



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES
ALÉLICAS CON POSIBLE EFECTO
FUNCIONAL EN EL GEN DE LA LIPASA
HEPÁTICA COMO MODULADORAS DE LOS
NIVELES DE COLESTEROL HDL EN
INDIVIDUOS MEXICANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:
MARÍA TERESA GUERRA GARCÍA



Tutor: Dra. María Teresa Tusié Luna

México, D. F., Agosto 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES ALÉLICAS CON POSIBLE EFECTO FUNCIONAL EN EL GEN DE LA LIPASA HEPÁTICA COMO MODULADORAS DE LOS NIVELES DE COLESTEROL HDL EN INDIVIDUOS MEXICANOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. María Teresa Tusié Luna en el laboratorio de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. María Teresa Tusié Luna	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Carmen Gómez Eichelmann	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Carmen Gómez Eichelmann	IIB, UNAM
Vocal	Dr. Armando Tovar Palacio	INCMNSZ
Secretario	Dra. Marta Menjívar Iraheta	FQ, UNAM
Suplente	Dr. José Pegraza Chaverri	FQ, UNAM
Suplente	Dr. Félix Recillas Targa	IFC, UNAM

La verdadera ciencia enseña por encima de todo, a dudar y a ser ignorante.

Miguel De Unamuno

El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A Dios por que gracias a sus dones y beneficios he podido concluir esta etapa de mi vida profesional.

Muy especialmente a la Dra. María Teresa Tusié Luna por su apoyo y la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A los Doctores Carlos Aguilar Salinas, María Teresa Villarreal Molina y Samuel Canizales Quinteros, por su colaboración en la realización de este proyecto.

A Maribel Rodríguez por su apoyo técnico.

A los profesores de posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM que contribuyeron en mi formación profesional.

A los Doctores Carmen Gómez, Armando Tovar, Marta Menjívar, José Pedraza y Félix Recillas, por sus comentarios y sugerencias en la realización de esta tesis.

A Alice y Pao por su gran ayuda.

A todos los miembros de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica; todos ellos han sido mis tutores, gracias por compartirme su experiencia.

A los participantes en este estudio, sin su cooperación no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mi padre, quien continuará viviendo en mi memoria.

A mi madre, por el amor incondicional que día a día me obsequia.

A mis hermanos: Rosy, Felisa, Rafa, Salvador, Martha, Lucy, Isabel, Francis, Juan y Carmen.

A mis hermosos sobrinos: Pablo, Came, Montse, Andrea, Ale, July, Leví, Eddy, Ariana, Javier Andrio y lucecita.

A mis cuñados: Pilar, Alejandro, Pablo y Javier, gracias por formar parte de la familia

A mis amigos con quien un día abordé el barco de la vida universitaria: Maura, Juan Pablo, Ramón, Itzel, Fernanda y Liz.

A mis amigas Diana, Sonia, Blanca y Montse, quienes siempre están pendientes de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS HDL	1
3. BIOSÍNTESIS DE LAS HDL	4
4. METABOLISMO INTRAVASCULAR DE LAS HDL	6
5. CAPTACIÓN DE LAS PARTÍCULAS HDL POR EL HÍGADO Y TEJIDOS ESTEROIDOGÉNICOS	9
6. LA ACTIVIDAD DE LA LH Y EL METABOLISMO DE LÍPIDOS	11
7. LA LH PROMUEVE LA CAPTACIÓN SELECTIVA DE ÉSTERES DE COLESTEROL PROVENIENTES DE LAS HDL VIA EL RECEPTOR SRB-1	12
8. ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA IDENTIFICAR VARIANTES ALÉLICAS QUE MODIFICAN LOS NIVELES DE COLESTEROL HDL	14
9. ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA LH	16
9.1. EXISTEN ELEMENTOS DE RESPUESTA QUE REPRIMEN DE MANERA IMPORTANTE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA LH	17
9.2. LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ARP-1 Y HNF4α COMPITEN POR LA UNIÓN A UNA SECUENCIA DR1 EN EL PROMOTOR DEL GEN DE LA LH	20
9.3. EL FACTOR NUCLEAR HNF1α AUMENTA LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA LH	22
9.4. EL RECEPTOR FXR REPRIME LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA LH	23
9.5. LOS ESTRÓGENOS REGULAN LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA LH	24
9.6. EL USF INCREMENTA LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA LH Y LA VARIANTE -514 C>T DISMINUYE ESTE EFECTO	25
10. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA LH	28
11. SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA LH	31
12. DEFICIENCIA GENÉTICA DE LH	32
13. FACTORES QUE MODIFICAN LA ACTIVIDAD Y LOS NIVELES DE LH	34
14. JUSTIFICACIÓN	37
15. HIPÓTESIS	38

16. OBJETIVO GENERAL	38
17. OBJETIVOS PARTICULARES	38
18. MATERIALES Y MÉTODOS	39
18.1. SUJETOS DE ESTUDIO	39
18.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	39
18.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	39
18.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA	39
18.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y ANTROPOMÉTRICOS	39
18.4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA LA BÚSQUEDA DE VARIANTES ALÉLICAS EN EL GEN DE LA <i>LH</i>	40
18.4.1. TOMA DE MUESTRA	40
18.4.2. OBTENCIÓN DEL DNA GENÓMICO	40
18.4.3. INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL DNA	41
18.4.4. REACCIÓN DE PCR	41
18.4.4.1. FUNDAMENTO	41
18.4.4.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA TÉCNICA DE PCR	42
18.4.5. TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE DNA	43
18.4.5.1. FUNDAMENTO	43
18.4.5.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE DNA	44
18.4.6. PREDICCIÓN TEÓRICA DE LOS EFECTOS DE LAS VARIANTES NO SINÓNIMAS DE LA SECUENCIA CODIFICANTE	45
18.4.6.1. FUNDAMENTO	45
18.4.6.2. CONDICIONES DEL ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	45
19. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
19.1. VARIANTES ALÉLICAS PRESENTES EN AMBOS GRUPOS	46
19.2. VARIANTES EXCLUSIVAS DE ALGUNO DE LOS GRUPOS	54
19.2.1. VARIANTES DEL PROMOTOR	54
19.2.2. VARIANTES DE LA SECUENCIA CODIFICANTE	58
20. CONCLUSIONES	64
21. PERSPECTIVAS	66
22. BIBLIOGRAFÍA	67

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

FIGURAS

Figura 1. Estructura y composición de las HDL.....	2
Figura 2. Biosíntesis y metabolismo de las HDL.....	5
Figura 3. Metabolismo intravascular de las HDL.....	9
Figura 4. Captación de las HDL.....	10
Figura 5. Estructura del gen de la <i>LH</i>	18
Figura 6. Dominios de la LH humana.....	30
Figura 7. Resultados del análisis bioinformático de la variante N215S.....	50
Figura 8. Alineamiento local de la secuencia contigua al residuo N215 de la LH humana.....	50
Figura 9. Resultados del análisis bioinformático de la variante V95M.....	53
Figura 10. Alineamiento local de la secuencia contigua al residuo V95 de la LH humana.....	53
Figura 11. Promotor del gen de la <i>LH</i> humana.....	56
Figura 12. Resultados del análisis bioinformático de la variante S289F.....	60
Figura 13. Alineamiento local de la secuencia contigua al residuo S289 de la LH humana.....	60
Figura 14. Resultados del análisis bioinformático de la variante Q355R.....	61
Figura 15. Alineamiento local de la secuencia contigua al residuo Q355 de la LH humana.....	61
Figura 16. Resultados del análisis bioinformático de la variante R135C.....	62
Figura 17. Alineamiento local de la secuencia contigua al residuo R135 de la LH humana.....	62

TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el estudio del gen de la <i>LH</i>	43
Tabla 2. Características generales de los sujetos de estudio.....	46
Tabla 3. Perfil lipídico y química sanguínea de los sujetos de estudio.....	46
Tabla 4. Variantes identificadas en ambos grupos en el promotor del gen de la <i>LH</i>	48
Tabla 5 Variantes identificadas en ambos grupos intrón 1, exón 3, exón 4 e intrón 5.....	49
Tabla 6. Variantes identificadas en ambos grupos en el exón 5 e intrón 7.....	51
Tabla 7. Variantes exclusivas de grupo localizadas en el promotor del gen de la <i>LH</i>	55
Tabla 8. Comparación de los porcentajes de subfracciones de HDL.....	56
Tabla 9. Variantes exclusivas de grupo localizadas en la secuencia codificante del gen de la <i>LH</i> ..	59

ANEXOS

Anexo 1. Carta de consentimiento informado.....	85
Anexo 2. Cuestionario. Hoja de recolección de datos.....	86

ABREVIATURAS

aa: aminoácido(s)

ABCA1: ATP binding cassette transporter, transportador ABCA1

AF-1: activation function 1, función de activación 1

AF-2: activation function 2, función de activación 2

AlbD: C/EBP D site from the albumin promoter, sitio C/EBP del promotor de albúmina

AML12: alpha-mouse liver-12

AP-1: activating protein 1, proteína activadora 1

APOA5: apolipoproteína V

ApoA-I: apolipoproteína A-I

ApoA-II: apolipoproteína A-II

ApoA-IV: apolipoproteína A-IV

ApoB-100: apolipoproteína B-100

ApoC-I: apolipoproteína C-I

ApoC-II: apolipoproteína C-II

ApoC-III: apolipoproteína C-III

ApoD: apolipoproteína D

ApoE: apolipoproteína E

ApoL-I: apolipoproteína L-I

ApoM: apolipoproteína M

ARP-1: apolipoprotein A-I regulatory protein-1, proteína regulatoria de la apolipoproteína A-I

Asp: ácido aspártico

C/EBP: CCAAT enhancer-binding protein, proteína de unión al “enhancer” CCAAT

CAT: chloramphenicol acetyltransferase, cloranfenicol: acetiltransferasa

CDP: CCAAT displacement protein, proteína desplazadora CCAAT

células CHO: chinese hamster ovary, células ovaricas de hamster

CETP: cholesteryl ester transfer protein, proteína transferidora de ésteres de colesterol

CL: colesterol libre

c-Myb: cellular myeloblastosis oncogene, oncogen de mieloblastosis celular

CT: colesterol total

CYP7A1: cholesterol-7-hydroxylase, colesterol -7-hidroxilasa

DNA: deoxyribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico

DNasa I: enzima DNasa 1

DR1: direct repeats 1, repetidas directas 1

DR4: direct repeats 4, repetidas directas 4

EAC: enfermedad arterial coronaria

EC: ésteres de colesterol

EMBL: european molecular biology laboratory

EMSA: electrophoretic mobility shift assay, ensayo de “retardamiento” electroforético

FL: fosfolípidos

FXR: farnesoid X receptor, receptor X del farnesoilo

G6-fosfatasa: Glucosa -6-fosfatasa

Gly: glicina

HDL: high density lipoproteins, lipoproteínas de alta densidad

HepG2: human hepatoblastoma cells, células humanas de hepatoblastoma

His: histidina

HNF1 α : hepatocyte nuclear factor-1 alpha, factor nuclear de hepatocito 1 α

HNF4 α : hepatocyte nuclear factor- 4 alpha, factor nuclear de hepatocito 4 α

HuH7: human hematoma 7 cells, células 7 de hepatoblastoma

IDL: intermediate density lipoproteins, lipoproteínas de densidad intermedia
 IMC: índice de masa corporal
 INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
 LCAT: lecitin: colesterol acyltransferase, lecitina: colesterol aciltransferasa
 L-CPTI: L-carnitine palmitoyltransferase I, L-carnitina palmitoiltransferasa I
 LDL: low density lipoproteins, lipoproteínas de baja densidad
 LDLR: LDL receptor, receptor de las LDL
 LH: lipasa hepática
 LH2: lipoxigenasa
 L-PK: L-type pyruvate kinase, piruvato cinasa tipo L
 LPL: lipoprotein lipase, lipoproteína lipasa
 Lp-PLA2: lipoprotein-associated phospholipase A2, fosfolipasa A2 asociada a la lipoproteína
 LRP: LDL-receptor-related protein, proteína relacionada con el receptor de las LDL
 NCBI: national center for biotechnology information, centro nacional para la información biotecnológica
 NF1: nuclear factor 1, factor nuclear 1
 NFY: nuclear factor Y, factor nuclear Y
 N-Myc: myelocytomatosis oncogene ; oncogen de mielocitomatosis
 PAD: presión arterial diastólica
 PAF-AH: platelet-activating factor-acetylhydrolase, acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas.
 PAS: presión arterial sistólica
 PBD: protein data bank, banco de datos de proteínas
 PCR: polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa
 PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase, fosfoenolpiruvato carboxicinas
 PGC-1 α : co-activador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisoma γ
 PLAT: polycystin-1, lipoxigenase, alpha-toxin, policisteina, lipoxigenasa, toxina alfa
 PLTP: phospholipid transfer protein; proteína transferidora de fosfolípidos
 PMA: forbol-12-miristato-13-acetato
 PolyPhen: polymorphism phenotyping, polimorfismo fenotipo
 PON1: paraoxonase 1, paraoxonasa 1
 PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor, receptro activado por el proliferador de peroxisoma
 PQS: protein quaternary structure, estructura cuaternaria de la proteína
 RE: retículo endoplásmico
 RE α : receptor de estrógeno α
 RNA: ribonucleic acid, ácido ribonucleico
 RNAm: RNA mensajero
 RXR α : retinoid X receptor α , receptor X del ácido retinoico α
 Ser: serina
 SNP: single nucleotide polymorphisms, polimorfismos de un solo nucleótido
 SR-B1: scavenger receptor class B type 1, receptor basurero clase B tipo1
 TFSEARCH: searching transcription factor binding sites
 TG: triglicéridos
 THRSF: thyroid hormone responsive protein, proteína que responde a hormonas tiroideas
 TK-C/EBP: sitio de unión a C/EBP en el promotor del gen *TK*
 UR: ácido úrico
 USF: upstream stimulatory factor, factor estimuladorio “río arriba”
 VLDL: very low density lipoproteins, lipoproteínas de muy baja densidad
 W/H: waist-hip index, índice cintura cadera

RESUMEN

La enfermedad arterial coronaria, así como la enfermedad cerebrovascular ocupan las principales causas de muerte en México. Estudios epidemiológicos en distintas poblaciones y en modelos animales han demostrado que la presencia de niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL; high density lipoproteins) es un factor de riesgo para desarrollar alguna de estas enfermedades, y en nuestro país el 50% de la población urbana presenta esta característica.

En la mayoría de las familias las HDL son un rasgo poligénico y su heredabilidad se estima entre el 50-70%. Los genes asociados con la modulación de los niveles séricos de estas lipoproteínas son en su mayoría aquellos que participan en el transporte reverso del colesterol. Mediante este proceso el colesterol se transfiere de tejidos periféricos hasta el hígado para su excreción.

Uno de estos genes es el de la lipasa hepática (*LH*), la enzima codificada por este gen se encarga de hidrolizar los fosfolípidos y triglicéridos de las HDL₂. La pérdida del área superficial de estas partículas debido a la hidrólisis mediada por la LH da como resultado que la partícula contenga una menor cantidad de colesterol. Por lo tanto, en el humano y en modelos animales se ha observado que existe una relación inversa entre la actividad sérica de esta enzima y los niveles de colesterol HDL. Adicional a esto, en población caucásica se observó que variantes alélicas del gen de la *LH* contribuyen en un 40% a la modulación genética de los niveles séricos de las HDL.

Las bases genéticas de la regulación de los niveles de HDL en la población mexicana no han sido estudiadas; por lo tanto, en el presente estudio se buscaron variantes alélicas tanto en el promotor como en la secuencia codificante del gen de la *LH*. Se secuenciaron los 9 exones del gen y la secuencia promotora en 30 individuos con HDLs bajas (HDL < percentila 10) y 30 individuos con HDLs altas (HDL > percentila 90).

La hipótesis de este trabajo es que en estos 60 individuos con niveles extremos de colesterol HDL, la modulación de estas lipoproteínas está determinada principalmente por

factores genéticos, ya que los factores ambientales fueron controlados mediante estrictos criterios de exclusión. Es decir, que no se incluyeron sujetos que presentaran alguna condición fisiológica o fisiopatológica que *per se* modifica las HDL. De tal manera, que las variantes genéticas que se presentan preferentemente en alguno de los grupos pudieran ser las responsables de los niveles extremos de colesterol HDL en estos sujetos.

Se identificaron 21 variantes de las cuales 15 estuvieron presentes en ambos grupos y 6 fueron exclusivas de uno ellos. Las variantes identificadas en los dos grupos no parecen tener un efecto importante en la modulación de las HDL, ya que no existen diferencias en las frecuencias alélicas o genotípicas entre los grupos. De las 6 variantes exclusivas de alguno de los grupos, 3 se localizan en la secuencia promotora del gen y el resto se localizan en la secuencia codificante.

La variante -451 A>G se encontró en una paciente que tiene disminuidas las HDL_{2a}; este hallazgo concuerda con un posible aumento de la actividad sérica de la LH, que se generaría por un aumento de la transcripción del gen, dando como resultado un aumento de la proteína LH que es capaz de promover la hidrólisis acelerada de las partículas HDL_{2a}.

Las otras 2 variantes del promotor son -480 C>T y -592 G>A, ambas se identificaron en individuos con niveles altos de colesterol HDL. La variante -592 G>A se localiza en una secuencia donde se presenta una interacción DNA-proteína dentro de la cual podría existir un sitio de unión para el factor de transcripción FXR. Por otro lado, en la secuencia donde se localiza la variante en -480 C>T no se han identificado motivos en el DNA para la unión de factores de transcripción. Sin embargo, ambas variantes parecieran estar disminuyendo la transcripción del gen, ya que una baja actividad sérica de la enzima se relaciona con niveles altos de colesterol HDL.

Las otras 3 variantes exclusivas de uno de los grupos se localizan en la secuencia codificante, de sujetos del grupo de HDL altos. Estas fueron las variantes R135C, S289F y Q355R. La variante S289F ya ha sido reportada; en ensayos *in vivo* e *in vitro* se observó que este cambio de aminoácido afecta la función de la enzima LH y se relaciona con un aumento en los niveles de colesterol HDL. Es probable que tanto la variante Q355R como

R135C tengan un efecto semejante al de la variante S289F; ya que la sustitución de estos aminoácidos no se observa en la familia de las triacilglicerol lipasas además de que se modifica la naturaleza de los aminoácidos.

