. Winklhofer-Roob<sup>b</sup>, Edmond Rock<sup>c</sup>, Joan D. Fernández-Ballart<sup>a</sup>, Fernando Civeira<sup>d</sup>, Miguel Pocoví<sup>c</sup>, Lluís Masana<sup>a</sup> y Josep Ribalta<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut de Recerca en Ciències de la Salut. Hospital Universitari Sant Joan. Universitat Rovira i Virgili. Reus. Tarragona. España.

<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. Francia.

<sup>d</sup>Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. España.

<sup>e</sup>Departamento de Bioquímica. Biología Molecular y Celular. Universidad de Zaragoza. España.

**Introducción.** La vía de señalización del ácido retinoico (AR) media la transcripción inducida por ligando de genes del metabolismo lipídico a través de los receptores nucleares, receptor X de retinoico y receptor de AR, y del coactivador proteína de unión al AR tipo II. Se ha establecido una asociación entre esta vía de señalización y las alteraciones lipídicas en trastornos como la hiperlipemia familiar combinada y la hiperlipemia inducida por el tratamiento con inhibidores de la proteasa (IP) en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Nuestro objetivo ha sido comprobar la hipótesis según la cual el gen *CRABP2* estaría involucrado en la modulación de la dislipemia.

**Sujetos y métodos.** Se ha realizado un estudio de asociación del polimorfismo -394T>C del promotor de *CRABP2* en 3 poblaciones independientes (299 individuos sanos, 182

pacientes con infección por el VIH y 151 pacientes con hipercolesterolemia familiar [HF]). Todas las analíticas se determinaron en ausencia de tratamiento hipolipemiante. Se realizó ANOVA ajustando por edad, índice de masa corporal, sexo, 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 colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) del 13% ( $p = 0,020$ ). En los pacientes infectados por el VIH, se realizó un análisis multivariante de 4 medidas tomadas durante 1 año, y se observó que los valores de cLDL eran significativamente más elevados 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 concentración de cLDL del 16% ( $p = 0,038$ ). El alelo C estaba sobrerrepresentado en individuos hipercolesterolémicos ( $p = 0,001$ ).

**Conclusiones.** 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.

**Palabras clave:**

CRABP-II (proteína de unión al ácido retinoico tipo II).

CRABP2 (gen de la proteína de unión al ácido retinoico tipo 2). Polimorfismo. Hiperlipemia.

Este trabajo ha recibido una de las 30 menciones especiales a las mejores comunicaciones presentadas en las distintas áreas del XIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis-Santander 2006.

Correspondencia: Dr. J. Ribalta.  
Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi.  
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut.  
Universitat Rovira i Virgili.  
Sant Llorenç, 21. 43201 Reus. Tarragona. España.  
Correo electrónico: josep.ribalta@urv.cat

Recibido el 20-6-2007 y aceptado el 4-7-2007.

## RELATIONSHIP BETWEEN CELLULAR RETINOIC ACID BINDING PROTEIN II GENE (CRABP2) AND INCREASED LDL CHOLESTEROL

**Introduction.** The retinoic acid (RA) signaling pathway regulates the transcription of target genes which control lipid metabolism mediated by the ligand of the nuclear receptors, retinoic X receptor and RA receptor, and the cofactor cellular RA binding protein-II. Interestingly, this signaling pathway has been associated with disorders of lipid metabolism such as familial combined hyperlipidemia (FCHL) and the hyperlipidemia secondary to antiretroviral HIV treatment with protease inhibitors (PI). We sought evidence for the hypothesis that the *CRABP2* gene is involved in the regulation of lipid metabolism.

**Subjects and methods.** We performed association studies using the promoter -394T>C polymorphism of the *CRABP2* gene in 3 different cohorts (299 healthy males, 182 HIV-infected patients and 151 patients with familial hypercholesterolemia [FH]). All cholesterol measurements were in the absence of any lipid lowering agents. ANOVA was performed on the data adjusted for age, BMI, gender and PI use.