Por lo tanto, es necesario realizar los ensayos funcionales tanto *in vivo* como *in vitro* de las 5 variantes que no han sido reportadas para poder determinar el efecto que ejercen en la actividad de la enzima o en la transcripción del gen de la *LH*. Adicionalmente, se deben estudiar estas variantes en sujetos de la población abierta, esto nos permitirá determinar las frecuencias alélicas de cada una de ellas; así como su contribución en la modulación de las HDL en la población general.

1. INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica por aterosclerosis de las arterias coronarias así como la enfermedad cerebrovascular ocupan las principales causas de muerte en México. Estudios epidemiológicos en distintas poblaciones, así como en modelos animales han mostrado que existe una relación inversa entre los niveles plasmáticos de las lipoproteínas de alta densidad (HDL; high density lipoproteins) y el riesgo de desarrollar cardiopatía isquémica (Gordon y cols., 1989a; Gordon y cols., 1989b; Duverger y cols., 1996; Benoit y cols., 1999; Genest y cols., 1999; Grundy y cols., 1999b; Von Eckardstein y cols., 2001).

En México, la Encuesta Nacional Epidemiológica de 1993 reveló que la hipoalfalipoproteinemia es una de las anomalías lipídicas más frecuentes (HDL < 35 mg/dl) ya que está presente en el 50% de la población (Aguilar y cols., 2001). Por lo tanto, la prevalencia de la hipoalfalipoproteinemia en adultos mexicanos es de las más altas reportadas en el mundo (Mahley y cols., 1995; Bhopal y cols., 1999).

La heredabilidad de las HDL se ha estimado entre 50-70% (Whitfield y cols., 1983; Heller y cols., 1993) y en la mayoría de las familias los niveles de HDL son un rasgo poligénico. Los genes asociados con la modulación de los niveles séricos de estas lipoproteínas son en su mayoría aquellos que participan en el transporte reverso del colesterol. Mediante este proceso el colesterol es transferido de tejidos periféricos, para llevarse finalmente al hígado, donde es utilizado para la síntesis de ácidos biliares (Fielding y Fielding, 1995; Tall y cols., 2001; Cohen y cols., 2004). De tal manera que varios grupos de investigación se han dado a la tarea de conocer el metabolismo completo de estas lipoproteínas, así como su composición y los genes que pudieran influir en su concentración plasmática.

2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LAS HDL

Las HDL, como el resto de las lipoproteínas son complejos macromoleculares, pseudomicelares constituidos principalmente por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y

colesterol libre), lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y proteínas llamadas apolipoproteínas. Los lípidos anfipáticos se organizan formando una monocapa en la superficie del complejo, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso (Edelstein y cols., 1979) (Figura 1).

La estabilidad de esta monocapa de lípidos está garantizada en términos fisicoquímicos, ya que las apolipoproteínas pueden asociarse a ella gracias a la presencia de hélices alfa conformadas por secuencias que alternan aminoácidos polares e hidrofóbicos (Gotto y cols., 1986). Los lípidos no polares son insolubles en el medio acuoso como el plasma; en consecuencia se sitúan en el núcleo de la partícula también conocido como “core” evitando de esta manera las interacciones con grupos polares que serían fisicoquímicamente desfavorables (Edelstein y cols., 1979).

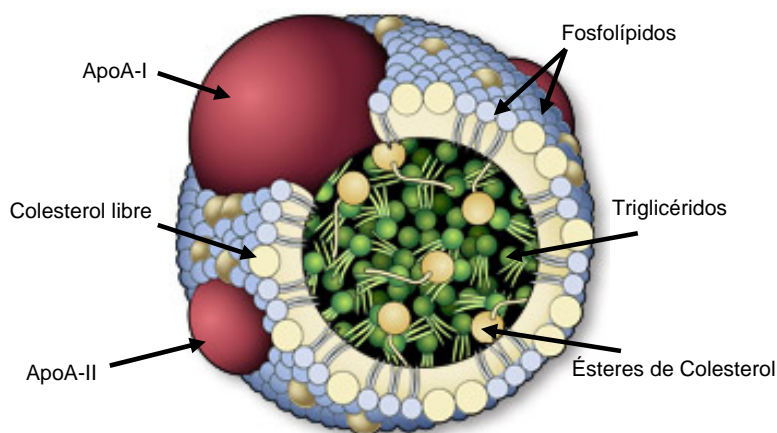


Figura 1. Estructura y composición de las HDL.

Modificado de <http://wichita.kumc.edu/edtech/medill.html>.

Las HDL tienen un diámetro de 70-100Å y una masa que va de los 200, 000 a 400,000 daltons. Estas partículas tienen una densidad entre 1.063 a 1.21 g/ml; mediante ultracentrifugación analítica pueden separarse en partículas ligeras y partículas pesadas llamadas HDL₂ y HDL₃, respectivamente. Las primeras tienen una densidad entre 1.063 a 1.12 g/ml mientras que las últimas se encuentran en el rango de 1.13 a 1.21 g/ml. Las HDL₂ son relativamente más abundantes en lípidos y con una menor cantidad de proteínas comparadas con las HDL₃ (Scriver y cols., 2001). La densidad de estas partículas se

relaciona inversamente con su tamaño, el cual, es el reflejo del contenido relativo de lípidos del “core” y las proteínas de superficie.

Las HDL tienen en promedio un 50% de lípidos y 50% de proteínas; el 32% de la composición de lípidos son ésteres de colesterol, el 5% es colesterol libre, el 55% son fosfolípidos y el 8% son triglicéridos. La parte proteica consiste principalmente de la apolipoproteína A-I (ApoA-I, 70%), y ApoA-II (20%) (Scriver y cols., 2001).

En una menor proporción las HDL además contienen una variedad de proteínas que incluyen la ApoA-IV, ApoC-I, ApoC-II, apoD, ApoE, ApoL-I, ApoM, y enzimas como la LCAT, PON1 y PAF-AH/Lp-PLA2. Algunas de las apolipoproteínas son cofactores de enzimas hidrolasas que “remodelan” las HDL y algunas otras pueden ser ligandos que median la captación de las HDL. La LCAT, PON1 y PAF-AH/Lp-PLA2 son enzimas que le confieren a las HDL propiedades antioxidantes, ya que estando unidas a la superficie de las HDL catalizan reacciones en las que moléculas pro-oxidantes son escindidas e inactivadas (Lewis y Rader, 2005).

Las partículas HDL que únicamente contienen ApoA-I como constituyente proteico, poseen 4 cadenas polipeptídicas ApoA-I y son ligeras (HDL₂); por su parte aquellas partículas que contienen tanto ApoA-I como ApoA-II contienen dos copias de cada una de estas apolipoproteínas y son más densas y pequeñas (HDL₃). Las partículas HDL enriquecidas de ApoE contienen principalmente esta apolipoproteína y su densidad es menor que la de las HDL₂. Existen también las HDL pre-β1 que a diferencia de las HDL₂ y HDL₃ tienen un bajo contenido en lípidos y una densidad aproximada de 1.28 g/ml.

El corrimiento electroforético de las lipoproteínas séricas muestra que las HDL₂ y HDL₃ son las que más logran separarse del origen (punto de carga en el gel donde se depositan las muestras para someterlas a una corriente eléctrica). Por este motivo a las HDL también se las conoce α-lipoproteínas. (Scriver y cols., 2001).

3. BIOSÍNTESIS DE LAS HDL

La biosíntesis de las HDL es compleja e involucra la síntesis y la secreción de los componentes proteicos que las constituyen, así como la incorporación de lípidos (fosfolípidos y colesterol); además del ensamblaje y la formación de la partícula HDL madura (Figura 2).

Las apolipoproteínas más importantes de las HDL son la ApoA-I y la ApoA-II, ambas son requeridas para la biosíntesis normal de las HDL. La ApoA-I constituye el 70% de la composición proteica de las HDL y está presente en todas las partículas HDL (Lewis y Rader, 2005). La proteína ApoA-I se sintetiza tanto en el intestino como en el hígado y la delección completa del gen que la codifica da como resultado niveles extremadamente bajos de colesterol HDL tanto en ratones (Williamson y cols., 1992) como en humanos (Schaefer y cols., 1982).

La ApoA-II constituye aproximadamente el 20% de la fracción proteica y está presente en 2 tercios de las partículas de HDL en humanos. Esta proteína se sintetiza solamente en el hígado y la delección completa del gen que la codifica reduce de manera importante los niveles de colesterol HDL en ratones (Weng y Breslow, 1996). Lo anterior sugiere que la ApoA-II es requerida para la biosíntesis y metabolismo normal de las HDL. En humanos, el gen de la *ApoA-II* es un candidato para la regulación de los niveles de colesterol HDL (Wang y Paigen, 2005).

La apoA-I puede ser secretada por el hígado y el intestino como apoA-I carente lípidos o partículas HDL nacientes carentes de colesterol y abundantes en fosfolípidos. Las HDL/ApoA-I nacientes adquieren fosfolípidos y colesterol gracias al transportador ABCA1 (ATP Binding Cassette Transporter 1) (Yancey y cols., 2003); a este proceso se le conoce como eflujo del colesterol, por medio de este el colesterol de tejidos periféricos puede ser donado a las HDL/ApoA-I nacientes (Figura 2).

A pesar de que el transportador ABCA1 se expresa en diversos tipos celulares, parece ser que el intestino y el hígado son los responsables mayoritarios de la donación de lípidos. En el ratón que carece del ABCA1 específicamente en el hígado los niveles de colesterol HDL disminuyen un 80% (Timmins y cols., 2005) y el ratón que no expresa este gen en el intestino las HDL tiene un 30% de reducción (Brunham y cols., 2006).

Las HDL nacientes, también conocidas como HDL pre- β , tienen forma de discos constituidos por una bicapa de fosfolípidos que es estabilizada por un anillo de apolipoproteínas; una vez que son secretadas estas pueden pasar al plasma donde continuará su metabolismo (Figura 2) (Sriver y cols., 2001).

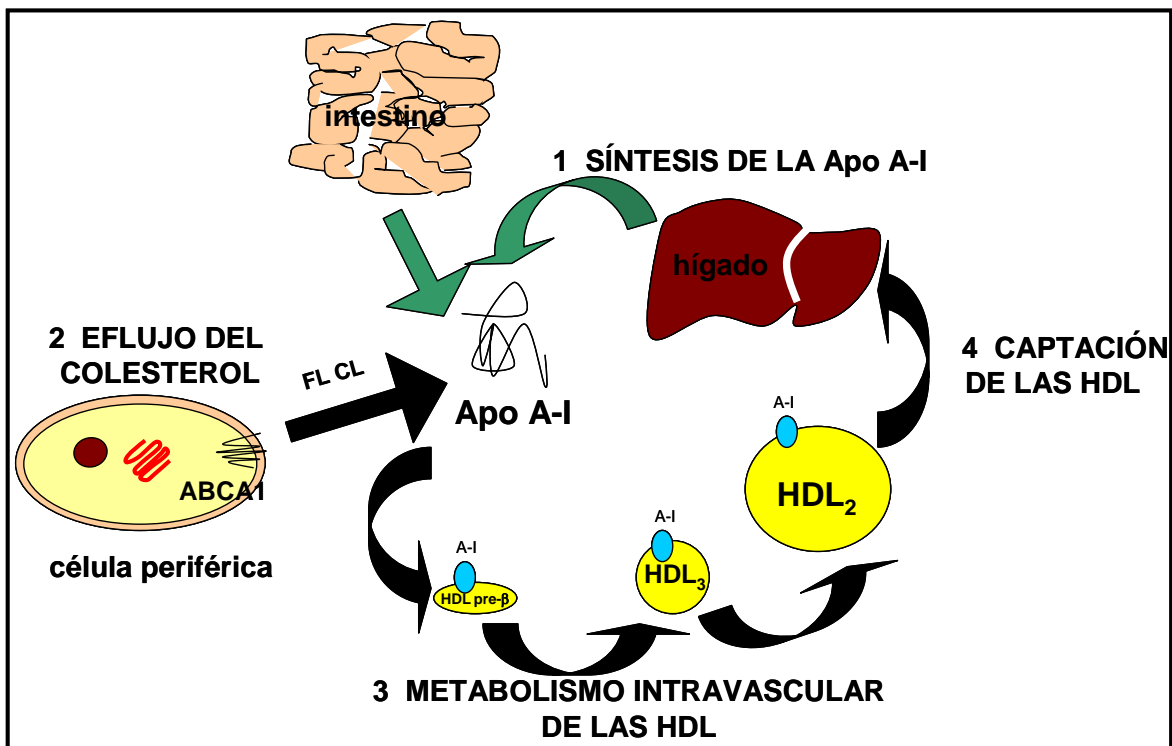


Figura 2. Biosíntesis y metabolismo de las HDL. A-I, apolipoproteína A-I; ABCA1, transportador ABCA1; CL, colesterol libre; FL, fosfolípidos.

4. METABOLISMO INTRAVASCULAR DE LAS HDL

El colesterol captado por las partículas HDL nacientes es esterificado gracias a la activación de la enzima LCAT (lecitina: colesterol aciltransferasa) mediada por la ApoA-I. La esterificación del colesterol trae como consecuencia la pérdida de su carácter anfipático, transformándose en una molécula hidrofóbica. En consecuencia, los ésteres de colesterol abandonan la superficie para trasladarse hasta el núcleo de la HDL. El desplazamiento de este lípido trae como consecuencia que la partícula HDL aumente su capacidad de captación de colesterol y por lo tanto aumente de tamaño (Scriver y cols., 2001). Una vez que la partícula comienza a madurar se va tornando esférica y empieza a ganar volumen (Figura 3).

La LCAT es responsable de la síntesis de un gran porcentaje de los ésteres de colesterol en las lipoproteínas plasmáticas, esta enzima es sintetizada en los hepatocitos y es secretada hacia el plasma, donde se adhiere a las HDL para llevar a cabo su función (Fielding y Fielding, 1995). Los fosfolípidos y el colesterol libre que son transferidos hacia la HDL son los sustratos de esta enzima (Figura 3), y los productos generados son los ésteres de colesterol y la lisolecitina (Scriver y cols., 2001).

La deficiencia de la enzima LCAT conlleva a la formación de lipoproteínas lamelares que carecen de un núcleo no-polar y están compuestas de una bicapa de lípidos y proteínas. Estas lipoproteínas pueden tener forma discos o vesículas (Tall y cols., 1977).

El colesterol esterificado puede ser intercambiado por triglicéridos provenientes de lipoproteínas que contienen ApoB como su principal apolipoproteína, destacando principalmente el intercambio con la LDL (low density lipoprotein o lipoproteína de baja densidad). Este intercambio entre lipoproteínas está facilitado por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP, cholesteryl ester transfer protein) que está adherida a las HDL (Scriver y cols., 2001) (Figura 3). La actividad de esta proteína trae como consecuencia la disminución de los ésteres de colesterol y el enriquecimiento de triglicéridos en el “core” de las HDL.

En los ratones que expresan la CETP humana los niveles de colesterol HDL disminuyen dramáticamente (Agellon y cols., 1991). Los pacientes con deficiencia de CETP presentan partículas HDL extremadamente grandes y el catabolismo de la ApoA-I es demasiado lento (Ikewaki y cols., 1993). La transferencia del colesterol gracias a la CETP abre otra posibilidad de captación de colesterol por el hígado ya que las lipoproteínas que contienen ApoB-100 pueden ser reconocidas y captadas por el receptor de las LDL (LDLR) que se expresa en el hígado (Schwartz y cols., 2004).

Además del colesterol, otros componentes que pueden ser intercambiados entre las lipoproteínas son los fosfolípidos y las apolipoproteínas solubles. De tal manera que durante la lipólisis de las lipoproteínas abundantes en triglicéridos (VLDL, very low density lipoproteins; IDL, intermediate density lipoproteins y LDL), sus componentes de superficie pueden ser transferidos hacia las HDL pre-existentes. La transferencia de fosfolípidos y colesterol libre es facilitado por la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP) (Huuskonen y cols., 2001) (Figura 3).

La represión de la expresión del gen de la *PLTP* en el ratón resulta en la reducción al 40% de la ApoA-I y los lípidos de las HDL (Jiang y cols., 1999), debido a que se aumenta la depuración de las partículas HDL que carecen de fosfatidilcolina. Por otro lado el ratón transgénico que expresa la PLTP humana presenta niveles elevados de las HDL pre- β 1, ApoA-I y fosfolípidos (Jiang y cols., 1996). En el humano, el papel fisiológico y fisiopatológico de esta enzima aún no ha sido determinado con exactitud.

El contenido de apolipoproteínas así como los lípidos del “core” juegan un papel importante en el remodelaje mediado por la PLTP, de tal manera que el proceso es más eficiente en las partículas HDL abundantes en triglicéridos (HDL₂) (Rye y cols., 1998).

Los triglicéridos y fosfolípidos de las lipoproteínas pueden ser hidrolizados por dos enzimas: la lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa hepática (LH) (Figura 3). La LPL es secretada principalmente por el músculo y el tejido adiposo; la hidrólisis catalizada por esta

enzima requiere de ApoC-II (Merkel y cols., 2002). Por otro lado, la LH activa es secretada únicamente por el hígado (Doolittle y cols., 1987; Semenkovich y cols., 1989).

La LPL hidroliza principalmente los triglicéridos de las lipoproteínas abundantes en triglicéridos; la disminución de lípidos del “core” debido a la hidrólisis de estas lipoproteínas favorece que los fosfolípidos y el colesterol de superficie sean transferidos hacia las HDL. Con ello, las HDL aumentan su capacidad para captar colesterol, ya que aumentan su área de superficie. Como es de esperarse, la actividad de la LPL tiene una relación directa con la concentración de colesterol HDL. En el humano, la deficiencia de LPL se relaciona con niveles bajos de colesterol HDL (Tornvall y cols., 1995; Kaser y cols., 2003); así mismo el ratón “knockout” tiene niveles elevados de triglicéridos y baja concentración colesterol HDL (Weinstock y cols., 1995).

Los triglicéridos de las HDL₂ pueden ser hidrolizados por la LH. Esta hidrólisis, en asociación con la actividad de la PLTP disminuye el tamaño de las HDL₂ transformándolas en HDL₃, HDL pre-β1 e incluso en ApoA-I desprovista de lípidos que pueden reiniciar el ciclo de captación de colesterol (Rao y cols., 1982; Kinnunen, 1984) (Figura 3).

Las HDL abundantes en ésteres de colesterol pueden adquirir la apolipoproteína E (ApoE) y de esta manera ser captadas mediante el segundo mecanismo gracias a la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP, LDL-receptor-related protein) (Ji y cols., 1997). Mediante este proceso la partícula es endocitada completamente, mientras que en el proceso mediado por SR-B1 se captan sólo los ésteres de colesterol (Figura 4).