**Results.** The frequency of the C allele was 0.03 in the 3 groups. Among healthy males, carriers of the C allele had 9% higher total plasma cholesterol ( $p = 0.027$ ) and 13% higher LDLc concentrations ( $p = 0.020$ ). In HIV-infected patients, a multivariate analysis of 4 measurements over a one year period showed that carriers of the C allele had significantly higher LDLc of between 10 and 31% ( $p = 0.001$ ) compared with non-carriers of the allele. FH patients who were carriers of the C allele had a 16% increase in LDLc ( $p = 0.038$ ). The C allele was significantly over-represented among hypercholesterolemic patients ( $p = 0.001$ ).

**Conclusions.** Our results show that the *CRABP2* gene, a member of the retinoid signaling pathway, is associated with increased plasma LDLc concentrations.

### Key words:

CRABP-II (cellular retinoic acid binding protein-II). *CRABP2* (cellular retinoic acid binding protein-II gene). Polymorphism. Hyperlipidemia.

## Introducción

La hiperlipemia es un factor de riesgo cardiovascular para la población general y constituye la principal causa de mortalidad en las sociedades oc-

cidentales. La hiperlipemia puede tener su origen en una combinación de factores ambientales, genéticos y/o farmacológicos, asociados al estilo de vida. La administración de determinados fármacos, como son el ácido retinoico (AR) y sus derivados utilizados en el tratamiento de afecciones dermatológicas y ciertos tipos de cáncer<sup>1</sup>, o el tratamiento antirretroviral con inhibidores de la proteasa (IP) para la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>2</sup>, causa hiperlipemia como efecto secundario. El mecanismo común que podría explicar esta alteración sería una afectación de la vía de señalización del AR, que comportaría una desregulación de genes implicados en el metabolismo lipídico. Genes reguladores importantes de esta vía son los receptores nucleares, receptor X de retinoico (RXR) y receptor de AR (RAR), y la proteína de unión al AR tipo II (CRABP-II)<sup>3</sup>. RXR y RAR son factores de transcripción que actúan como receptores intracelulares de ligandos derivados de colesterol, ácidos grasos, y vitaminas liposolubles que regulan genes diana que median el transporte y el metabolismo lipídico.

Pacientes con hiperlipemia familiar combinada (HFCL) y pacientes con hiperlipemia y lipodistrofia secundaria al tratamiento antirretroviral con IP presentan valores bajos de retinol en plasma<sup>4,5</sup>. En pacientes que reciben tratamiento con IP, la disminución en las concentraciones plasmáticas de retinol es seguida por un aumento en la producción intracelular de AR<sup>5</sup>. La actividad biológica del AR consiste en la activación de receptores para retinoides que actúan como factores de transcripción, dependientes de ligando, en la regulación de la expresión de genes diana. Por lo tanto, un control transcripcional defectivo podría ser una de las causas de las alteraciones lipídicas observadas en estos pacientes.

En condiciones normales, el retinol se cede a la célula como ésteres de retinol por los quilomicronos remanentes, o como retinol unido a la proteína transportadora de retinol (RBP). En la célula, el retinol se oxida a retinal y a AR mediante la acción de deshidrogenasas (RDHs, SDHs, RALDHs). Estos metabolitos son transportados por las proteínas transportadoras de retinol (CRBP-I, CRBP-II) y de AR (CRABP-I, CRABP-II)<sup>6</sup>. CRABP-II transporta el AR del citosol al núcleo donde forma un complejo con el heterodímero RAR:RXR, que permite la unión de AR a los receptores y contribuye a aumentar la actividad transcripcional<sup>7,8</sup>.

Por otro lado, decir que estudios de ligamiento para la HFCL y la lipodistrofia parcial han descrito un *locus* común en la región del genoma 1q21-23, en la que los genes *CRABP-II* y *RXRγ* son claros

candidatos como moduladores de la dislipemia<sup>9,10</sup>. En un trabajo anterior, nuestro grupo identificó una nueva variante en la región promotora del gen *CRABP2*, el polimorfismo -394T>C<sup>11</sup>. En el presente estudio, mediante el uso de este marcador, mostramos una relación entre el gen *CRABP2* y la dislipemia en individuos sanos y en individuos con diferentes condiciones hiperlipémicas. Nuestros resultados muestran que el alelo C está asociado con concentraciones de cLDL significativamente elevadas en individuos sanos, en pacientes con infección por el VIH y en pacientes con hipercolesterolemia familiar (FH), y que el alelo C está sobrerrepresentado en individuos con hipercolesterolemia.

## Sujetos y métodos

### Sujetos y diseño del estudio

El polimorfismo -394T>C del gen *CRABP2* y su influencia en la dislipemia se ha estudiado en 3 poblaciones independientes: varones sanos, pacientes infectados por el VIH y pacientes FH.

Varones sanos: 299 varones sanos, con edades comprendidas entre los 20 y los 75 años, participantes del estudio europeo VITAGE<sup>12</sup>. Los criterios de exclusión aplicados son los descritos en el protocolo SENIEUR<sup>13</sup>.

Pacientes con infección por el VIH: 182 pacientes infectados por el VIH, varones y mujeres, mayores de 18 años, sin enfermedades oportunistas asociadas al sida al inicio del estudio<sup>14,15</sup>.

Pacientes HF: 151 individuos con diagnóstico clínico (MEDPED) y genético de HF. En el diagnóstico genético se utilizó el Lipo-chip®, que permite caracterizar las mutaciones en el gen *LDLR*<sup>16</sup>. Ninguno de los pacientes FH eran portadores de mutaciones en el gen *apo B* causantes de la apo B defectuosa familiar.

El Comité de Ética e Investigación del Hospital Sant Joan de Reus aprobó el estudio. Todos los participantes dieron su consentimiento informado.

### Determinaciones lipídicas

Las medidas se realizaron en estado basal, y en los pacientes con infección por el VIH de forma cuatrimestral durante 1 año de seguimiento. Los valores lipídicos utilizados en este estudio son los registrados antes de iniciar tratamiento hipolipemiante.

La extracción de sangre se realizó tras ayuno de 12 h. El colesterol total y los triglicéridos en plasma y en la fracciones lipoproteicas se midieron mediante equipos enzimáticos (Boehringer Mannheim, Alemania) adaptados para un analizador Cobas Mira Centrifugal (Roche Pharmaceuticals, Suiza) con Precilip EL® y Precinorm® (Boehringer Mannheim, Alemania) como controles de calidad. Las apolipoproteínas (apo) se midieron por inmunoturbidimetría, utilizando antisuero para apo AI y apo B (Boehringer Mannheim, Alemania), para apo E y apo CIII (Daiichi Chemicals, Japón) y para lipoproteína (a) (Lp[a]) (Incstar Corporation, EE.UU.).

### Ultracentrifugación secuencial

Las lipoproteínas plasmáticas se separaron mediante ultracentrifugación secuencial utilizando un rotor de ángulo fijo 45,6 Kontron y una Centrikon 75 (Kontron Instruments, Italia). Las fracciones lipoproteicas separadas fueron lipoproteínas de muy baja densidad (densidad [d] < 1.006 g/ml), lipoproteínas de densidad intermedia (d = 1.006-1.019 g/ml) y

lipoproteínas de muy baja densidad (LDL) (d = 1.019-1.063 g/ml). El colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) se midió tras la precipitación de las lipoproteínas ricas en apo B con polietilenglicol (Immuno AG, Austria). El colesterol unido a LDL (cLDL) se calculó mediante la fórmula de Friedewald.

### Genotipado

El ácido desoxirribonucleico (ADN) se aisló de 10 ml de sangre recogida en un tubo con EDTA por método estándar.

El polimorfismo -394T>C del gen *CRABP2* se determinó mediante una nueva variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) introducida por Hamajima et al<sup>17</sup>, la PCR-CTPP (del inglés *polymerase chain reaction with confronting two pair primers*). La técnica permite la detección de un polimorfismo mediante 2 parejas de *primers* sin otro paso posterior, como la restricción enzimática. Tras la amplificación se obtienen bandas de ADN específicas de cada alelo con tamaños diferentes, que permite el genotipado por electroforesis.