Por lo tanto, en el mecanismo mediado por SR-B1 la partícula depleta de lípidos puede iniciar nuevamente el ciclo de captación del colesterol. Tanto SR-B1 como el receptor LRP requieren de la LH para llevar a cabo su función, ya que está actúa como una proteína adaptadora para que estos receptores reconozcan a las HDL (Ji y cols., 1997; Lambert y cols., 1999) (Figura 4).

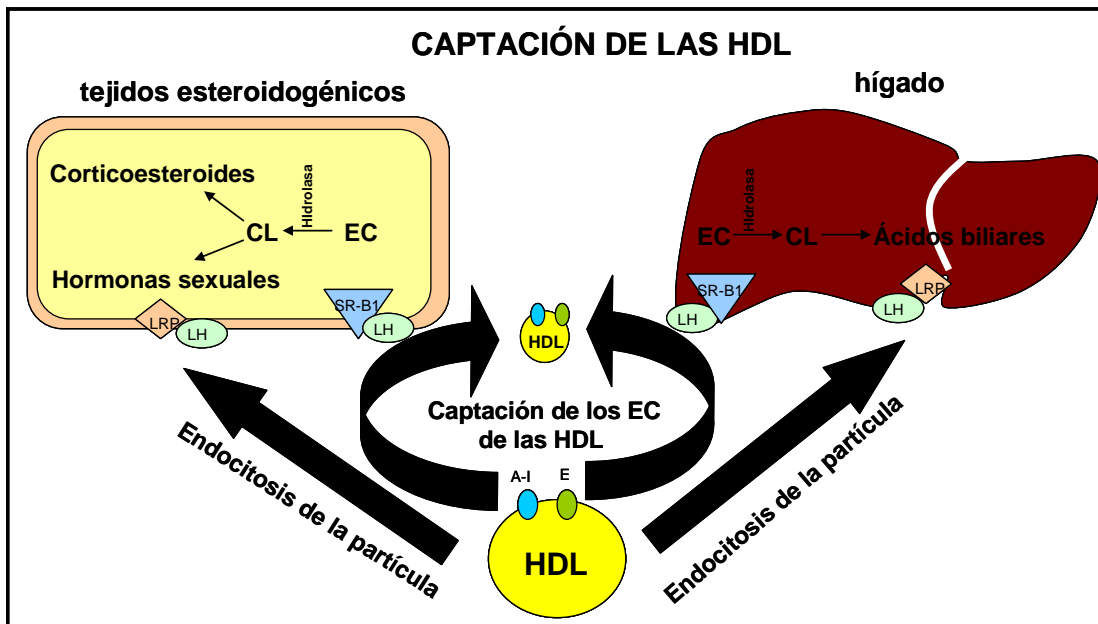


Figura 4. Captación de las HDL. A-I, apolipoproteína A-I; E, apolipoproteína E; LH, lipasa hepática; LRP, proteína relacionada con el receptor de LDL; SR-B1, receptor basurero clase B tipo 1; EC, ésteres de colesterol; CL, colesterol libre.

6. LA ACTIVIDAD DE LA LH Y EL METABOLISMO DE LÍPIDOS

La LH es una enzima lipolítica extracelular, sintetizada en las células parenquimales del hígado que se localiza principalmente unida a los proteoglicanos de heparán sulfato en la superficie de los capilares sinusoidales y en la superficie externa de las microvellosidades de las células parenquimales en el espacio de Disse (Doolittle y cols., 1987; Sanan y cols., 1997). La LH tiene actividad de fosfolipasa A1 y triacilglicerol hidrolasa; se encarga de la hidrólisis de tri, di, monoglicéridos, tioésteres de acil-CoA y fosfolípidos (Kuusi y cols., 1980, 1982; Jensen y cols., 1982; Jackson, 1983). Además de su actividad enzimática la LH juega un papel muy importante en el transporte de lípidos plasmáticos (Applebaum, 1995).

Esta enzima hidroliza los triglicéridos y fosfolípidos de las lipoproteínas IDL, LDL y HDL. En el caso particular de las HDL, la hidrólisis mediada por la LH permite la transformación de HDL₂ a HDL₃ (Rao y cols., 1982; Kinnunen, 1984). La disminución de los fosfolípidos en la superficie de las HDL limita su capacidad para contener colesterol; es por eso que se ha observado que la actividad de la LH guarda una relación inversa con los niveles de colesterol HDL tanto en humanos como en modelos animales (Kuusi y cols., 1987; Isaacs y cols., 2004).

En el ratón transgénico que sobreexpresa la LH humana, el colesterol HDL disminuye (Busch y cols; 1994; Dichek y cols., 1998). Por el contrario, en el ratón deficiente tanto de ApoE como de LH, las HDL aumentan (Mezdour y cols; 1997). Los pacientes con deficiencia de LH familiar presentan niveles elevados de HDL₂ en plasma, llevando a hiper- α -trigliceridemia (Breckenridge y cols., 1982; Carlson y cols., 1986; Little y Connelly, 1986).

Además, estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la LH está relacionada con la captación de fosfolípidos y colesterol por el hígado (Jansen y cols., 1980; Bamberger y cols., 1983). A este respecto, la LH funciona como una proteína adaptadora en la captación del colesterol HDL mediada por el receptor SR-B1 (Lambert y cols., 1999).

7. LA LH PROMUEVE LA CAPTACIÓN SELECTIVA DE ÉSTERES DE COLESTEROL PROVENIENTES DE LAS HDL VIA EL RECEPTOR SR-B1

Los ésteres de colesterol provenientes de las HDL pueden ser transferidos al hígado gracias a la captación completa de la partícula o la captación selectiva de estos lípidos (Glass y cols., 1983; Eisenberg y cols., 1984). Independientemente de su actividad catalítica la LH incrementa la captación de colesterol HDL en hígados perfundidos de ratas (Kadowaki y cols., 1992; Marques-Vidal y cols., 1994). En este último proceso, la LH funciona como una proteína adaptadora que media la interacción entre las lipoproteínas, los proteoglicanos y los receptores que se localizan en la superficie celular del hepatocito.

De tal manera que estas interacciones facilitan la captación celular de las lipoproteínas y/o los lípidos que se forman parte de ellas. Mediante ensayos *in vitro* se ha observado que la LH potencia la unión y captación de quilomicrones, quilomicrones remanentes, β -VLDL y LDL en diferentes tipos celulares (Choi y cols., 1994; Diard y cols., 1994; Ji y cols., 1994 y 1997; Shafi y cols., 1994; Komaromy y cols., 1996; Krapp y cols., 1996; Donner y cols., 1998).

En el año de 1996, se identificó el receptor SR-B1, el cual tiene la capacidad de mediar la captación de ésteres de colesterol de las HDL (Acton y cols., 1996). Este receptor se expresa principalmente en el hígado y en tejidos esteroideogénicos (Landschulz y cols., 1996; Murao y cols., 1997; Temel y cols., 1997). La sobreexpresión de este receptor en animales transgénicos (Sehayek y cols., 1998; Wang y cols., 1998) reduce los niveles de colesterol HDL e incrementa la secreción biliar de colesterol, lo cual es consistente con un aumento en el transporte reverso de colesterol mediado por este receptor.

Una interacción entre el receptor SR-B1 y la LH se propuso desde que se observó que el ratón deficiente en LH tenía aumentada la expresión del SR-B1 en las glándulas suprarrenales, pero aún así la cantidad de colesterol captada por estos órganos era muy baja (Wang y cols., 1996). De tal manera, se consideró que la LH era necesaria para la adecuada captación de colesterol mediada por el SR-B1.

Cuando la LH y el SR-B1 se co-expresaron en las células 293 (células embionarias de riñón humano), se observó un claro efecto aditivo en la asociación de las HDL a la superficie celular, sugiriendo que la interacción de las HDL con el SR-B1 y la LH puede ocurrir en sitios separados en la superficie de la célula. Por tanto las HDL podrían estarse uniendo a la LH asociada a la superficie; y esta interacción sería la responsable de aproximar las HDL al receptor SR-B1 (Lambert y cols., 1999).

Para determinar si la actividad enzimática de la LH era necesaria para la captación de ésteres de colesterol, en un segundo experimento co-expresaron el receptor SRB-1 y la LH con una mutación en la serina que forma parte del sitio catalítico. Se pudo observar que la LH catalíticamente activa potencia hasta 3 veces la captación de ésteres de colesterol de las HDL vía el receptor SR-B1, mientras que la proteína inactiva solo aumenta 1.4 veces esta captación. Adicional a estos resultados se observó que la asociación de las HDL a la superficie celular era similar cuando se expresaba la LH nativa o la LH mutada (Lambert y cols., 1999).

En estudios *in vivo*, se observó que animales transgénicos que sobre-expresaban la LH humana tenían disminuidas las lipoproteínas remanentes que contienen ApoB y las HDL (Dichek y cols., 1998). Por su parte, en el ratón que sobre-expresaba la LH mutada las lipoproteínas que contienen ApoB estuvieron reducidas; sin embargo, las HDL disminuyeron mínimamente (Dugi y cols., 2000).

En estudios previos se había demostrado que la incubación de las HDL con LH aumenta la capacidad para liberar el colesterol en hígados perfundidos de ratas (Kadowaki y cols., 1992), y en células de hepatoma (Rinninger y cols., 1998). También la lipólisis de las HDL mediada por una fosfolipasa A2 secretada (actividad enzimática que tiene la LH) incrementa la capacidad de liberar ésteres de colesterol en células CHO (Chinese Hamster Ovary) que expresan SR-B1 (De Beer y cols., 1998).

Los tres estudios anteriores han permitido plantear la hipótesis de que la hidrólisis de los fosfolípidos de la superficie de las HDL potencia la interacción de sus apolipoproteínas con

algunas regiones de la membrana y/o facilita la liberación de ésteres de colesterol del “core” de la partícula para que sean captados por la célula (Bamberger y cols., 1983; Collet y cols., 1990; Guendouzi y cols., 1998).

Estos experimentos dejan en claro que la LH independientemente de su función catalítica favorece la asociación de las HDL a la superficie celular, el cual es un paso previo para la captación de los ésteres de colesterol; además de destacar que la actividad catalítica de la enzima LH es necesaria para obtener la captación máxima de ésteres de colesterol de estas partículas. En conjunto, estos resultados son una evidencia directa del papel aditivo de la LH y el SR-B1 en la captación selectiva de ésteres de colesterol de las HDL (Lambert y cols., 1999).

8. ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA IDENTIFICAR VARIANTES ALÉLICAS QUE MODIFICAN LOS NIVELES DE COLESTEROL HDL

Existen factores ambientales que modifican los niveles de las HDL (Criqui y cols., 1986; Marrugat y cols., 1996; Rigotti y cols., 1996; Byberg y cols., 2001; Pownall y cols., 2002); sin embargo, del 50-70% de la variación en los niveles de estas lipoproteínas está determinada genéticamente (Whitfield y cols., 1983; Heller y cols., 1993) y, en la mayoría de las familias los niveles de HDL no se heredan en forma mendeliana, sino como un rasgo complejo. Por este motivo se han realizado una gran cantidad de estudios tratando de entender las bases genéticas que determinan las concentraciones plasmáticas de las HDL.

Los genes asociados con la modulación de los niveles de las HDL son principalmente los que participan en el transporte reverso del colesterol (Fielding y Fielding, 1995; Tall, 1998); adicionalmente, a través de estudios de ligamiento o mapeo genético se han localizado distintos loci relacionados con la modulación de los niveles de las HDL (Arya y cols., 1999; Peacock y cols., 2001; Soro y cols., 2002; Canizales y cols., 2003).

Dada la complejidad del metabolismo del colesterol, y la larga lista de genes candidatos, el estudio de la contribución de estos genes en la regulación de los niveles de las HDL requiere de estrategias metodológicas diversas.

Una de las estrategias utilizadas han sido los estudios de asociación, en ellos se ha buscado asociación entre SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) específicos (o sus haplotipos) con niveles de colesterol HDL bajos o altos (Ramensky y cols., 2002; Knoblauch y cols., 2004; Isaacs y cols., 2004). Estos estudios requieren del análisis de un número grande de SNPs en distintos genes candidato, además de que una proporción importante de ellos no han podido ser confirmados en otras poblaciones (Brousseau y cols., 2001; Clee y cols., 2001; Lutucuta y cols., 2001; Takagi y cols., 2002; Yamakawa y cols., 2004).

Lo anterior puede atribuirse a que la función del gen en estudio no modifica el metabolismo de las HDL, la falta de poder estadístico, o la heterogeneidad entre las poblaciones estudiadas (Tan y cols., 2003; Tregouet y cols., 2004). Mediante esta estrategia se identifica si existe algún efecto en el fenotipo (niveles de HDL) debido a la presencia de variantes alélicas con una frecuencia relativamente alta en la población (variantes comunes).

Sin embargo, en una proporción de individuos el fenotipo puede estar dado por la presencia de variantes poco frecuentes que difícilmente se pondrían en evidencia mediante los estudios de asociación. En este caso se tiene que recurrir a la búsqueda dirigida de SNPs no sinónimos y SNPs en el promotor de los genes que pudieran estar modificando de manera importante los niveles séricos de las HDLs (Ziv y cols., 2003; Hinds y cols., 2004; Neale y Sham, 2004).

Esta estrategia ya ha sido utilizada para estudiar la participación de algunos genes (los que codifican para el transportador ABCA1, la ApoA-I y la LCAT) en la regulación de los niveles de las HDL, encontrándose un papel importante de variantes no sinónimas poco

frecuentes del gen *ABCA1* en la génesis de hipo e hiperalfalipoproteinemia (Ramensky y cols., 2002; Cohen y cols., 2004; Villarreal y cols., 2007).

Este proyecto propone el estudio inicial de las bases genéticas que modulan los niveles de las HDL en pacientes mexicanos buscando SNPs en la secuencia promotora y SNPs no sinónimos en el gen de la *LH*, el cual se ha descrito como un gen que contribuye en un 40% a la variación genética de las HDL (Knoblauch y cols., 2004).

9. ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA *LH*

El análisis comparativo de la organización y la secuencia del gen de la *LH* en diferentes especies revela que este gen es miembro de la familia de las lipasas (Komaromy y Schotz, 1987; Cai y cols., 1989; Ameis y cols., 1990). En el humano, el gen de la *LH* se localiza en el cromosoma 15 (q21.3) y consta de 9 exones y 8 intrones que se extienden en una longitud de 60 kb (Cai y cols., 1989; Ameis y cols., 1990; Perret y cols., 2002). Todos los intrones inician con el dinucleótido GT y finalizan con el dinucleótido AG (Cai y cols., 1989), lo cual constituye la secuencia consenso encontrada en las uniones exón-intrón (Breathnach y Chambon, 1981).

En lo que respecta a la expresión del gen, el RNAm de tamaño completo se ha observado exclusivamente en los hepatocitos (Doolittle y cols., 1987; Semenkovich y cols., 1989). Por otro lado, un RNAm truncado, producto del procesamiento alternativo está presente en las glándulas suprarrenales (Verhoeven y Jansen, 1994). Niveles elevados del RNAm están presentes únicamente en células de hepatoma altamente diferenciadas y hepatocitos lo cual es indicativo de que la transcripción del gen de la *LH* es dependiente de la presencia de factores de transcripción que sólo se expresan en células hepáticas diferenciadas (Chang y cols., 1997).

Se han identificado dos sitios de inicio de la transcripción, uno localizado a 43 (sitio de inicio principal) y otro a 77 nucleótidos río arriba del inicio de la traducción (Cai y cols., 1989; Ameis y cols., 1990; Chang y cols., 1997; Perret y cols., 2002)

El exón 1 posee los dominios E2, E3 y E4, que son elementos represores de la transcripción. Adicionalmente, en la secuencia 5' no transcrita se han localizado elementos de respuesta para distintos factores de transcripción.

Entre los factores de transcripción que reprimen la expresión del gen se encuentran el RE α , el AP-1, el FXR y el ARP-1 (Sensel y cols., 1990; Hadzopoulou y Cardot, 1993); mientras que los factores de transcripción que promueven la expresión de este gen son el USF, el HNF4 α , el PGC-1 α , y el HNF1 α (Hadzopoulou y Cardot, 1993; Oka y cols., 1996; Chang y cols., 1997; Jones y cols., 2002; Rufibach y cols., 2006).

9.1 EXISTEN ELEMENTOS DE RESPUESTA QUE REPRIMEN DE MANERA IMPORTANTE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA *LH*

La actividad del promotor del gen de la *LH* fue casi imperceptible al transfectar células HepG2 (células de hepatoma humano) con el plásmido que contenía el gen reportero *CAT* bajo el control de la secuencia promotora -684/+27. Al disminuir la longitud de esta secuencia hasta -684/+14 la actividad del gen reportero aumentó tres veces; por otro lado, al utilizar una extensión del promotor de -332/+14 la actividad aumento hasta 7 veces. Estos experimentos demuestran que en estas secuencias que fueron eliminadas (+15 a +27 y -684 a -333) se localizan elementos de respuesta mediante los cuales se reprime fuertemente la expresión del gen de la *LH* (Botma y cols., 2001).

También al utilizar la secuencia promotora -483 a +129, la expresión del gen reportero fue muy baja pero al disminuir el fragmento a -483/+28, el reportero aumento su expresión 17 veces con respecto al ensayo anterior. (Hadzopoulou y Cardot, 1993). Los resultados

anteriores demuestran que la secuencia +29 a +129 contiene elementos que reprimen la transcripción del gen de la *LH*.

Un análisis de interacción DNA-proteína-utilizando la DNasa I y teniendo como templado la secuencia de -483 a +129 del promotor del gen de la *LH* reveló la presencia de 8 secuencias protegidas de la digestión. Las cuatro primeras se localizan río arriba del inicio de la transcripción; la secuencia A, -28 a -75; secuencia B, -96 a -106; secuencia C, -118 a -158; y la secuencia D, -185 a -255; mientras que las otras cuatro se encuentran en el primer exón del gen: secuencia E1, -5 a +20; secuencia E2, +36 a +55; secuencia E3, +58 a +83; y secuencia E4, +86 a +107 (Hadzopoulou-Cladaras y Cardot, 1993).