El ADN se amplificó mediante la enzima AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems, California, EE.UU.) en un volumen de reacción final de 10 µl que contenía 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada *primer*, 5% de dimetilsulfóxido y 1 mM de cloruro de magnesio. Los *primers* para el alelo T fueron: F1: 5'-CCGTT GCCT-CACCTAGATCC-3' y R1: 5'-CGGACACCTGGCGACCCCA-3' amplificando una banda de 164 pb; y para el alelo C fueron: F2: 5'-GGGGT CCGCCTGCGGGC-3' y R2: 5'-GCCTTCTCCTGC GCTAGTA-3' amplificando una banda de 237 pb. Una banda no específica de 366 pb se amplifica con los *primers* F1 y R2. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer, y las condiciones fueron: desnaturalización a 94 °C durante 5 min, 9 ciclos de 94 °C durante 30 s, hibridación durante 30 s (la temperatura disminuye 1 °C cada ciclo, de 63 a 55 °C), 72 °C durante 30 s, seguido de 31 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Los fragmentos se separaron por electroforesis en poliacrilamida al 12%. Como controles positivos, se utilizaron un homocigoto para el alelo C y un heterocigoto analizados por secuenciación en un ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, California, EE.UU.).

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS versión 13.0 para Windows. Las variables cuantitativas se presentan como medias con las desviaciones estándar entre paréntesis, o como porcentajes. El efecto del genotipo sobre la variación de los lípidos y lipoproteínas se analizó mediante ANOVA, ajustando por sexo, edad, índice de masa corporal (IMC) y uso de IP (en pacientes con infección por el VIH). Con el test  $\chi^2$  se comprobó que las frecuencias alélicas observadas fueran las esperadas según la ley de equilibrio de Hardy Weinberg. El efecto del genotipo en los valores de colesterol durante el año de seguimiento en los pacientes con infección por el VIH se analizó utilizando ANOVA de medidas repetidas. Se estableció un nivel de significación estadística de  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Varones sanos

La frecuencia genotípica fue del 6% y la alélica, del 0,03. Ningún individuo era homocigoto para el alelo C. Tras ajustar por edad e IMC, los portadores del alelo C presentaban un 9% más de colesterol total ( $p = 0,027$ ) y un 13% más de cLDL ( $p = 0,020$ )

**Tabla 1. Características clínicas de las poblaciones de varones sanos, de pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y de pacientes con hipercolesterolemia familiar (HF), segregados según el genotipo -394T>C del gen de la proteína de unión al ácido retinoico tipo 2**

Variable	Varones sanos		Pacientes VIH		Pacientes HF	
	TT (n = 280)	TC (n = 19)	TT (n = 171)	TC (n = 11)	TT (n = 142)	TC (n = 9)
Edad, años	46,49 ± 15,33	40,80 ± 15,43	38,8 ± 7,1	37,6 ± 4,1	48,4 ± 16,5	51,9 ± 15,2
Sexo, varones	100	100	71	64	46	20*
IMC, kg/m <sup>2</sup>	24,96 ± 2,62	25,21 ± 3,29	23,05 ± 3,16	23,92 ± 3,56	26,06 ± 4,58	25,37 ± 4,42
Colesterol, mmol/l	4,85 ± 0,94	5,12 ± 0,83*	4,77 ± 1,52	4,90 ± 1,58	10,04 ± 1,92	10,59 ± 1,90
Triglicéridos, mmol/l	1,08 ± 0,54	1,06 ± 0,51	2,30 ± 3,06	1,67 ± 0,95	1,50 ± 0,97	1,22 ± 0,53
cHDL, mmol/l	1,27 ± 0,30	1,31 ± 0,40	1,13 ± 0,42	1,19 ± 0,33	1,40 ± 0,39	1,27 ± 0,36
cLDL, mmol/l	2,69 ± 0,73	2,95 ± 0,52*	2,81 ± 0,97	3,32 ± 1,37	8,12 ± 1,64	9,61 ± 1,64*
cVLDL, mmol/l	0,31 ± 0,26	0,32 ± 0,25	0,88 ± 0,72	0,96 ± 0,94	ND	ND

Los valores se presentan como medias ± desviación estándar y porcentajes.

cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; cVLDL: colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad; IMC: índice de masa corporal; ND: no disponibles; TC: heterocigoto en la posición -394 del gen de la proteína de unión al ácido retinoico tipo 2; TT: homocigoto salvaje TT en la posición -394 del gen de la proteína de unión al ácido retinoico tipo 2.