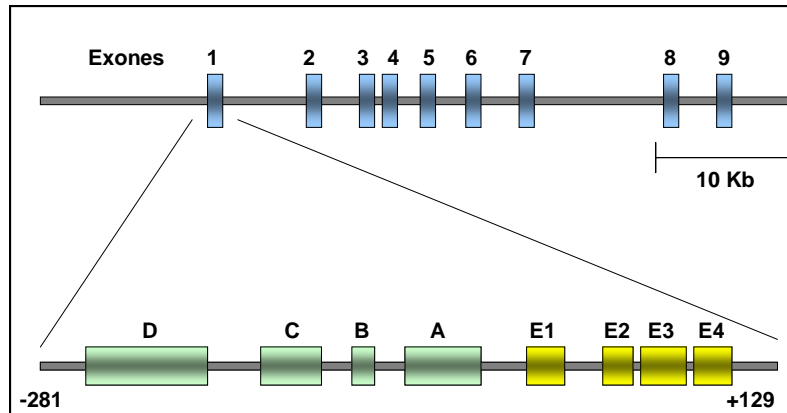


Figura 5. Estructura del gen de la *LH*. Las secuencias D, C, B, A, E1, E2, E3 y E4 son secuencias que reprimen la expresión del gen.

Para determinar la importancia de los elementos localizados dentro del primer exón se realizaron deleciones de cada uno de ellos en el vector que contenía la secuencia -483 a +129 y se transfirieron en células HepG2. Los resultados de estos experimentos permitieron determinar que E2 es el elemento principal a través del cual se media la represión. Por otro lado, E3 y E4 son necesarios para la represión máxima del gen de la *LH*, ya que su deleción no modificó la expresión del gen reportero; sin embargo, la represión máxima únicamente se logra en presencia de los tres elementos (Hadzopoulou-Cladaras y Cardot, 1993).

El elemento E4 posee la secuencia CCAAT, esta secuencia es el consenso al que se unen los factores de transcripción de la familia de C/EBP (Cao y cols., 1991; Williams y cols., 1991). Los elementos E2 y E3 tienen homología con E4; por lo tanto, se analizó mediante ensayos de EMSA (electrophoretic mobility shift assay) la capacidad de estas secuencias para unir a C/EBP. Este tipo de ensayos permiten determinar si existe una interacción DNA-proteína. Una mezcla de proteínas nucleares o en su caso una proteína pura se incubaba con una secuencia conocida de DNA marcado con un isótopo. Esta mezcla se somete a electroforesis vertical. Si existe una interacción entre la secuencia de DNA y alguna proteína de la mezcla entonces el DNA sufrirá un “retardamiento” en su corrimiento electroforético.

En el caso del experimento anterior se pudo observar que la proteína C/EBP puede unirse a E3, pero tiene una baja afinidad por E4 así como por E2. Mediante un ensayo de EMSA utilizando extractos nucleares de rata, se determinó que al elemento E2 se unen 2 factores de transcripción (E2-FT1 y E2-FT2; denominados así porque no se conoce la identidad), ya que se forman dos complejos con un patrón de corrimiento diferente. Gracias a un ensayo de competencia utilizando un oligonucleótido que contenía la secuencia de E3 se pudo determinar que los factores de transcripción E2-FT1 y E2-FT 2 también se unen a E3 (Hadzopoulou-Cladaras y Cardot, 1993).

El elemento E3 muestra competencia con oligonucleótidos de elementos de respuesta de los factores de transcripción de la familia C/EBP (NFY, TK-C/EBP y NF1), lo anterior indica que proteínas de unión a las cajas CCAAT pueden interactuar con esta secuencia. Por su parte el elemento E4 muestra competencia con oligonucleótidos NFY, TK-C/EBP y AlbD. Por lo tanto, factores de transcripción que se unen a E4 pueden unirse también al sitio E3 (Hadzopoulou-Cladaras y Cardot, 1993).

Todos estos datos apoyan la idea de que los elementos represores de la transcripción localizados en el exón 1 (E1-E4) del gen de la *LH* tienen una influencia importante en la regulación de la expresión del gen de la *LH*. Sin embargo, no se ha podido establecer la

identidad de los factores de transcripción que se unen a estas secuencias, y se considera que más de uno de ellos puede unirse en varios de los elementos.

9.2 LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ARP-1 Y HNF4 α COMPITEN POR LA UNIÓN A UNA SECUENCIA DR1 EN EL PROMOTOR DEL GEN DE LA LH

El factor nuclear del hepatocito 4 α (HNF4 α) es un factor de transcripción esencial para la diferenciación del hepatocito y para su función (Li y cols., 2000). Su expresión es proporcional a la expresión del gen de la LH en varias líneas hepáticas (Chang y cols., 1997). Es un factor de transcripción constitutivo cuyos ligandos son los ácidos grasos endógenos (Wisely y cols., 2002).

Los análisis recientes sugieren que la unión de co-activadores más que la unión de los ligandos permiten al HNF4 α obtener una conformación activa (Duda y cols., 2004). El co-activador 1 α del receptor activado por el proliferador del peroxisoma γ (PGC-1 α) estimula la transcripción mediada por el factor de transcripción HNF4 α en los promotores de genes como la *PEPCK*, *G6-fosfatasa*, *L-CPTI*, *CYP7A1*, *FXR* y *APOA5* (Yoon y cols., 2001; Louet y cols., 2002; Rhee y cols., 2003; Shin y cols., 2003; Zhang y cols., 2004; Prieur y cols., 2005).

El HNF4 α activa la transcripción ya que homo-dímeros de esta proteína se unen a secuencias DR1 (Ladias y cols., 1992). Las secuencias DR1, son repetidas directas de nucleótidos separados por una sola base. Otro factor de transcripción que se une a estas secuencias así como a las DR4 es el ARP-1 (apolipoprotein A-I regulatory protein-1); este factor se expresa en múltiples tejidos durante el desarrollo embrionario (Pereira y cols., 1999) y es capaz de activar (Sagami y cols., 1986; Malik y cols., 1995) o reprimir (Kimura y cols., 1993) la transcripción de sus genes blanco (Park y cols., 2003).

El ARP-1 bloquea la activación de la transcripción mediada por HNF4 α en los promotores de genes de apolipoproteínas tales como la ApoA-I (Chan y cols., 1993), ApoA-II, ApoB, y ApoC-III (Ladias y cols., 1992), esto se debe a que este factor de transcripción compite por ocupar los sitios DR1. Sin embargo, ARP-1 ejerce un efecto sinérgico con HNF4 α en los promotores de genes como *CYP7A1* (Stroup y Chiang, 2000), *ApoC-II*, (Kardassis y cols., 1998), y *HNF1*, esto gracias a que se establece una interacción proteína-proteína entre estos dos factores.

La secuencia del promotor del gen de la *LH* tiene dos repetidas directas; DR1 y DR4. La repetida DR1 está localizada entre los nucleótidos -226 a -238 y la DR4 en los nucleótidos -287 a -302. Se co-transfectaron células HuH7 (células de hepatoma humano) con un vector que contenía el gen reportero de la luciferasa bajo el control de la secuencia promotora de -851 a +29 del gen de la *LH* y un vector que expresa el HNF4 α . Este factor de transcripción aumentó 2.5 veces la expresión del reportero. La mutación de alguna de las repetidas directas disminuyó la expresión mediada por el HNF4 α y el tratamiento de células HuH7 con un antagonista del HNF4 α redujo la expresión del RNAm de la *LH* (Rufibach y cols., 2006).

Dado que HNF4 α no se une a las repetidas DR4 (Carter y cols., 1994; Fraser y cols., 1998), se especula que otro factor de transcripción se une a este sitio y establece una interacción con este factor nuclear. Por lo tanto, la disminución en la expresión del gen de la *LH* cuando se muta el sitio DR4 podría deberse a que se inhabilita la interacción entre el HNF4 α y el factor de transcripción que se une a este sitio. Los factores de transcripción ARP-1 y RXR α se unen a repetidas DR4 en otros genes pero no modifican la expresión del gen de la *LH* a través de esta repetida. Sin embargo, el PGC1 α que también se une al sitio DR4 ejerce un efecto sinérgico en la transcripción del gen de la *LH* cuando se co-transfecta con el HNF4 α (Rufibach y cols., 2006).

Por medio de ensayos de EMSA se determinó que tanto el HNF4 α como el ARP-1 se unen al sitio DR1, siendo que ARP-1 tiene más afinidad por este sitio que el HNF4 α (Rufibach y cols., 2006).

Lo anterior demuestra que los efectos del HNF4 α en la expresión del gen de la *LH* se observaran siempre y cuando las concentraciones de ARP-1 sean menores que las del primero, lo cual favorecerá el desplazamiento del ARP-1 eliminando de esta forma su efecto represor.

9.3 EL FACTOR NUCLEAR HNF1 α AUMENTA LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA *LH*

El factor de transcripción HNF1 α es importante para las funciones metabólicas de islotes pancreáticos, hígado, intestino y riñones (Lee y cols., 1998; Shih y cols., 2001). El ratón deficiente de HNF1 α presenta una reducción en la expresión del gen de la *LH* (Shih y cols., 2001) además de que se han asociado mutaciones de este factor de transcripción con variaciones en el metabolismo de lipoproteínas plasmáticas (Hegele y cols., 2000).

Loockwood y Frayling utilizaron los datos de expresión genética del ratón deficiente de HNF1 α para crear un software que permitiera identificar sitios de unión potenciales para este factor de transcripción. Analizaron hasta 2kb de las secuencias río arriba del inicio de transcripción de 28 genes cuya expresión disminuyó en este modelo animal. El análisis con este programa determinó que el gen de la *LH* muy probablemente es regulado por el HNF1 α (Loockwood y Frayling, 2003).

Al igual que ARP-1, HNF1 α puede modificar la transcripción mediada por el HNF4 α ya sea aumentando (Ktistaki y Talianidis, 1997) o disminuyendo la expresión de los genes blanco (Hu y Perlmutter, 1999, Sheena y cols., 2005).

En la posición -67 a -53 se identificó un elemento que tiene una homología perfecta con la secuencia consenso a la cual se une el HNF1 (Ameis y cols., 1990; Hadzopoulou y Cardot, 1993; Chang y cols., 1997). En estudios *in vitro* se observó que HNF1 α induce hasta 2.5 veces la expresión del gen de la *LH* gracias a este elemento (Rufibach y cols., 2006).

La co-transfección de HNF1 α y HNF4 α tiene un efecto aditivo sobre la actividad del promotor del gen de la *LH*, a diferencia de otros promotores activados por estos factores donde es posible observar un efecto sinérgico. Por lo tanto, es posible que en este promotor estos dos factores no interactúen entre sí, sino que más bien establecen contacto físico con componentes de la maquinaria de transcripción de forma individual (Rufibach y cols., 2006).

Los resultados anteriores en conjunto con el hallazgo de que el ratón deficiente de HNF1 α tiene una reducción del 80% del RNAm de la *LH* (Lee y cols., 1998, Shin y cols., 2001), son evidencias de que este factor de transcripción es importante para la expresión de la *LH* *in vivo*.

9.4 EL RECEPTOR FXR REPRIME LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA *LH*

El receptor X del farnesoilo (FXR) es un factor de transcripción que pertenece a la familia de receptores nucleares y se expresa principalmente en el hígado, riñón, las glándulas suprarrenales y el intestino (Seol y cols., 1995). Este receptor es activado por ácidos biliares, siendo su principal agonista el ácido quenodexosicólico; esto permite que el FXR juegue un papel central en el metabolismo de ácidos biliares, colesterol y lipoproteínas (Parks y cols., 1999; Sinal y cols., 2000; Claudel y cols., 2002; Davis y cols., 2002).

Tanto el ácido quenodexosicólico como el agonista sintético no esteroideo GW4064 son capaces de disminuir la expresión del gen de la *LH* de manera tiempo y dosis dependiente en células HepG2. Por otro lado, el silenciamiento específico del gen *FXR* mediante el uso

de un RNA de interferencia suprime el efecto del ácido quenodexosicólico sobre la expresión del gen de la *LH* (Sirvent y cols., 2004).

Ensayos de delección del promotor del gen de la *LH* humana en presencia de este factor de transcripción y su agonista permitieron determinar que la regulación del gen de la *LH* mediada por el FXR es posible gracias a un elemento de respuesta localizado entre los nucleótidos -698 y -541 (Sirvent y cols., 2004).

La mayoría de los elementos de respuesta del FXR reportados son secuencias repetidas invertidas separadas por un nucleótido, a ellas se une el FXR formando heterodímeros con el RXR α (Makishima y cols., 1999; Claudel y cols., 2002). Sin embargo, el promotor del gen de la *LH* no contiene algún sitio DR1 característico del FXR, por lo cual se propone el FXR regula la expresión de este gen de manera no clásica. Además se determinó mediante ensayos de EMSA que el FXR no se une a los oligonucleótidos que cubren la secuencia de -698 a -541; por lo tanto, se considera que el FXR regula la expresión de este gen de manera indirecta (Sirvent y cols., 2004).

9.5 LOS ESTRÓGENOS REGULAN LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA *LH*

El gen de la *LH* está sujeto a la regulación de hormonas sexuales, siendo las mujeres quienes presentan una concentración menor de la enzima (Bersot y cols., 1999). La ovulación y la terapia de reemplazo con estrógenos son las condiciones donde se observan las concentraciones más bajas de LH (Kinnunen y cols., 1980; Tikkanen y cols., 1986; Colvin y cols., 1991; Brinton, 1996). Tomando en cuenta que la actividad sérica de esta enzima tiene una relación inversa con los niveles de HDL, se considera que el efecto de los estrógenos sobre la actividad sérica de la LH es uno de los motivos por los que las mujeres presentan mayor concentración de colesterol HDL (Colvin y cols., 1991; Brinton, 1996).

En ratas el efecto de los estrógenos sobre la disminución de la actividad sérica de la LH parece estar dado por una represión en la transcripción del gen, ya que se ha observado una

disminución del mensajero (Staels y cols., 1990). En ensayos *in vitro* el estradiol reprime la actividad del promotor del gen de la *LH* humana en células HepG2 que expresan transitoriamente el receptor de estrógenos α (RE α). La represión es abolida cuando se transfectan mutantes del RE α que tienen la delección de los dominio AF-1, AF-2, dominio de unión al DNA, o los dominios de unión al ligando (Jones y cols., 2002).

El análisis de delección del promotor del gen de la *LH* permitió determinar que la secuencia necesaria para observar una respuesta a los estrógenos se localiza entre los nucleótidos -1557 a -1175. Dentro de esta secuencia se localiza un elemento de respuesta para AP-1, la mutación de este elemento resultó en la pérdida parcial de la represión mediada por los estrógenos, la cual fue comparable a la observada cuando se eliminan los nucleótidos -1577 a -1366. Los resultados anteriores demuestran que dentro de la secuencia -1366/-1175 existen otros elementos importantes para la represión mediada por los estrógenos que aún no se han caracterizado (Jones y cols., 2002).

Un ensayo de EMSA utilizando un oligonucleótido con la secuencia consenso de un elemento AP-1 y los extractos nucleares de células HepG2 incubadas con estradiol permitieron observar la formación de un complejo DNA-proteína. La actividad del promotor del gen de la *LH* disminuyó al 56% en presencia del RE α y un activador del AP-1 (forbol-12-miristato-13-acetato, PMA). Los resultados anteriores permiten considerar que la regulación de los estrógenos sobre el promotor del gen de la *LH* es a través de la interacción proteína-proteína entre el AP-1 y el RE α y no a través de la vía clásica donde es necesaria la presencia de un elemento de respuesta para el RE α (Jones y cols., 2002).

9.6 EL USF INCREMENTA LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN DE LA *LH* Y LA VARIANTE -514 C>T DISMINUYE ESTE EFECTO

En el promotor del gen de la *LH* se identificó la variante -514 C>T, la cual está en desequilibrio de ligamiento (se hereda de manera conjunta) con la variante -250 G>A. Estas

variantes se han relacionado con niveles altos de colesterol HDL y una actividad baja de la enzima LH en suero (Janseny cols., 1997; Guerra y cols., 1997).

Se transfectaron células HepG2 con un vector que contenía el gen reportero *CAT* bajo el control de la secuencia promotora que comprende los nucleótidos -895/+50. De forma individual y en conjunto los alelos -514T y -250A no modificaron la expresión del reportero (van't Hooft y cols., 2000). Cuando este experimento se reprodujo utilizando la secuencia promotora de -684/+27 se observó que la expresión del reportero era muy baja, por lo cual no era posible establecer el efecto de estos alelos (Botma y cols., 2001).

Considerando que en la secuencia 3' que precede al inicio de la transcripción se localizan elementos de respuesta que reprimen fuertemente la expresión del gen de la *LH* (Hadzopoulou y Cardot, 1993) se disminuyó la longitud de esta secuencia hasta -684/+14, logrando con ello un aumento de la actividad del gen reportero de tres a cinco veces (Botma y cols., 2001). En este sistema, al introducir las variantes -250A y -514T se observó una disminución del 44% en la expresión del reportero. Sin embargo, de forma individual los alelos -250A y -514T no presentaron ningún efecto. Al parecer ambas variantes tienen un efecto mínimo en la transcripción del gen, el cual sólo es perceptible cuando ambos efectos se suman (Botma y cols., 2001).

Al utilizar otro sistema que incluía la transfección de células hepáticas murinas (AML12) y el uso del reportero luciferasa bajo el control de la secuencia promotora -639/+28, se observó que el alelo -514T disminuía en un 30% la actividad del promotor con respecto al alelo silvestre. La actividad del promotor utilizando la combinación entre el alelo -514T y el alelo -250G fue la misma que cuando se utilizó la combinación -514T y -250 A (30%). Por lo cual se concluyó que al menos en este sistema el polimorfismo -250 G>A no tenía efecto alguno (Deeb y Peng, 2000).

La diferencia entre los ensayos realizados por Deeb y Botma probablemente se deba a que las células AML12 no expresen todos los factores de transcripción necesarios para la expresión del gen de la *LH* humana; en particular aquellos a través de los cuales se media el

efecto de la variante -250 G>A. Esto explica porque en estas células la variante -250 G>A no tiene efecto, además de que en las células HepG2 la combinación de los alelos -514T y -250A causan una disminución de la actividad del promotor de hasta el 44% mientras que en la células AML12 esta combinación de alelos sólo disminuye el 30% de la actividad del promotor (Deeb y Peng, 2000; Botma y cols., 2001).

La secuencia -1865 a +129 del promotor del gen de la *LH* fue sujeta a un análisis de interacción DNA-proteína usando los extractos nucleares de hepatocitos de rata (Hadzopoulou y Cardot, 1993) y de células HepG2 (Oka y cols., 1996). La secuencia contigua a la posición -514 no fue protegida de la digestión con DNasa I, sin embargo el análisis bioinformático utilizando las bases de datos del Tansfac DataBank y TFSEARCH proponen la existencia de un elemento de respuesta para USF (upstream stimulatory factor) y N-Myc (Alex y cols., 1992; Deeb y Peng, 2000; Botma y cols., 2001). La secuencia consenso para el USF es NCACGTGN, por lo tanto la sustitución de C>T en la secuencia homóloga del promotor del gen de la *LH* (CACGGG) podría eliminar la posibilidad de unión del USF (Deeb y Peng, 2000).