\*p < 0,05.

**Tabla 2. Parámetros lipídicos de la población de varones sanos segregados según el genotipo -394T>C del gen de la proteína de unión al ácido retinoico tipo 2**

Variable	Varones sanos	
	TT (n = 280)	TC (n = 19)
Colesterol plasmático, mmol/l	4,85 ± 0,94	5,12 ± 0,83*
Triglicéridos plasmáticos, mmol/l	1,08 ± 0,54	1,06 ± 0,51
cVLDL, mmol/l	0,31 ± 0,26	0,32 ± 0,25
VLDL triglicéridos, mmol/l	0,60 ± 0,44	0,61 ± 0,43
VLDL apo B, mg/dl	3,33 ± 2,27	3,26 ± 2,30
cIDL, mmol/l	0,20 ± 0,11	0,18 ± 0,08
IDL triglicéridos, mmol/l	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,03
IDL apo B, mg/dl	2,81 ± 1,42	2,42 ± 1,07
cLDL, mmol/l	2,69 ± 0,73	2,95 ± 0,52*
LDL triglicéridos, mmol/l	0,23 ± 0,95	0,17 ± 0,04
LDL apo B, mg/dl	54,90 ± 14,68	58,47 ± 10,98
cHDL, mmol/l	1,32 ± 0,30	1,39 ± 0,40
HDL triglicéridos, mmol/l	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,03
HDL apo AI, mg/dl	112,80 ± 16,75	114,63 ± 24,29
Lp(a) plasmática, mg/dl	23,63 ± 21,77	21,26 ± 15,62
apo AI plasmática, mg/dl	133,91 ± 18,23	133,00 ± 25,38
apo B <sub>100</sub> plasmática, mg/dl	71,54 ± 17,67	74,42 ± 12,55
apo E plasmática, mg/dl	3,48 ± 0,81	3,57 ± 0,63
apo CIII plasmática, mg/dl	15,71 ± 3,41	15,38 ± 3,64

Los valores se presentan como medias ± desviación estándar y porcentajes.

apo: apolipoproteína; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cIDL: colesterol unido a lipoproteínas de densidad intermedia; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; cVLDL: colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; IDL: lipoproteínas de densidad intermedia; IMC: índice de masa corporal; LDL: lipoproteínas de baja densidad; Lp: lipoproteína; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

\*p < 0,05.

que los portadores del alelo T (tablas 1 y 2). Había una tendencia hacia una elevación de los valores de apo B en la fracción LDL en estos individuos, sugiriendo un mayor número de partículas LDL.

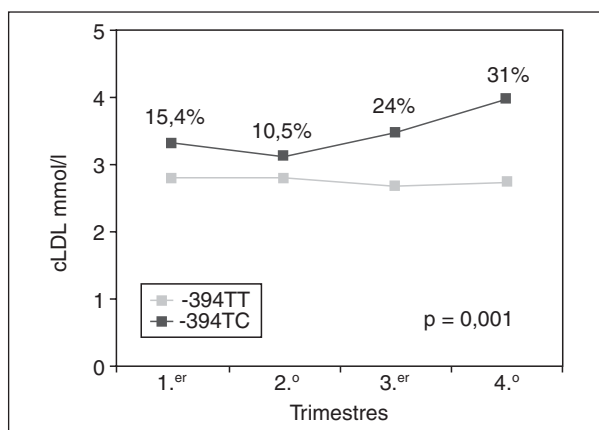
#### *Pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana*

De los 182 pacientes con infección por el VIH, 171 eran homocigotos para el alelo T y 11 heterocigotos para el alelo C; la frecuencia genotípica fue del 6%, mientras que la alélica fue del 0,03. Ambos grupos eran comparables en edad, sexo, estado inmunológico, colesterol total, cHDL y triglicéridos (tabla 1). Tras ajustar por edad, sexo, IMC y tratamiento con IP, el análisis de las 4 medidas realizadas en 1 año indicó que los portadores del alelo C, comparado con los no portadores, presentaban de forma significativa valores mayores de cLDL, y que éstos oscilan entre un 10 y un 31% (p = 0,001) (fig. 1).

Para aumentar la potencia estadística se analizaron conjuntamente las 2 poblaciones (varones sanos y pacientes infectados por el VIH) y se confirmó la elevación del cLDL en los portadores del alelo C (p = 0,007).

#### *Pacientes con hipercolesterolemia familiar*

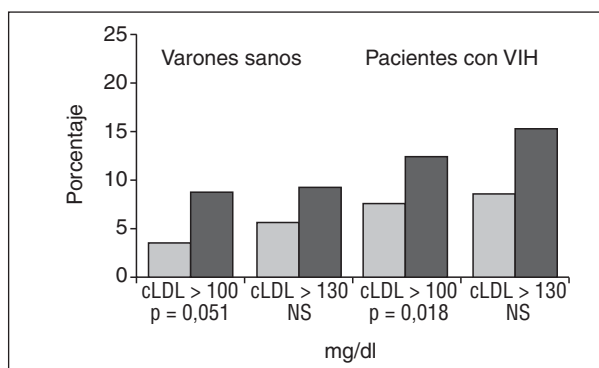
Las frecuencias genotípicas y alélicas fueron del 6% y 0,03, respectivamente. Ningún individuo era homocigoto para el alelo C. Los análisis se realizaron ajustando por edad, sexo e IMC mostrando un 16% de aumento en la concentración de cLDL (p = 0,038) en los portadores del alelo C (tabla 1). El polimorfismo -394T>C no segrega con xantomas, xantelasmas o arco corneal.



**Figura 1.** Cambios en el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) plasmático de los pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana durante 1 año de seguimiento, segregados según el genotipo -394T>C del gen de la proteína de unión al ácido retinoico tipo 2. Los portadores del alelo C presentaban valores superiores que oscilaban entre el 10 y el 31% ( $p = 0,001$ ), comparado con los no portadores. TC: heterocigoto en la posición -394 del gen de la proteína de unión al ácido retinoico tipo 2; TT: homocigoto salvaje TT en la posición -394 del gen de la proteína de unión al ácido retinoico tipo 2.

#### Frecuencias del genotipo -394T>C segregadas según los valores de corte para cLDL utilizados en la práctica clínica

Finalmente, para establecer la relevancia clínica de estos resultados, se analizó la distribución del alelo C según los valores de corte para el cLDL uti-



**Figura 2.** Distribución del alelo C según los puntos de corte en prevención primaria y secundaria de la hiperlipemia. El alelo C era 2,4 veces más frecuente en individuos sanos y 1,6 veces más frecuente en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) > 100 mg/dl, comparado con los individuos con cLDL < 100 mg/dl. Un cLDL < 100 mg/dl es el objetivo en prevención secundaria de enfermedad cardiovascular, por lo que una sobrerepresentación de los portadores del alelo C con valores > 100 mg/dl indica una contribución del gen de la proteína de unión al ácido retinoico tipo 2 a la hipercolesterolemia. NS: no significativo.

lizados en prevención primaria (cLDL > 130 mg/dl) y secundaria (cLDL > 100 mg/dl) para la hipercolesterolemia. Se observó una clara tendencia a una sobrerepresentación del alelo C en las categorías hipercolesterolemias (fig. 2), concretamente en pacientes HF. La frecuencia de los portadores del alelo C fue de un 15% en el tercil superior de la concentración de cLDL, comparado con un 2 y un 0% en los terciles inferiores ( $p = 0,001$ ).

#### Discusión

Nuestros resultados muestran que variaciones en el gen *CRABP2* están asociadas con elevaciones en las concentraciones de cLDL. El hecho de que estas elevaciones se produzcan tanto en varones sanos, como en pacientes infectados por el VIH y en pacientes HF, y de que la magnitud sea de relevancia clínica en todos los grupos, implica un papel relevante del gen *CRABP2* en la modulación de las concentraciones de cLDL en el ámbito poblacional.

Debido a que aproximadamente el 80% de las hipercolesterolemias primarias son de origen poligénico, la identificación de genes con una influencia significativa en las concentraciones plasmáticas de colesterol facilita el diagnóstico y el tratamiento de estos pacientes y de la población que pueda presentar una predisposición hacia la hiperlipemia.