En lo que respecta a la variante -250 G>A, ésta se localiza en un secuencia (-255 a -185); protegida de la digestión con DNasa I gracias a la presencia de extractos nucleares de hepatocitos de rata (Hadzopoulou y Cardot, 1993). En un análisis *in silico* se determinó que la variante -250 G>A afecta la unión de los factores de transcripción c-Myb y CDP. Sin embargo, no se han realizado estudios funcionales para saber si estos factores de transcripción modifican la expresión del gen de la *LH* y tampoco se sabe si transcriben otros genes que tenga relevancia en el metabolismo de lípidos o lipoproteínas (Botma y cols., 2001).

Los factores de transcripción USF⁴³ y USF⁴⁴ se expresan en varios tejidos de mamíferos, estos factores regulan la expresión de genes lipogénicos como es *L-PK*, *THRSP* y la sintasa de ácidos grasos (Wang y Sul, 1994; Vaulont y Kahn, 1995). En el hígado de las ratas, la proteína USF⁴³ se sobre-expresa en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa e insulina (Wang y Sul, 1994).

En un ensayo de EMSA, utilizando un oligonucleótido con la secuencia de los nucleótidos -531 a -502 del promotor del gen de la *LH*, la proteína USF y un anticuerpo anti-USF⁴³ se observó la formación de un complejo DNA-proteína. La formación de este complejo disminuyó cuando el oligonucleótido contenía el alelo T de la variante -514C>T (Botma y cols., 2001).

Para conocer cuál era el efecto de la unión del factor USF en el promotor del gen de la *LH*, se co-transfectaron células HepG2 con un vector de expresión del USF⁴³ y un vector con el reportero *CAT* bajo el control del promotor del gen de la *LH*. El factor USF⁴³ incrementó de manera dosis dependiente la actividad del promotor del gen de la *LH*. Sin embargo, este efecto se atenuó con la presencia del alelo -514T (Botma y cols., 2001).

Potencialmente un incremento de la expresión de USF⁴³ en condiciones de glucosa elevada y/o insulina tal como ocurre en el postprandio o en estados de hiperinsulinemia pueden por lo tanto, aumentar la transcripción del gen de la *LH* (Wang y Sul, 1994; Vaulont y Kahn, 1995; Botma y cols., 2001). No obstante, la presencia del alelo -514 T podría estar evitando la unión del USF a su elemento de respuesta y por lo tanto disminuir el efecto que la insulina ejerce sobre el promotor del gen de la *LH*.

10. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA LH

La proteína transcrita por el gen de la *LH* consta de de 499 aminoácidos que incluyen el péptido señal de 22 residuos (Martin y cols., 1988), de tal manera que la proteína secretada y activa esta conformada de solo 477 aminoácidos. La secuencia de la proteína contiene varios microdominios funcionales; entre ellos se encuentran 2 segmentos de 10 residuos hidrofóbicos que interactúan con lípidos. Cada segmento contiene un residuo de serina (Ser 168 y Ser 289).

En la LH humana, la Ser 168 se localiza en el centro de la firma Gly-X-Ser-X-Gly, la cual es parte de la triada catalítica Ser-Asp-His (Ser168, Asp194, His279), localizada en otros

miembros de la familia de la LH; incluidas la lipasa endotelial, la LPL, la lipasa pancreática y otras esterasas (Stahnke y cols., 1987; Jaye y cols., 1999). La mutagénesis sitio dirigida del residuo Ser 168 demostró que este residuo es esencial para la actividad catalítica (Davis y cols., 1990).

La LH contiene 10 residuos de cisteína separados físicamente en igual distancia que en la proteína LPL y la lipasa pancreática, lo anterior sugiere que la formación de puentes disulfuro es importante para la conformación activa de estas enzimas.

La LH humana contiene cuatro sitios probables de unión a heparina, ya que presenta secuencias XBBBXXBX y XBBXBX (163HKIGRITG y 294CKKGRC), donde B es un residuo básico; se considera que estas secuencias pueden interactuar con heparán sulfatos en la superficie de las células (Stahnke y cols., 1987; Sendak y cols., 2000).

De acuerdo con el análisis de la estructura primaria de la proteína, las firmas y microdominios anteriores pueden estar formando parte de alguno de los 2 macrodominios bien definidos: el dominio de lipasa y el dominio PLAT (polycystin-1, lipoxygenase, alpha-toxin, por sus siglas en inglés) (Figura 6).

El dominio de lipasa es un dominio que está presente en todas las triacilglicerol lipasas (EC 3.1.1.3). Las lipasas son enzimas lipolíticas que hidrolizan los enlaces éster de los triglicéridos. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en el reino animal así como en plantas y procariotes (Chapus y cols., 1988). En los vertebrados existen al menos 3 isoenzimas tejido específico: la pancreática, hepática, gástrica/lingual. Estos tres tipos de lipasas están muy relacionadas entre si, así como con la LPL (Persson y cols., 1989).

La secuencia más conservada de este dominio se centra alrededor del residuo de serina que forma parte de la triada catalítica (Blow, 1990). En la LH este dominio abarca del residuo 19 a 349.

El dominio PLAT o LH2 (lipoxigenasa), está distribuido en una gran variedad de proteínas asociadas a lípidos o a la membrana plasmática (Tomchick y cols., 2001), y en la mayoría de las proteínas en que se ha localizado presenta una longitud aproximada de 150 residuos.

En la secuencia de la LH, este dominio está distribuido del residuo 352 a 487. La función propuesta de este dominio es favorecer la interacción con otras proteínas además de que puede estar mediando la interacción de la cadena polipeptídica con lípidos (Bateman y Sandford, 1999; Delrieu y cols., 2002).

La estructura tridimensional del dominio PLAT es un sandwich β conformado de 2 hojas β con 4 cadenas cada una. La secuencia más conservada del dominio PLAT coincide con las cadenas β ; dentro de estas los residuos más conservados son residuos no superficiales. En todos los eucariotes además, es una constante que la quinta cadena β del dominio PLAT tiene un residuo en la superficie cargado positivamente (lisina/arginina). La conservación de estos residuos cargados en la superficie indica que justo aquí es donde se localiza el sitio de unión al ligando (Bateman y Sandford, 1999).

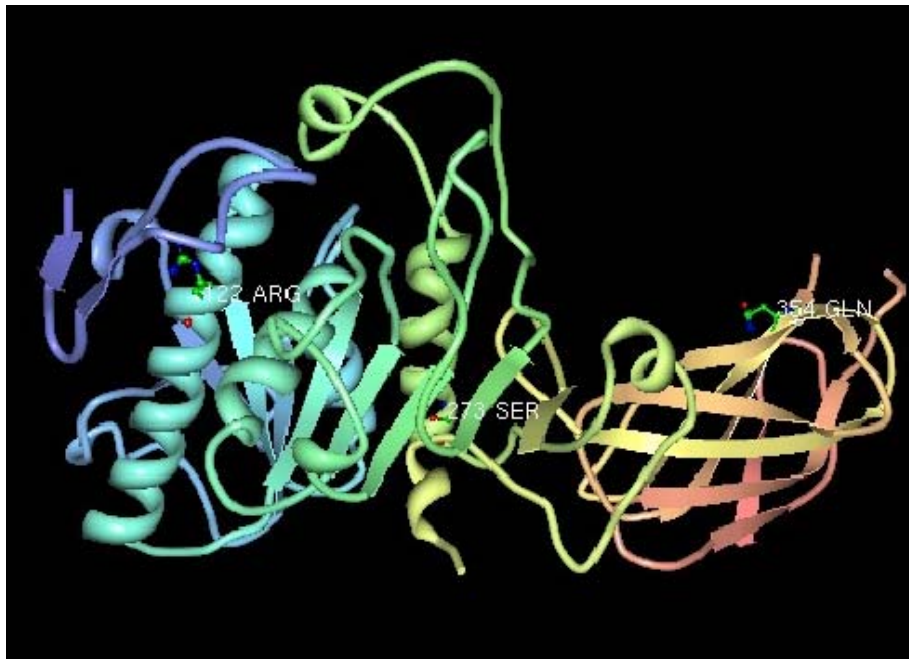


Figura 6. Dominios de la LH humana. En esta figura se ilustra la estructura probable de la lipasa humana, en ella se observa a la derecha en amarillo y naranja el dominio PLAT constituido por un sandwich β formado con 8 cadenas β ; a la izquierda en azul y verde se presenta el dominio lipasa, en esta estructura destacan 4 helices α capaces de interactuar con lípidos. Modelo generado gracias al software CLC combined Workbench.

11. SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA LH

La LH es secretada como una glucoproteína que es sintetizada en retículo endoplásmico (RE). En el RE, el péptido señal ubicado en el extremo amino se pierde y la proteína adquiere varias moléculas del azúcar manosa. Durante el tránsito a través del Golgi la LH obtiene oligosacáridos complejos que contienen ácido siálico (Cisar y Bensadoun, 1987). La forma madura de la proteína (57-59 kDa, en la rata) es rápidamente secretada, y se ha calculado que el tiempo medio de residencia en el hepatocito es de 60 minutos (Cisar y Bensadoun, 1987). En la rata, la enzima contiene 2 sitios de N-glucosilación, se ha observado que la mutación de alguno de ellos interfiere con el procesamiento adecuado de la proteína (Stahnke y cols., 1991). Por otro lado, es necesario que se pierdan los residuos de manosa para que la LH secrete adecuadamente (Verhoeven y Jansen, 1990).

La LH humana tiene 4 sitios de glucosilación, los cuales se encuentran en las posiciones 20, 56, 340, y 375 (Wolle y cols., 1993; Ben-Zeev y cols., 1994). La Asn56, es un residuo conservado que es crucial para la secreción de la LH activa (Wolle y cols., 1993). La unión de la LH con la proteína chaperona calnexina incrementa la eficiencia de la exportación de la proteína desde el RE (Boedeker y cols., 1999), y mediante diferentes técnicas se ha determinado que la LH se secreta como un homodímero activo (Hill y cols., 1996).

La mutación Ser289Phe fue descrita en un paciente con deficiencia de LH, este cambio se encontró en asociación con la mutación Thr405Met; la primera mutación modificaba la actividad de la enzima mientras que la segunda causa disminución en la secreción; por lo cual se considera que la presencia de este residuo podría ser importante para un adecuado tráfico de la proteína (Hegele y cols., 1994).

Experimentos de inmunolocalización en diferentes tejidos de ratones y conejos que sobreexpresan la LH humana revelan que ésta se localiza principalmente en la superficie de los sinusoides hepáticos y en las microvellosidades de las células parenquimales (Breedveld y cols., 1997; Sanan y cols., 1997). Esta enzima también se localiza en los vasos sanguíneos de las glándulas suprarrenales (Persoon y cols., 1986) y su actividad puede ser inducida por

corticotropina (Jansen y cols., 1983). En el ovario y específicamente en el cuerpo lúteo se reportó una actividad mínima de la enzima en la pre-ovulación (Jansen y cols., 1985).

Tanto en las glándulas suprarrenales como en los folículos de la rata y el humano se ha identificado la presencia de un RNAm truncado, el cual carece de los dos primeros exones. Este RNAm codifica una proteína de 45kDa que no tiene actividad catalítica además de que no se secreta (Verhoeven y cols., 1994a, Verhoeven y cols., 1994b). Por lo tanto se considera que la enzima activa es sintetizada en los hepatocitos, pasa a la circulación y gracias a esto puede adherirse al ovario y los vasos sanguíneos de las glándulas suprarrenales (Hixenbaugh y cols., 1989; Verhoeven y cols., 1994a).

12. DEFICIENCIA GENÉTICA DE LH

La deficiencia genética de LH es una enfermedad con herencia autosómica recesiva; los primeros pacientes descritos presentaban hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, y un riesgo incrementado de desarrollar enfermedad arterial coronaria (EAC) prematura a pesar de tener niveles elevados de colesterol HDL (Connelly y cols., 1990; Hegele y cols., 1992; 1993). Las mutaciones identificadas en estas dos familias fueron S289F (la enzima no tiene actividad) y T405M (la enzima sólo tiene un 30% de actividad) (Durstefeld y cols., 1994).

En estas familias los pacientes con deficiencia severa se caracterizan por tener VLDL con migración pre- β ; (VLDL pre- β , lipoproteínas con alto contenido en lípidos), cuando los niveles de triglicéridos se elevan por arriba de 1 mM/l, sin embargo, el contenido de colesterol LDL y HDL puede ser normal o estar incrementado (Huff y cols., 1993). Las partículas VLDL de estos pacientes contienen predominantemente ApoB-100 y ApoE; y en cultivo celular estas lipoproteínas tienen una gran habilidad para estimular la transformación de los macrófagos a células espumosas (Connelly y cols., 1988; Huff y cols., 1993). La presencia de células espumosas es un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria.

En una familia finlandesa se identificaron 2 mutaciones: R208H (la enzima no es secretada) y L356F (la enzima presenta solo un 30% de actividad). A pesar de que ambas mutaciones se encuentran en el mismo cromosoma, los miembros afectados presentan elevaciones moderadas de triglicéridos totales, triglicéridos en IDL y LDL, así como concentraciones moderadas de LDL carente de colesterol y rica en triglicéridos (Knudsen y cols., 1997).

Otros pacientes con deficiencia de LH son heterocigotos compuestos L356F/T405M y presentan un fenotipo muy sutil; con ligero incremento de colesterol LDL, así como un incremento en colesterol HDL, en particular de las subfracciones de mayor diámetro y menor densidad HDL_{2a} y HDL_{2b} (Knudsen y cols., 1996). También las partículas LDL son más ligeras, menos densas, y con un diámetro mayor (Auwerx y cols., 1989). Estas enormes partículas LDL contienen ApoB-100 y están enriquecidas de triglicéridos.

Un paciente con deficiencia severa de LH y sólo un 50% de la actividad normal de la LPL presentaba una disminución en la conversión de las VLDL pequeñas a IDL, y así mismo un decremento importante en la conversión de IDL a LDL (Demant y cols., 1988). Otro paciente con una mutación homocigota en sitio de procesamiento del exón 1, que genera un transcrito truncado tenía hipertrigliceridemia y EAC prematura (Brand y cols., 1996).

Dos hermanos con deficiencia de LH presentaron EAC prematura con hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y niveles elevados de colesterol HDL y ApoA-I. Cuando se sometieron a tratamiento con andrógenos (estanozolol, un potenciador de la actividad de la LH), los pacientes presentaron una disminución parcial de colesterol HDL₂ y de ApoA-I (Bausserman y cols., 1997).

En conclusión, estos resultados muestran que las principales características de los pacientes con deficiencia de LH son incremento en las IDL (lo cual es equivalente a un incremento de las LDL de gran tamaño), niveles disminuidos de las LDL de radio normal, y acumulación de las HDL grandes y abundantes en triglicéridos. Estos hallazgos son consistentes con los estudios *in vitro* e *in vivo*, demostrando que la LH juega un papel importante en la

conversión de VLDL pequeñas a IDL; así como la conversión de IDL a LDL, y en el remodelaje de la HDL₂ abundantes en triglicéridos para transformarlas en partículas pequeñas (Shirai y cols., 1981; Goldberg y cols., 1982).

13. FACTORES QUE MODIFICAN LA ACTIVIDAD Y LOS NIVELES DE LH

Algunos nutrientes son capaces de modificar la actividad de la LH. En ratas se ha observado que la actividad de esta enzima puede ser inhibida por dietas abundantes en grasas saturadas (Summerfield y cols., 1984) o enriquecida con aceite de pescado (Benhizia y cols., 1994a). En cambio las dietas enriquecidas en colesterol reducen la actividad sérica de la LH ya que disminuyen la expresión del gen en un 30% (Benhizia y cols., 1994b).

Los fibratos son fármacos hipolipemiantes capaces de activar a los factores de transcripción PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor). En sujetos normolipémicos así como en sujetos hipertriglicéridémicos estos fármacos incrementan la actividad sérica de la LH, no obstante, no se ha identificado un elemento de respuesta para estos factores de transcripción en el gen de la *LH* (Miller y Spence, 1998). En contraste, las estatinas disminuyen la actividad sérica de la LH en pacientes dislipidémicos. Este efecto es alelo específico, ya que los portadores del genotipo -514 C/C experimentan una disminución mayor (Zambon y cols., 2001).

La administración de una infusión de heparina remueve la LH de los capilares hepáticos; y el uso prolongado puede incrementar la actividad sérica de la enzima. Al parecer este fármaco tiene dos acciones: por un lado estabiliza la estructura de la proteína, lo cual inhibe su degradación además de que incrementa la transcripción del gen de la *LH* (Bush y cols., 1989; Ragab y cols., 1995).

En cuanto al control hormonal, los estrógenos disminuyen la actividad sérica de la LH, debido a que disminuyen la transcripción del gen (Jones y cols., 2002); mientras que progestágenos y esteroides anabólicos incrementan su actividad (Tikkanen y cols., 1982;

Sorva y cols., 1988). En humanos, la corticotropina disminuye significativamente la actividad sérica de la LH, aunque el mecanismo de acción se desconoce (Berg y Nilsson-Ehle, 1994).

La actividad de la LH varía en paralelo con los niveles de hormonas tiroideas, tal como se observa en enfermos con hipo e hipertiroidismo, o después de la administración de tiroxina (Valdemarsson y cols., 1983). Aunque el mecanismo mediante el cual estas hormonas actúan no es muy claro, ya que en células cultivadas en presencia de hormonas tiroideas la actividad de la LH se incrementa, pero no se modifican las concentraciones del RNAm o de la proteína. Por lo tanto en los pacientes que tienen alterados los niveles de hormonas tiroideas suelen modificarse los perfiles lípidicos (Kihara y cols., 1993).

La insulina es una hormona que se relaciona positivamente con la actividad sérica de la LH, incluso en los pacientes insulino dependientes la actividad de la LH está reducida en un 50% (Caixas y cols., 1998). En estos pacientes la administración intraperitoneal de la hormona, incrementa la actividad de la LH (Ruotolo y cols., 1994). Tanto en pacientes con diabetes tipo 2 así como personas normoglucémicas, los niveles elevados de insulina están asociados con actividad elevada de la LH, así como con niveles bajos de colesterol HDL₂ (Syvanne y cols., 1995). Parece ser que la LH es la responsable de la relación inversa entre los niveles de insulina y la concentración de colesterol HDL. En ratas, la insulina también estimula la actividad de la LH secretada por los hepatocitos (Emmison y cols., 1992), pero no se sabe aún si la regulación de la insulina incluye mecanismos transcripcionales o post-transcripcionales.