Los retinoides ejercen sus efectos biológicos y farmacológicos y regulan la expresión de genes que controlan el metabolismo lipídico en los ámbitos transcripcional y postranscripcional. Los retinoides son ligandos para los receptores retinoides, RAR y RXR. RXR forma heterodímeros con RAR y otros receptores nucleares, como PPAR, LXR y FXR, todos ellos moduladores del metabolismo lipídico<sup>18</sup>. El papel de CRABP-II en este proceso es el de ceder el ligando al núcleo y actuar como cofactor en la unión del heterodímero RAR:RXR a secuencias de ADN reguladoras. Una sobreexpresión de CRABP-II aumenta la transactivación de genes diana para retinoides<sup>7,8,19,20</sup>.

El gen *CRABP2* está codificado en la región 1q21-23, que se ha ligado a enfermedades que cursan con dislipemia, como la HFCL<sup>9</sup>, la diabetes mellitus tipo 2<sup>21</sup> y la lipodistrofia parcial<sup>10</sup>. En un estudio anterior, nuestro grupo identificó 2 polimorfismos en la región promotora de este gen en pacientes HFCL<sup>11</sup>. Utilizando el más frecuente de los 2 polimorfismos, el -394T>C (frecuencia alélica 0,03), observamos una relación entre *CRABP2* y el metabolismo lipídico. En el grupo de 299 varones sanos, hemos encontrado que los portadores del alelo C presentan concentraciones de cLDL supe-

riores a los portadores del alelo T en un 9%. De esta población, disponemos del perfil lipídico completo y el único parámetro afectado de forma significativa por el polimorfismo es el cLDL junto con el número de partículas de LDL que tienen una tendencia a aumentar. Por otro lado, los pacientes con infección por el VIH portadores del alelo C también presentaban un cLDL más elevado en los 4 análisis realizados en un período de 1 año; estas concentraciones más elevadas oscilaban entre un 10 y un 30%. Para confirmar el efecto del genotipo en el cLDL, se analizó una población diagnosticada de HF y, de nuevo, obtuvimos como resultado una elevación del 16% de las concentraciones de cLDL en los portadores del alelo C no tratadas con fármacos hipolipemiantes.

El mecanismo por el cual el gen *CRABP2* se asocia a elevaciones de cLDL es desconocido, pero podría estar relacionado con alteraciones en el catabolismo de las lipoproteínas. La conversión de colesterol a ácidos biliares y el transporte reverso de colesterol son procesos clave en la regulación de los valores de colesterol circulantes. LXR y FXR son receptores nucleares que funcionan como sensores intracelulares de esteroides y ácidos biliares, respectivamente, y actúan como reguladores del transporte reverso de colesterol, del catabolismo del colesterol y del metabolismo de los ácidos biliares<sup>22</sup>. Éstos forman heterodímeros permisivos con RXR que pueden activarlos tanto agonistas de RXR, como de LXR/FXR. Las alteraciones en los valores de expresión y en la disponibilidad de ligando para RXR, un proceso en el que CRABP-II tiene un papel importante, pueden afectar al control de la homeostasis del colesterol<sup>23-25</sup>. Además, CRABP-II se expresa en el hígado<sup>26</sup>, un órgano clave en este proceso.

La variante -394 está contenida en la secuencia GCGACCCAC homóloga a la secuencia del *sterol regulatory element (SRE) like* reconocida por SREBP1. SREBP son factores de transcripción que responden a concentraciones de esteroides intracelulares y que regulan genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos y del colesterol. El cambio de T por C podría destruir la secuencia *SRE-like*<sup>27,28</sup> y, por lo tanto, alterar la función reguladora de CRABP-II.

Para concluir, nuestros resultados muestran que las variaciones en el gen *CRABP2* están asociadas a elevaciones de entre un 9 y un 31% del cLDL, que son relevantes en clínica, aunque se requieren más estudios que ayuden a establecer la significación de esta asociación, así como su mecanismo de acción.