Las catecolaminas son responsables de los cambios en la expresión de la LH asociados con la alimentación y el ayuno. La adrenalina reduce la secreción de la LH por los hepatocitos, principalmente por un mecanismo post-traducciona (Neve y cols., 1997).

En el ratón (ob/ob) deficiente en leptina los niveles del RNAm de la LH disminuyen; en estos animales la administración de leptina logra restablecer los niveles expresión de la LH (Liang y Tall, 2001), aunque el mecanismo de acción no se ha establecido.

Lo anterior demuestra que la expresión del gen de la *LH* así como la actividad de la enzima están influenciadas por hormonas, fármacos y el estado nutricional de un individuo; de tal manera que la actividad sérica de cualquier sujeto dependerá de la suma de estos factores.

Otro factor que también tiene una gran importancia en la regulación de la actividad enzimática de la *LH* son las variantes alélicas del gen que la codifica, por lo tanto varios grupos de investigación se han dado a la tarea de desarrollar estrategias para su identificación.

14. JUSTIFICACIÓN

La hipoalfalipoproteinemia (niveles de colesterol HDL < 35 mg/dl) está presente en el 50% de la población mexicana. Esta dislipidemia es un factor de riesgo mayor para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria así como de la enfermedad cerebro vascular, entidades clínicas que ocupan las primeras causas de muerte en México.

Se ha hecho evidente que la variación en los niveles de estas lipoproteínas tiene un componente genético, y en la mayor parte de los casos este rasgo presenta un patrón de herencia poligénica.

Las bases genéticas de la regulación de los niveles de HDL en la población mexicana no han sido estudiadas. El conocer las variantes alélicas que modifican los niveles de las HDL podría ayudarnos a implementar medidas oportunas de detección en los pacientes en riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular.

15. HIPÓTESIS

En la población mestiza mexicana es posible que existan variantes alélicas en el gen de la *LH* que participan en la modulación de los niveles del colesterol HDL.

16. OBJETIVO GENERAL

Identificar variantes alélicas con posible repercusión funcional en el gen de la *LH* relacionadas con la modulación de los niveles plasmáticos de las HDL en población mexicana.

17. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Buscar SNPs en el promotor y la secuencia codificante del gen de la *LH* en sujetos mexicanos con hipoalfalipoproteinemia e hiperalfalipoproteinemia.
- 2.- En el caso de localizar SNPs no sinónimos, predecir el efecto del cambio de aminoácido sobre la función de la proteína.
- 3.-Analizar si existen variantes alélicas que pudieran modificar los elementos de respuesta del promotor del gen de la *LH* .

18. MATERIALES Y MÉTODOS

18.1. SUJETOS DE ESTUDIO

Los sujetos de estudio fueron captados a través de la consulta de Endocrinología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ). El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación en Humanos del INCMNSZ y los médicos tratantes obtuvieron el consentimiento informado de cada uno de ellos (Anexo 1).

18.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1) Individuos mestizos mexicanos de ambos géneros con hipoalfalipoproteinemia (colesterol HDL <percentila 10, calculada por edad y genero) y TG < 150 mg/dl. Se consideró como mexicanos aquellos sujetos cuyos abuelos y padres son de origen mexicano. Edad de 20-69 años
- 2) Individuos mexicanos con hiperalfalipoproteinemia (colesterol HDL > percentila 90). El rango de edad fue el mismo que para el grupo de hipoalfalipoproteinemia.

18.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1) Obesidad (índice de masa corporal, IMC \geq 30), diabetes, enfermedad hepática, enfermedad renal, disfunción tiroidea, alcoholismo, tabaquismo, infección aguda durante 3 semanas previas a la toma de la muestra, tratamiento con hormonas esteroides, y tratamiento con fármacos hipolipemiantes.

18.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se incluyeron 30 individuos de cada grupo, 15 de ellos son hombres y 15 son mujeres.

18.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y ANTROPOMÉTRICOS

En el Departamento de Endocrinología del INCMNSZ se determinaron los parámetros bioquímicos usando procedimientos comerciales estandarizados (Boehringer-Mannheim). Se obtuvo una muestra de sangre de cada uno de los participantes después de 12 horas de ayuno. La glucosa, creatinina, colesterol total, triacilgliceroles y el colesterol HDL se determinaron por métodos enzimáticos. El colesterol LDL se midió por la fórmula de

Friedewald; la ApoA-I y la ApoB se determinaron por nefelometría (Anderson y cols., 1987). Mientras que la concentración de insulina se midió por radioinmunoensayo.

A cada uno de ellos se le realizó un cuestionario (Anexo 2) para recabar datos acerca de su estatus socioeconómico e historia médica familiar. Este cuestionario nos permitió descartar a los sujetos que consumían alcohol y tabaco, así como aquellos que utilizaban fármacos o tenían alguna enfermedad que modificará los perfiles lipídicos. Se determinó la circunferencia de la cintura y la cadera, el peso, la talla y la presión arterial.

18.4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA BÚSQUEDA DE VARIANTES ALÉLICAS EN EL GEN DE LA LH

18.4.1. TOMA DE MUESTRA

Se tomó una muestra de 5 ml de sangre periférica a cada uno de los participantes en el estudio. El anticoagulante utilizado fue EDTA y cada muestra permaneció a -20 °C antes de la purificación de DNA.

18.4.2. OBTENCIÓN DEL DNA GENÓMICO

Se realizó purificación de DNA a partir de sangre total mediante la técnica que utiliza fenol (Sambrook y cols., 1989). Cada muestra se homogeneizó y se transfirieron 0.5 ml de sangre a un tubo de 1.5 ml, adicionándole 1 volumen del amortiguador de lisis de glóbulos rojos (5 mM de MgCl₂, 10 mM Tris HCl pH 7.6, 10 mM de NaCl), se mezclaron las muestras en el tubo para después ser centrifugadas por 10 min a 5,000 rpm y a temperatura ambiente. Después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante.

Al botón de células se le agregó 380 µl de amortiguador para la lisis de células blancas (10 mM de Tris HCl pH 7.6, 50 mM de NaCl, 10 mM de EDTA pH 8.0, 0.2% de SDS, 200 µg/ml de proteinasa K), y se incubó a 55 °C por 30 minutos. Después de la incubación se extrajo el DNA; al tubo anterior se le añadieron 200 µl de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25: 24: 1), se mezcló en vortex, y se centrifugó a 12,000 rpm en microcentrifuga a temperatura ambiente por 1 min. La fase superior (acuosa) se transfirió a

un tubo de 1.5 ml y se le adicionó 10 µl de NaCl 5 mM y 1 ml de etanol frío (-20 °C). Se mezcló suavemente por inversión hasta que el DNA precipitó. Se centrifugó a 12,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 ml de etanol frío al 80%. El botón se secó y se resuspendió en agua estéril. Para la solubilización completa del DNA, el tubo se dejó a 50 °C por 12 horas.

18.4.3. INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Se analizó el DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 0.7 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ml), en amortiguador TBE (Tris base 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 0.002 pH 8), el corrimiento se realizó a 100 volts por 20 minutos. Después de la electroforesis la integridad del DNA se analizó exponiendo el gel a un transiluminador de luz UV.

El DNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y también se midió la absorbancia a 280 nm. Se calculó la relación de absorbancias 260 nm/280 nm para saber si las muestras de DNA no contenían proteínas a una concentración tal que pudieran interferir con la reacción de PCR.

18.4.4. REACCIÓN DE PCR

18.4.4.1. FUNDAMENTO

La técnica de PCR (polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa) se fundamenta en la amplificación de secuencias específicas de DNA mediante una reacción *in vitro*. Esto nos permite obtener varias copias de un fragmento de DNA. Para enmarcar la secuencia de interés, se utilizan dos oligonucleótidos (secuencias cortas de nucleótidos). La reacción se lleva a cabo en un termociclador, aparato en el que se pueden alcanzar diferentes temperaturas, además de que estas se mantienen por un tiempo específico; logrando así la determinación de un ciclo que se puede repetir varias veces.

Durante estos ciclos el DNA templado se desnaturaliza a una temperatura de 95°C, en el siguiente paso, los oligonucleótidos se alinean con su secuencia blanco a una temperatura entre 55°C y 68°C, lo cual evita uniones inespecíficas. En el último de los pasos la temperatura se incrementa a 72°C para sintetizar nuevas copias del DNA gracias a una

polimerasa termoestable (Taq polimerasa) que incorpora los nucleótidos para formar las cadenas hijas a partir del DNA templado (Saiki y cols., 1985; Mullis y Faloona, 1987).

Se realizan entre 25 y 40 ciclos dependiendo de la sensibilidad del método que se va a utilizar para la detección del producto de PCR. Por otro lado, la eficiencia de la reacción de PCR no es la misma para todos los sistemas y esta depende principalmente de la naturaleza de cada fragmento de DNA y de la calidad del DNA templado. De tal manera que a menor eficiencia de reacción y menor sensibilidad del método de detección se deberán realizar un mayor número de ciclos. Sin embargo, es importante mencionar que existe un límite en el número de ciclos que podemos realizar, ya que como en cualquier reacción la disponibilidad de los reactivos disminuye a medida que estos se van consumiendo para generar los productos; además de que la enzima pierde actividad en cada ciclo que se realiza.

Finalmente es posible comprobar que se obtuvo el producto deseado por medio de una electroforesis, en la cual se corre un marcador de DNA para comprobar que el producto tiene la calidad y el tamaño adecuado.

18.4.4.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA TÉCNICA DE PCR

El volumen total de reacción de la mezcla para la PCR fue de 15 μ l. Esta mezcla contenía: 1.5 μ l de amortiguador 10X (Tris-HCl 150 mM pH 8, KCl 500 mM), 0.9 μ l de MgCl₂ 25 mM, 1.2 μ l de una mezcla equimolar al 2.5 mM de nucleótidos (adenina, citosina, timina, y guanina), 50 ng de cada oligonucleótido, 0.5 U de Taq polimerasa (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems), 50 ng de DNA genómico y agua para completar 15 μ l.

La temperatura inicial de desnaturalización fue de 95°C durante 10 minutos; se siguieron 35 ciclos que incluían cada uno 3 temperaturas: temperatura de desnaturalización a 95°C, temperatura de alineamiento específica para cada reacción y temperatura de elongación a 72°C. Cada una de las 3 temperaturas anteriores se mantuvo por 30 segundos; y finalmente una temperatura de elongación de 72°C por 10 minutos.

Las temperaturas específicas de apareamiento se muestran en la tabla 1. Los oligonucleótidos se sintetizaron en base a la secuencia publicada del gen, utilizando para esto el software Oligos (Institute of Biotechnology, University of Helsinki). Estos oligonucleótidos se unen a secuencias intrónicas, por lo tanto nos permitieron también el estudio de las secuencias intrón-exón. Además de la secuencia codificante del gen, se estudió una kilobase hacia la secuencia 5' de la caja TATA.

Fragmento	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido	Tamaño pb	Temperatura°C
Exón 1	TGGGGGCAGTAAAGAAAGGG	CTGGCACGCTCTGAAGCAAGC	360	65
Exón 2	GCAGATGCCAGGCTAAGCACC	TGGAGTTGTTATCACCAGCTCCC	335	65
Exón 3	GGGAGAAAAGGAAACTAGTGCAGC	GGAGGGAAAAGGAGGGAAGGG	279	65
Exón 4	GCAAAAAGGCTTTCATCCAGGCAG	CCTTGTTGGATGCCCTATGGAG	290	65
Exón 5	CCCCTCTCCTTGCTCCTGCG	CCCATTGAAATGTAGGCCGGTG	235	60
Exón 6	GGCTGCTTTGGGTTAAGGGGTG	CCAGGAAAGAAGCCAAGGGGAC	329	65
Exón 7	GCAATGTGTTCTCTCTTGCCTTG	CTGGAATAAAGTAGTTGTAGCTGGC	380	60
Exón 8	GAACACTAGTTTGGGAAATGCAGC	GAGTATTAATTTGTGAGACTGCCTGG	656	65
Exón 9	TGAAACACTTCAATAAGCTCCACC	TTGGCTTCTAAATAAGGCAGC	427	60
LHP1	GGCACTCACCTCCACGCCAG	TGCAAGGGGGATGCTGGCTCAG	627	65
LHP2	CTTCGTCAGCTCTTTTGACACGG	CGGGTCCAGGCTTCTTGG	564	65

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el estudio del gen de la *LH*. Fragmento indica el exón amplificado, Oligonucleótido sentido y antisentido indican la secuencia de los oligos, Tamaño pb indica el tamaño del amplificado en pares de bases, y Temperatura indica la temperatura de apareamiento.

18.4.5. TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE DNA

18.4.5.1. FUNDAMENTO

Durante la electroforesis capilar del DNA, uno a uno los nucleótidos marcados con un fluoróforo pasan por una ventana donde un rayo láser los excita y emiten fluorescencia. La longitud de onda de emisión dependerá de la estructura química del fluoróforo, con el que esté marcado cada nucleótido (R6G para Adenina, ROX para Citosina, R110 para Guanina y TAMRA para Timina). La longitud de onda de emisión así como su intensidad son detectadas por un mecanismo sensible a fluorescencia.

Esta información es transferida a una computadora, un software la transforma para que se pueda interpretar. Finalmente, lo que se obtiene es un registro gráfico en 4 colores (cada uno identifica la presencia de una de las cuatro bases nitrogenadas de DNA) llamado electroferograma. Este registro muestra la secuencia de los nucleótidos amplificados por una

PCR y las señales registradas se presentan como picos de colores, cada pico presenta un solo color y este corresponde al nucleótido que fue detectado en la ventana.

18.4.5.2. CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE DNA

Para la secuenciación automatizada primero se realizó una amplificación por PCR de las muestras de interés. Los productos de esta primera reacción se purificaron en columnas QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit). Las etapas para la purificación incluyen: unión del DNA a la matriz de la columna, lavado del DNA con un amortiguador, secado del DNA y elusión con agua bidestilada libre de DNAsas. Una vez purificados los productos se utilizaron como DNA templado para una segunda reacción de PCR.

Durante la reacción se incorporan nucleótidos fluorescentes (DNA Sequencing Kit BigDye Terminator v 3.0, Applied Biosystems) y sólo se amplificó una de las cadenas de cada alelo para evitar interferencia de las cadenas complementarias en el momento de la electroforesis. Por lo tanto la mezcla de reacción para PCR sólo incluyó el oligonucleótido sentido o antisentido.

La mezcla de reacción de la PCR para la incorporación de los nucleótidos fluorescentes fue la siguiente: 2 µl del reactivo BigDye, 3 µl de amortiguador 5X, 50 ng del oligonucleótido, 100 ng del DNA templado purificado y agua hasta completar 20 µl. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: la temperatura inicial de desnaturalización fue de 95 °C durante 3 minutos; para la amplificación se utilizaron 25 ciclos que incluían cada uno 3 temperaturas: temperatura de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, temperatura de apareamiento de 52 °C por 10 segundos y temperatura de elongación a 60 °C por 4 minutos; finalmente se utilizó una temperatura de elongación de 60 °C la cual se mantuvo por 7 minutos.

Los productos de la reacción de incorporación se purificaron en columnas de sephadex G50 hidratado (CentriSep, Applied Biosystems), el producto ya purificado se secó a temperatura ambiente por 20 minutos en un secador a vacío. Una vez secos los productos se

resuspendieron en una solución de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), y se colocaron en una placa de 96 pozos.

Los productos de la PCR se desnaturalizaron por 2 minutos a 95°C y se pasaron a hielo. La placa con las muestras se colocó en el secuenciador automático (ABIPRISM modelo 3100); aquí cada una de las muestras se sometió a electroforesis capilar utilizando el amortiguador TBE 1X y una matriz de acrilamida (POP6 de Applied Biosystems).

18.4.6. PREDICCIÓN TEÓRICA DE LOS EFECTOS DE LAS VARIANTES NO SINÓNIMAS DE LA SECUENCIA CODIFICANTE

18.4.6.1. FUNDAMENTO

Gran parte de las variaciones en el genoma humano son variaciones de un solo nucleótido también conocidas como SNPs. Se sabe que algunas de estas variaciones son causa de diferencias fenotípicas entre los individuos. Se ha demostrado en estudios recientes que es posible predecir el efecto de variantes no sinónimas sobre la función/estructura de una proteína vía el análisis de alineamientos múltiples de secuencias y el análisis de estructuras tridimensionales de proteínas (Sunyaev y cols., 2001; Ramensky y cols., 2002).

El programa PolyPhen de la EMBL-Heidelberg es una herramienta bioinformática para la predicción del posible impacto de la sustitución de un aminoácido en la estructura y/o la función de una proteína. Esta predicción está basada en reglas empíricas que son aplicables a la secuencia, filogenia y la información estructural que caracteriza a la sustitución (<http://coot.embl.de/PolyPhen/>).

18.4.6.2. CONDICIONES DEL ANÁLISIS *IN SILICO*

Se realizaron dos análisis en los que únicamente se modificó la base de estructuras de proteínas contra las que se compararía nuestra proteína; de tal forma que se utilizó la base PQS (Protein Cuaternary Structure) y el PBD (Protein Data Bank). En cuanto a los demás parámetros se utilizaron las condiciones estándar. Estos incluyeron realizar un alineamiento de secuencias con una longitud mínima de 100 aa y una identidad de al menos 50%, la longitud máxima de “gap” en el alineamiento fue de 20 aa y la resolución mínima en la estructura tridimensional de 6 Å.

19. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas 2 y 3 se muestran los valores promedio y la desviación estándar de las características generales y los perfiles lipídicos de los sujetos de estudio. Los 60 participantes cumplieron con los criterios de selección y de todos ellos se realizó purificación de DNA.

	EDAD	IMC	W/H	PAS	PAD
HDL ↓	35.6 ± 14.7	25.1 ± 3.0	0.84 ± 0.06	112 ± 12.5	73.3 ± 10.1
HDL ↑	38.6 ± 17.8	22.8 ± 2.8	0.85 ± 0.06	117 ± 16.2	78.5 ± 8.26

Tabla 2. Características generales de los sujetos de estudio. Edad en años; IMC, índice de masa corporal; W/H, índice cintura cadera; PAS y PAD, presión arterial sistólica y diastólica respectivamente (mmHg).