## Bibliografía

- Bershad S, Rubinstein A, Paterniti JR, Le NA, Poliak SC, Heller B, et al. Changes in plasma lipids and lipoproteins during isotretinoin therapy for acne. *N Engl J Med*. 1985;313:981-5.
- Periard D, Telenti A, Sudre P, Cheseaux JJ, Halfon P, Reymond MJ, et al. Atherogenic dyslipidemia in HIV-infected individuals treated with protease inhibitors. The Swiss HIV Cohort Study. *Circulation*. 1999;100:700-5.
- Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, et al. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev*. 1992;6:329-44.
- Ribalta J, LaVigne AE, Girona J, Vallve JC, Masana L. Low plasma vitamin A concentrations in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem*. 1997;43:2379-83.
- Toma E, Devost D, Chow Lan N, Bhat PV. HIV-protease inhibitors alter retinoic acid synthesis. *AIDS*. 2001;15:1979-84.
- Napoli JL. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996;80:S52-62.
- Delva L, Bastie JN, Rochette-Egly C, Kraiba R, Balitrand N, Despouy G, et al. Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol*. 1999;19:7158-67.
- Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, Noy N. Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signalling by retinoic acid. *J Biol Chem*. 1999;274:23695-8.
- Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, Porkka KV, Ylitalo K, Pihlajamäki J, et al. Linkage of familial combined hyperlipidaemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet*. 1998;18:369-73.
- Peters JM, Barnes R, Bennett L, Gitomer WM, Bowcock AM, Garg A. Localization of the gene for familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) to chromosome 1q21-22. *Nat Genet*. 1998;18:292-5.
- Salazar J, Ferre R, Vallve JC, Pocovi M, Cabezas MC, Masana L, et al. Two novel single nucleotide polymorphisms in the promoter of the cellular retinoic acid binding protein II gene (CRABP-II). *Mol Cell Probes*. 2003;17:21-3.
- Rock E, Winkhofer-Roob BM, Ribalta J, Scotter M, Vasson MP, Brtko J, et al. Vitamin A, vitamin E and carotenoid status and metabolism during ageing: functional and nutritional consequences (VITAGE PROJECT). *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2001;11:70-3.
- Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, et al. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev*. 1984;28:47-55.
- Alonso-Villaverde C, Coll B, Parra S, Montero M, Calvo N, Tous M, et al. Atherosclerosis in patients infected with HIV is influenced by a mutant monocyte chemoattractant protein-1 allele. *Circulation*. 2004;110:2204-9.
- Coll B, Alonso-Villaverde C. Carotid intima-media thickness: assessment of sub-clinical atherosclerosis in HIV-infected patients. *AIDS*. 2005;19:1936-7.
- Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jiménez E, López M, Tejedor MT, et al. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin Chem*. 2005;51:1137-44.
- Hamajima N, Saito T, Matsuo K, Tajima K. Competitive amplification and unspecific amplification in polymerase chain reaction with confronting two-pair primers. *J Mol Diagn*. 2002;4:103-7.
- Shulman AI, Mangelsdorf DJ. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med*. 2005;353:604-15.
- Jing Y, Waxman S, Mira-y-López R. The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signalling in breast cancer cells. *Cancer Res*. 1997;57:1668-72.
- Bastie JN, Despouy G, Balitrand N, Rochette-Egly C, Chomienne C, Delva L. The novel co-activator CRABP-II binds to RARalpha and RXRalpha via two nuclear receptor interacting domains and does not require the AF-2 'core'. *FEBS Lett*. 2001;507:67-73.
- Elbein SC, Hoffman MD, Teng K, Leppert MF, Hasstedt SJ. A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes*. 1999;48:1175-82.
- Redinger RN. Nuclear receptors in cholesterol catabolism: molecular biology of the enterohepatic circulation of bile salts and its role in cholesterol homeostasis. *J Lab Clin Med*. 2003;142:7-20.

23. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*. 2000;289:1524-9.
24. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*. 2000;6:507-15.
25. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, et al. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 257:29-33.
26. Kindmark A, Torma H, Johansson AG, Ljunghall S, Melhus H. Cellular retinoic acid-binding protein type II is expressed in adult human osteoblasts and in adult liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;189:1397-403.
27. Mater MK, Thelen AP, Pan DA, Jump DB. Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J Biol Chem*. 1999;274:32725-2.
28. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109:1125-31.