	HDL	LDL	ApoA-I	ApoB	TG	CT	Glucosa	Creatinina	A. UR.
HDL ↓	30 ± 2.7	109.9 ± 35.9	105.3 ± 7.1	108 ± 25.2	121 ± 39.5	164.2 ± 39.3	90.2 ± 11.0	0.97 ± 0.20	5.51 ± 1.28
HDL ↑	74.8 ± 14.5	124.1 ± 43.1	164 ± 31.1	127 ± 28.7	90.4 ± 41.2	216.9 ± 48.9	86.4 ± 8.7	0.95 ± 0.19	4.78 ± 1.38

Tabla 3. Perfil lipídico y química sanguínea de los sujetos de estudio. Los valores de colesterol HDL, LDL, ApoA-I, ApoB, triglicéridos (TG), colesterol total (CT), Glucosa, Creatinina y ácido urico (A. UR.) están dados en mg/dl.

Después de secuenciar los 9 exones del gen y la secuencia promotora se identificaron 21 variantes en el gen de la *LH*, 15 variantes estuvieron presentes en ambos grupos y el resto fueron variantes exclusivas de alguno de ellos (grupo con HDLs altas o grupo con HDLs bajas).

19.1. VARIANTES ALÉLICAS PRESENTES EN AMBOS GRUPOS

De las 15 variantes presentes en ambos grupos cinco se localizan en la secuencia promotora del gen. Las variantes -250 G>A (rs2070895), -514 C>T (rs1800588), -710 T>C (rs1077834) y -763 A>G (rs1077835) están en perfecto desequilibrio de ligamiento en la muestra analizada; es decir, se heredan de manera conjunta formado solamente dos

haplotipos (combinación de alelos). De tal manera que los individuos que son homocigotos para el alelo -250 G también son homocigotos -514 C, -710 T, y -763 A.

Estas cuatro variantes ya han sido reportadas y entre paréntesis se muestra el número de identificación de cada una de ellas de acuerdo al registro general de SNPs del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Como en la muestra analizada, en todas las poblaciones estudiadas las variantes están en desequilibrio de ligamiento (Isaacs y cols., 2004). En algunas poblaciones el alelo -514 T es el menos frecuente y se asocia a una disminución del 30-40% de la actividad sérica de la LH y niveles elevados de colesterol HDL (Jansen y cols., 1997; Guerra y cols., 1997).

Sin embargo, en la muestra analizada el alelo -514 T no se encontró en mayor proporción en el grupo de HDLs altos (hiperalfalipoproteinemia). El análisis consistió en realizar una prueba de χ^2 (Tabla 4) para saber si uno de los haplotipos ($p= 0.27$) o alguno de sus tres genotipos ($p= 0.52$) se encontraban con mayor frecuencia en alguno de los dos grupos. No se observó significancia, por lo cual, podemos inferir que esta variante podría tener un efecto neutral en la modulación de las HDL en nuestra población. Es decir, el efecto que esta variante ejerce en la modulación de la expresión del gen no es suficiente para generar una modificación en el metabolismo de las HDL.

Un efecto neutral de esta variante ya ha sido observado en otras poblaciones analizadas (Vega y cols., 1998; Tahvanainen y cols., 1998; Grundy y cols., 1999a; Carr y cols., 2002; St-Pierre y cols., 2003), sin embargo, no se ha determinado con exactitud cuáles son los factores que enmascaran o disminuyen su efecto. Por lo tanto, para descartar si esta variante influye en los niveles de HDL en esta población, se requiere realizar un análisis con un número mayor de sujetos.

	-250 G>A			-514 C>T			-710 T>C			-763 A>G			-602 G>T		
Genotipo	GG	GA	AA	CC	CT	TT	TT	TC	CC	AA	AG	GG	GG	GT	TT
HDL ↓	7	16	7	7	16	7	7	16	7	7	16	7	29	1	0
HDL ↑	5	14	11	5	14	11	5	14	11	5	14	11	29	1	0
$p_{\text{Haplotype/Alelo}}$	0.27												1.0		
p_{Genotipo}	0.52												1.0		

Tabla 4. Variantes identificadas en ambos grupos en el promotor del gen de la LH.

La otra variante del promotor que se encontró en ambos grupos es -602 G>T (rs35588604), al igual que las variantes anteriores ya ha sido reportada. El alelo T tiene una frecuencia muy baja ya que solo se encontró en un sujeto de cada grupo (Tabla 4). Esto mismo ocurre en las poblaciones donde se ha identificado la variante, además de que ninguno de los alelos ha sido relacionado con HDLs bajas o altas; por lo que, se puede inferir que esta variante no tiene influencia sobre la expresión del gen (Hegele y cols., 1992; Hegele y cols., 1993).

Otras variantes que al igual que la anterior parecen tener un claro efecto neutral son las variantes intrónicas: IVS1+52 C>T (rs8192701), IVS1+64 A>G (rs11631342), IVS5-10 C>A (rs6080), IVS7-149 C>G (rs33931419), IVS7+31 T>C y la variante de secuencia codificante N215S A>G localizada en el exón 5 (rs6083) (Tablas 5 y 6). En cada uno de los grupos el número de individuos con cada uno de los genotipos fue exactamente el mismo, debido a esto los valores de p que resultaron de comparar las frecuencias alélicas así como las frecuencias genotípicas en todos los casos fue de 1.

	IVS1+52 C>T			IVS1+64 A>G			V95M G>A			V155V T>G			IVS5 -10C>A		
Genotipo	CC	CT	TT	AA	AG	GG	GG	GA	AA	TT	TG	GG	CC	CA	AA
HDL ↓	26	4	0	29	1	0	24	6	0	8	12	10	27	3	0
HDL ↑	26	4	0	29	1	0	25	5	0	11	12	7	27	3	0
pAlelo	1.0			1.0			0.75			0.27			1.0		
pGenotipo	1.0			1.0			0.73			0.40			1.0		

Tabla 5. Variantes identificadas en ambos grupos intrón 1, exón 3, exón 4 e intrón 5.

Ninguna de estas variantes se ha relacionado con modificación de la actividad de la LH o modulación de las HDL (Hegele y cols., 1992; Hegele y cols., 1993). Anteriormente se consideraba que la variante no sinónima N215S afectaba la actividad de la enzima LH ya que se identificó en una familia con deficiencia de LH. En un análisis más detallado se observó que los individuos con esta enfermedad además tenían la variante T405M. Debido a que los homocigotos N215S que no eran portadores de la variante T405M presentaban actividad sérica normal de la enzima, se dedujo que la variante que generaba la deficiencia genética de LH era T405M (Durstefeld y cols., 1994).

Dado que la variante del exón 5 (N215S) es una variante no sinónima, se realizó un análisis bioinformático para analizar cual era la predicción teórica del efecto de este cambio de aminoácido en la función de la enzima. El programa Polyphen realizó un alineamiento de 40 secuencias de proteínas que pertenecen a la familia de las triacilglicerol lipasas y calculó la diferencia de PSIC score (Position-Specific Independent Counts) entre el aminoácido asparagina y serina. Este valor, nos permite determinar el grado de incompatibilidad de la sustitución de acuerdo al espectro de aminoácidos que pueden ocupar esta posición, en proteínas homologas.

Query					Details				
Acc number	Position	AA ₁	AA ₂	Description	SEQUENCE FEATURES OF THE SUBSTITUTION SITE				
A2RUB4	215	N	S	Lipase, hepatic. LENGTH: 499 AA	Region	Site	Feature table	Critical sites	
					N/A	N/A	show FT fields for A2RUB4	N/A	
Prediction					Multiple alignment around substitution position				
This variant is predicted to be benign					Sequences:	all	Flanks:	25	Show alignment
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data	Score1	Score2	Observations		
benign	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 1.246	+0.746	-0.500	40		

Figura 7. Resultados del análisis bioinformático de la variante N215S.

0	QUERY:	...ITGLDAAGPLFEGSAPSNRLSPDDAN	FVDALHTFTREHMGLSVGIKQPIGH...
1	refINP_001075501.1	lipase, hepatic [Oryctolagus cuniculus] >gil...	...ITGLDAAGPLFEGTSA SDRLSPDDA T FVDALHTFTREHMGLSVGIKQPVGH...
2	refINP_001030487.1	lipase, hepatic [Bos taurus] >gil110810412(s...	...ITGLDAAGPLFEKASLSDRLSPDDA N FVDALHTFTWEHMGLSVGMKQPIAH...
3	gpiP27858(LIPC_MOUSE)	Hepatic triacylglycerol lipase precursor (H...	...ITGLDPAGPMFEGTSPNERLSFDDA N FVDALHTFTREHMGLSVGIKQPIAH...
4	refIXP_535495.2	PREDICTED: similar to Hepatic triacylglycerol l...	...ITGLDAAGPLFEGSSPNDRLSFDDA D FVDALHTFTREHMGLSVGIKQPIAH...
5	gpiP07867(LIPC_RAT)	Hepatic triacylglycerol lipase precursor (Hep...	...ITGLDPAGPMFEGTSPNERLSFDDA N FVDALHTFTREHMGLSVGIKQPIAH...
6	refIXP_001377885.1	PREDICTED: similar to hepatic lipase [Monode...	...ITGLDAAGPLFEGTSPTERLSFDDA D FVDALHTFTQEHMGLSVGIKQVAH...
7	refIXP_425087.2	PREDICTED: similar to hepatic lipase [Gallus ga...	...ITGLDPAGPLFEGMSPDRLSFDDA N FVDALHTFTKQHMGLSVGIKQVAH...
8	embI CAF89587.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...ITGLDPAGPLFEGMSPDRLSFDDA D FVDALHTFTQERMGLSVGIKQVAH...
9	refINP_957318.1	lipase, hepatic [Danio rerio] >gil31419274 gbiA...	...ITGLDPAGPMFEGMSHTDRLSFDDA K FVDALHTFTLQRMGLSVGIKQVAH...
10	gbi BAF31238.1	hepatic lipase [Pagrus major]	...ITGLDPAGPLFEGMSPDRLSFDDA E FVDALHTFTHERMGLSVGIKQVAH...
11	gbi BAB20997.1	lipoprotein lipase [Pagrus major]	...ITGLDPAGDFEGMHAHRRLSFDDA H FVDVLHTFTRGSGLSGLIGIQPVGH...
12	refIXP_001372854.1	PREDICTED: similar to endothelial lipase [Mo...	...ITGLDPAGPMFEGTDINKRLSPDDA H FVDVLHTYTRG-FGLSGLIGIQMPVGH...
13	gbi AAH80756.1	MGC69106 protein [Xenopus laevis]	...ITGLDPAGPMFEGAEAHKRLSPDDA D FVDVLHTYTRREALGVSGIQLMPIGH...
14	refIXP_588851.2	PREDICTED: similar to Lipase, endothelial [BosITGLDPAGPLFEGADVHRRLSFDDA D FVDVLHTYTRG-FGLSGLIGIQMPVGH...
15	refINP_008024.1	endothelial lipase precursor [Homo sapiens] >gi...	...ITGLDPAGPMFEGADVHRRLSFDDA D FVDVLHTYTRG-FGLSGLIGIQMPVGH...
16	refIXP_851592.1	PREDICTED: similar to Endothelial lipase precu...	...ITGLDPAGPMFEGVDIHRRLSPDDA D FVDVLHTYTRG-FGLSGLIGIQMPVGH...
17	refIXP_697356.2	PREDICTED: similar to lipoprotein lipase [Danio...	...ITGLDPAGDFEGVHAGRLSPDDA H FVDVLHTFTRGSGLSGLIGIQPVGH...
18	refIXP_424455.2	PREDICTED: similar to endothelial lipase [Gallu...	...ITGLDPAGPMFEGVDPSSRLSPDDA A FVDVLHTYTRRETGLVSGIQLMPVGH...
19	gbi AAP38976.1	Homo sapiens lipoprotein lipase [synthetic constr...	...ITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSFDDA D FVDVLHTFTRGSPPGRSGLIGIQPVGH...
20	refINP_034850.2	lipase, endothelial [Mus musculus] >gil22001807...	...ITGLDPAGPMFEGVDINRRLSPDDA D FVDVLHTYTRLS-FGLSGLIRMPVGH...
21	embI CAG07963.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...ITGLDPAGDFEGMHAHRRLSFDDA H FVDVLHTFTRGSPPGLSGLIGIQPVGH...
22	gbi AAT95418.1	lipoprotein lipase [Sus scrofa]	...ITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSFDDA D FVDVLHTFTRGSPPGRSGLIGIQPVGH...
23	refINP_001038032.1	lipoprotein lipase [Felis catus] >gil1708844...	...ITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSFDDA D FVDVLHTFTRGSPPGRSGLIGIQPVGH...
24	refINP_038730.1	lipoprotein lipase [Rattus norvegicus] >gil4625...	...ITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSFDDA D FVDVLHTFTRGSPPGRSGLIGIQPVGH...
25	gpi P11153(LIPL_CAVPO)	Lipoprotein lipase precursor (LPL) >gil3053...	...ITGLDPAGPNFEYAEATSRLSFDDA Q FVDVLHTFTRGSPPGRSGLIGIQPVGH...
26	refINP_001008394.1	lipoprotein lipase [Ovis aries] >gil24976831...	...ITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSFDDA D FVDVLHTFTRGSPPGRSGLIGIQPVGH...
27	refIXP_859720.1	PREDICTED: similar to Lipoprotein lipase precu...	...ITGLDPAGPNFEYAEAPSRLSFDDA D FVDVLHTFTRGSPPGRSGLIGIQPVGH...
28	refINP_001012769.1	lipase, endothelial [Rattus norvegicus] >gil...	...ITGLDPAGPMFEGVDINRRLSPDDA D FVDVLHTYTRLS-FGLSGLIRMPVGH...
29	gbi EAW62948.1	lipase, endothelial, isoform CRA_b [Homo sapiens]	...ITGLDPAGPMFEGADVHRRLSFDDA D FVDVLHTYTRG-FGLSGLIGIQMPVGH...

Figura 8. Alineamiento local de la secuencia contigua al residuo N215 de la LH humana, se puede observar que el aminoácido 215 es muy polimórfico en la familia de triacilglicerol lipasas.

Valores mayores a 1.5 indican que la sustitución es poco frecuente o nunca ocurre en la familia de proteínas. De acuerdo a este análisis el cambio de aminoácido es benigno (Figura 7), es decir, no tiene ningún efecto en la función de la proteína. En la figura 8 se muestran 29 de las 40 secuencias que se alinearon con la secuencia de la LH humana. De estas 40 secuencias solo 6 presentan el aminoácido asparagina en esta posición. El resto de las secuencias poseen los aminoácidos ácido aspártico, histidina, y glutamina, presentes en 22,

4 y 4 de las secuencias respectivamente, y solo en una de las secuencias estuvieron los aminoácidos treonina, lisina, ácido glutámico, alanina y leucina.

Aunque estrictamente no se han realizado los estudios funcionales de esta variante, es muy probable que esta sustitución no tenga ningún efecto en la función de la proteína debido a que no se modifica drásticamente la naturaleza del residuo puesto que los dos aminoácidos son polares. Dada la alta frecuencia del alelo S215 (50%) y que no se modifica la actividad de la LH en los portadores, algunos autores afirman que este cambio no sinónimo sólo genera una isoproteína que se presenta como una forma alternativa a la LH N215 (Hegele y cols., 1992; Hegele y cols., 1993).

	G197G A>G			N215S A>G			T224T C>G			IVS7-149C>G			IVS7+31T>C		
Genotipo	AA	AG	GG	AA	AG	GG	CC	CG	GG	CC	CG	GG	TT	TC	CC
HDL ↓	20	8	2	7	16	7	9	18	3	13	11	6	28	2	0
HDL ↑	22	7	1	7	16	7	12	12	6	13	11	6	28	2	0
pAlelo	0.47			1.0			1.0			1.0			1.0		
pGenotipo	0.57			1.0			0.42			1.0			1.0		

Tabla 6. Variantes identificadas en ambos grupos en el exón 5 e intrón 7.

Otra variante no sinónima presente en ambos grupos es la variante V95M G>A (rs6078) que se localiza en el exón 3 (Tabla 5). Este cambio se identificó inicialmente en una familia con deficiencia de LH, sin embargo, no se vio asociada con deficiencia de la enzima y/o modificación de las HDL. Recientemente esta variante se asoció con niveles elevados de colesterol total y ApoB en pacientes con hiperlipidemia familiar combinada (Hoffer y cols., 2000). Sin embargo, el mecanismo por el cual esta variante modifica las concentraciones de colesterol total y ApoB se desconoce.

En esta muestra analizada ninguno de los dos alelos ($p= 0.75$) o algún genotipo ($p= 0.73$) parece estar distribuido preferentemente en uno de los dos grupos (Tabla 5), por lo que se considera que esta variante tiene un efecto neutral en la modulación de las HDL, tal como se ha reportado (Hegele y cols., 1992; Hegele y cols., 1993).

Considerando que la LH es una enzima capaz de hidrolizar los triglicéridos y los fosfolípidos de las HDL y LDL y que esta variante sólo afecta las LDL así como la concentración sérica de su principal apolipoproteína; es muy probable que el aminoácido metionina esté modificando la interacción que se da entre la enzima y las LDL quedando intacta la actividad enzimática y por lo tanto el metabolismo de las HDL.

Esto también concuerda con el aumento de colesterol total en los portadores de esta variante, ya que en el humano las lipoproteínas que transportan una mayor cantidad de colesterol son las LDL, de tal manera, que una modificación en la concentración de estas lipoproteínas altera el contenido total de colesterol. El hallazgo de la modificación en el colesterol total así como LDL por esta variante sólo se ha evidenciado en pacientes con hiperlipidemia familiar combinada (Hoffer y cols., 2000). Por lo tanto, sería útil evaluar el papel de esta variante en la población abierta para definir si su efecto es independiente de la presencia de la enfermedad.

Tratando de inferir como es que esta variante produce sus efectos se realizó un análisis bioinformático con el programa Polyphen. De acuerdo a la predicción del programa, este cambio de aminoácido podría afectar la función de la proteína (Figura 9). Este resultado es un tanto contradictorio ya que la metionina que es el alelo con menor frecuencia en la LH humana, fue el más frecuente en las proteínas pertenecientes a la familia de las lipasas ya que estuvo presente en 25 de las 40 secuencias (Figura 10), mientras que la valina (alelo común en la LH) solo estuvo presente en la LH humana.

Considerando que todos las enzimas pertenecientes a la familia de las lipasas tienen la misma actividad (hidrolizar triglicéridos y fosfolípidos) y, que tanto el aminoácido metionina así como valina son aminoácidos hidrofóbicos que poseen al grupo metilo es muy probable que esta variante no afecte la actividad enzimática de la LH. Sin embargo, queda pendiente evaluar como es que esta variante afecta la concentración sérica de colesterol total, colesterol LDL y ApoB. Una de las teorías que permanece sin explorar es que la presencia de dos metilos en la valina al ser sustituidos por un solo metilo unido a un átomo de azufre en la metionina modifica la interacción entre la partícula LDL y la LH.

Esto a su vez podría alterar el metabolismo de la ApoB que es la principal apolipoproteína de las LDL, así como la concentración de colesterol total.

Query					Details			
Acc number	Position	AA ₁	AA ₂	Description	SEQUENCE FEATURES OF THE SUBSTITUTION SITE			
A2RUB4	95	V	M	Lipase, hepatic. LENGTH: 499 AA	Region	Site	Feature table	Critical sites
					N/A	N/A	show FT fields for A2RUB4	N/A
Prediction					Multiple alignment around substitution position			
This variant is predicted to be probably damaging					Sequences: all	Flanks: 25	Show alignment	
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data	Score1	Score2	Observations	
probably damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.182	-0.048	+2.134	40	

Figura 9. Resultados del análisis bioinformático de la variante V95M.

0	QUERY:	...DTLQECGFNSSLPLVMIHGWSDG...V	...ENWIWQMVAAALKSQPAQPVNVGLV...
1	ref NP_001073501.1	lipase, hepatic [Oryctolagus cuniculus] >gESWLWQMVAAALKSQPARPVNVGLV...
2	ref NP_001030487.1	lipase, hepatic [Bos taurus] >g 110610412 s...	...LEDVWVEMVAALKSQLAQSVNVGLA...
3	sp P27656 LIPC_MOUSE	Hepatic triacylglycerol lipase precursor (H...	...LENWIWIKIVSALKSRQSPQVNVGLV...
4	ref XP_535495.2	PREDICTED: similar to Hepatic triacylglycerol L...	...LESWIWQMVAAALKSGLAQPVNVGLA...
5	sp P07367 LIPC_RAT	Hepatic triacylglycerol lipase precursor (Hep...	...LETWIKVIVGALKSRQSPQVNVGLV...
6	ref XP_001377665.1	PREDICTED: similar to hepatic lipase [Monode...	...LEKWIWQMATALRSQKSNQVNVIVA...
7	ref XP_425067.2	PREDICTED: similar to hepatic lipase [Gallus ga...	...LESWIWKMAAALKSQHKQ-INVIIA...
8	emb CAF39587.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...LESWLKLAATALKSNLID-VNVVIT...
9	ref NP_857316.1	lipase, hepatic [Danio rerio] >g 21419274 gb A...	...MEKWISSLASALKSSSEGN-INVLIA...
10	cd IBAF31236.1	hepatic lipase [Pagrus major]	...MESVWHLRATTLKTHLID-VNVVIT...
11	cd IBAB20997.1	lipoprotein lipase [Pagrus major]	...DLSLAECTFNSSSKTFLVIHGWTLSG...
12	ref XP_001372654.1	PREDICTED: similar to endothelial lipase [Mo...	...FENWLFKLVSAIQMRE-QDANVVVV...
13	cd IAH60756.1	MGC69106 protein [Xenopus laevis]	...FETWLHRLVGLAQERE-QYANVIVV...
14	ref XP_586851.2	PREDICTED: similar to Lipase, endothelial [BosFENWLVKLVSAIQTRE-KGANVVVV...
15	ref NP_006024.1	endothelial lipase precursor [Homo sapiens] >gFENWLHKLVSALHTRE-KDANVVVV...
16	ref XP_851562.1	PREDICTED: similar to Endothelial lipase precu...	...LESWLKLVSAIQTRKE-ANVVVV...
17	ref XP_697356.2	PREDICTED: similar to lipoprotein lipase [Danio...	...FESWVEKLVAAALYNRE-KDANVIVV...
18	ref XP_424455.2	PREDICTED: similar to endothelial lipase [Gallu...	...FETWLGSLVSALQERE-KDANVVVV...
19	cd IAAP36976.1	Homo sapiens lipoprotein lipase [synthetic constr...	...YESWVPKLVAAALKREPDS--NVIVV...
20	ref NP_034890.2	lipase, endothelial [Mus musculus] >g 22001807...	...FESWLHKLVSALQMRP-KDANVVVV...
21	emb CAG07963.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...FESWVSKLVLAALYERE-RAANVVVV...
22	cd AAT95418.1	lipoprotein lipase [Sus scrofa]	...YESWVPKLVAAALKREPDS--NVIVV...
23	ref NP_001036032.1	lipoprotein lipase [Felis catus] >g 1708844...	...YESWVPKLVAAALKREPDS--NVIVV...
24	ref NP_036730.1	lipoprotein lipase [Rattus norvegicus] >g 4625...	...YESWVPKLVAAALKREPDS--NVIVV...
25	sp P11153 LPL_CAVPO	Lipoprotein lipase precursor (LPL) >g 3053...	...YESWVPKLVAAALKREPDS--NVIVV...
26	ref NP_001009394.1	lipoprotein lipase [Ovis aries] >g 2497683YESWVPKLVAAALKREPDS--NVIVV...
27	ref XP_859720.1	PREDICTED: similar to Lipoprotein lipase precu...	...YESWVPKLVAAALKREPDS--NVIVV...
28	ref NP_001012759.1	lipase, endothelial [Rattus norvegicus] >gFESWLHKLVSALQTRKE-ANVVVV...
29	cd EAW52948.1	lipase, endothelial, isoform CRA_b [Homo sapiens]	...FENWLHKLVSALHTRE-KDANVVVV...

Figura 10. Alineamiento local de la secuencia contigua al residuo V95 de la LH humana. Se observa que esta posición la metionina es muy frecuente en la familia de las lipasas, mientras que el aminoácido valina solo está presente en la LH humana.

También se identificaron 3 variantes sinónimas que estuvieron presentes en ambos grupos: V155V T>G (rs690), G197G A>G (rs6082) y T224T C>G (rs6084). La variante V155V se localiza en el exón 4 (Tabla 5), mientras que G197G y T224T se localizaron en el exón 5

(Tabla 6); las 3 variantes ya han sido reportadas en otras poblaciones y en ningún estudio se ha establecido que estas variantes estén en desequilibrio de ligamiento con alguna variante funcional (Hegele y cols., 1992; Hegele y cols., 1993). Por lo tanto, podemos inferir que estas tres variantes no tienen efecto en la modulación de las HDL.

En resumen, en la muestra analizada se identificaron 15 variantes alélicas que estuvieron presentes tanto en el grupo de HDLs altas como en el grupo de HDLs bajas; sin embargo, ninguno de los alelos o sus genotipos estuvo distribuido de manera preferente en alguno de ellos, por lo cual, se considera que probablemente estas 15 variantes no tienen efecto en la modulación de las HDL.

19.2. VARIANTES EXCLUSIVAS DE ALGUNO DE LOS GRUPOS

Se identificaron 6 variantes en el gen de la *LH* que fueron exclusivas de alguno de los grupos (es decir, estuvieron presentes en el grupo de HDLs altas pero no en el de HDLs bajas o viceversa). Los criterios de exclusión de los sujetos de estudio nos permitieron seleccionar individuos donde los determinantes genéticos fueran más evidentes ya que no se incluyeron sujetos con alguna condición fisiológica o fisiopatológica que *per se* altera el metabolismo de las HDL. De tal manera, que las variantes que preferentemente se encuentran en alguno de los grupos probablemente son las responsables de los niveles de colesterol HDL extremos en estos individuos.

Las 6 variantes identificadas se encontraron de forma heterocigota, cinco de ellas estuvieron presentes en el grupo de HDL altas y solo una se identificó en el grupo de HDL bajas. Tres de las variantes se localizaron en el promotor del gen mientras que el resto se localizaron en la secuencia codificante. Solo una de las variantes de la secuencia codificante ha sido reportada en la literatura (Durstensfeld y cols; 1994), mientras que el resto son variantes que no han sido identificadas previamente.

19.2.1. VARIANTES DEL PROMOTOR

De las tres variantes localizadas en el promotor, la variante -451 A>G se identificó en una paciente con HDL bajas (Tabla 7). En la portadora del alelo -451 A, el porcentaje de las HDL_{2a} era menor a la media de 19 pacientes del grupo con HDLs bajas que no tenían la

variante (12.2% vs 1.2%). Se realizó una prueba t de Student de dos colas para muestras independientes para ver si esta diferencia era estadísticamente significativa, siendo el resultado de $p = 0.017$ (Tabla 8).

Las HDL son una población heterogénea de lipoproteínas que difieren en densidad y tamaño, se sabe que la enzima LH disminuye el porcentaje de las HDL₂ ya que hidroliza los lípidos del “core” y de la superficie de estas partículas (Scriver y cols., 2001; Rao y cols., 1982; Kinnunen, 1984). Por lo tanto, esta variante pareciera estar confiriendo un aumento en los niveles séricos de la enzima. A diferencia de las variantes reportadas en promotor que han sido relacionadas con una disminución en la actividad transcripcional y un aumento del colesterol HDL₂, esta variante parece estar relacionada con un aumento en la actividad del promotor; por lo tanto, mayor cantidad de enzima que genera la hidrólisis acelerada de partículas HDL₂.

De confirmarse que esto es cierto al medir la actividad y la masa de la enzima LH en el suero de la paciente, además de realizar los estudios funcionales *in vitro* sería la primera variante del promotor que se relaciona con un aumento en la actividad del promotor.

Variante	Grupo	Frecuencia	Electroferograma
-451 A>G	HDL↓	1/30	
-480 C>T	HDL↑	1/30	
-592 G>A	HDL↑	2/30	

Tabla 7. Variantes exclusivas de grupo localizadas en el promotor del gen de la LH. En la tabla se indica la variante del promotor, el grupo donde fue identificada, la frecuencia de individuos que la presentaron y en el electroferograma aparecen indicados con una flecha los dos alelos de los heterocigotos.

Sufracción HDL (%)	-451 AA (n=19)	-451 AG (n=1)	p
2b	15.6 ± 11.4	16.5	NS
2a	12.2 ± 4	1.2	0.017
3a	34.8 ± 8.2	19.4	0.086
3b	21 ± 6.2	30.8	NS
3c	16.3 ± 7.2	31.9	0.051

Tabla 8. Comparación de los porcentajes de subfracciones de HDL. Se muestran cada una de las subfracciones de las HDL, la media y desviación estandar de los porcentaje de las subfracciones en 19 sujetos homocigotos -451 AA, así como los porcentaje de la paciente con el genotipo -451AG, y el valor de p (significancia de la prueba t Student): porcentaje de las subfracciones del grupo contra el porcentaje de la paciente.

La figura 11 representa el promotor del gen de la *LH*; en color rojo están esquematizadas las secuencias de unión a factores de transcripción que reprimen la transcripción del gen mientras que en azul están representados los sitios de unión a factores de transcripción que la promueven (Rufibach y col., 2006).

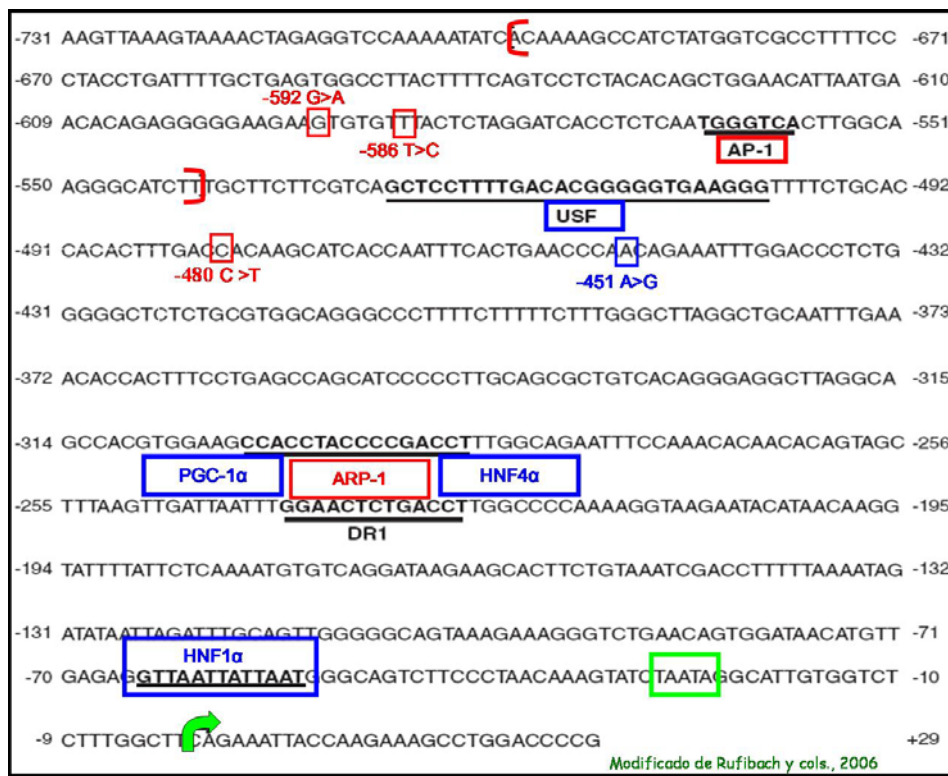


Figura 11. Promotor del gen de la *LH* humana. En él se observan los sitios de unión para los distintos factores de transcripción, así como la localización de las tres variantes identificadas en este estudio. Los sitios de unión de factores que promueven la transcripción del gen están representados en azul y los sitios de unión de factores que reprimen la transcripción están esquematizados en rojo. Modificado de Rufibach y cols., 2006.

En esta misma figura está enmarcada en color azul la variante -451 A>G (por tratarse de una variante que parece aumentar la transcripción del gen), en la secuencia donde se localiza no se han identificado motivos en el DNA para la unión de factores de transcripción y tampoco se ha determinado que sea una secuencia donde ocurren interacciones DNA-proteína (Oka y cols., 1996). Sin embargo, debido al hallazgo de que la portadora de esta variante tiene disminuidas las HDL_{2a} no se descarta que esta variante tenga un papel importante en la regulación de la expresión del gen de la *LH*, aunque el mecanismo se desconoce.

En el grupo con HDLs altas se identificaron las variantes -480 C>T y -592 G>A (Tabla 7 y figura 11) con una frecuencia respectiva de 1/30 y 2/30. Considerando que los niveles de expresión del gen de la *LH* se relacionan inversamente con los niveles de las HDLs, estas variantes podrían tener un efecto regulatorio negativo sobre la transcripción del gen.

La variante - 592 G>A (enmarcada en color rojo en la figura 11 por tratarse de una variante que parece reprimir la expresión del gen de la *LH*) se localiza dentro de la secuencia comprendida entre los nucleótidos -698 a -541. En estudios funcionales se determinó que en esta secuencia se localiza un elemento de respuesta para el FXR; el cual es un factor de transcripción que regula negativamente la expresión del gen (Sirvent y col., 2004), además de que en ensayos de interacción DNA-proteína se determinó que la secuencia -595/-577 presenta una ventana de protección a la digestión con DNasa 1 (Oka y cols., 1996).

A solo 6 nucleótidos de la anterior se localiza la variante -586 T>C identificada en población china (Figura 11); en estudios funcionales se observó que el alelo C disminuye al 56% la transcripción del gen (Su y cols., 2002). Los resultados anteriores nos permiten considerar que la variante - 592 G>A, pudiera estar modificando de manera importante la transcripción del gen de la *LH*.

Aunque de las variantes -480 C>T y -592 G>A no existe ningún reporte en la literatura, no se descarta que tengan un papel importante en la regulación de la expresión del gen de la

LH que impacte en el metabolismo de las HDL, sin embargo, resta realizar los estudios funcionales.

Los estudios funcionales para conocer el efecto de estas variantes incluirán clonar la secuencia del promotor del gen de la *LH* en un vector que exprese un gen reportero, de tal manera que la expresión del reportero este bajo el control del promotor del gen de la *LH*. Se generarán por mutagénesis dirigida las variantes del promotor y los plámidos resultantes se transfectarán por separado en células hepáticas humanas (HepG2). Se medirá la actividad del promotor con el método apropiado dependiendo del gen reportero utilizado. Después de ajustar la actividad del promotor de acuerdo a la eficiencia de transfección se analizará si existen diferencias entre la actividad de cada uno de los promotores mutados con respecto al promotor silvestre.

19.2.2. VARIANTES DE LA SECUENCIA CODIFICANTE

En la secuencia codificante se identificaron las variantes Q355R (frecuencia 3/30), S289F (frecuencia 1/30) y R135C (frecuencia 1/30) (Tabla 9). Dado que los de 5 portadores de estas variantes son del grupo de HDLs altas se estima que estas variantes pudieran generar pérdida de función de la enzima *LH*.

Como se puede observar en la tabla 9 la variante S289F es la única que ya ha sido reportada. Los portadores de esta variante presentan una disminución de la actividad sérica de la enzima. Además, estudios funcionales *in vitro* mostraron que la proteína mutada no presentaba actividad catalítica (Durstensfeld y cols; 1994).

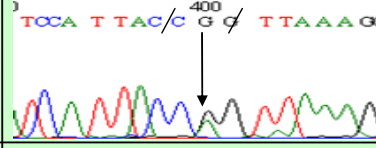
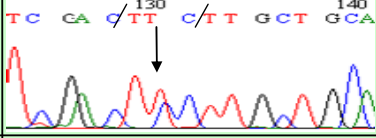
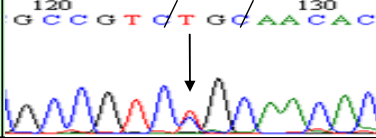
Variante	Grupo	Frecuencia	Referencia	Electroferograma	Polyphen Score
Q355R A>G Exón 7	HDL ↑	3/30			2.30
S289F C>T Exón 6	HDL ↑	1/30	Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1994;14:381-385		2.54
R135C C>T Exón 3	HDL ↑	1/30			1.77

Tabla 9. Variantes exclusivas de grupo localizadas en la secuencia codificante del gen de la *LH*. Variante indica el cambio aminoácido en la secuencia de la proteína, el cambio de nucleótido y el exón donde se localiza la variante; Grupo indica la subpoblación donde se identificaron las variantes, en este caso el grupo de HDLs altas; Referencia, indica la fuente bibliográfica de donde se extrajo la información de la variante. En el electroferograma se señala con una flecha los dos alelos presentes en los heterocigotos. En polyphen “score” esta indicada la diferencia PSIC score (Position-Specific Independent Counts) entre los dos aminoácidos de la variante de interés. Si esta es mayor de 1.5 indica que la sustitución entre los dos aminoácidos no ocurre en la familia de proteínas que se analiza, y que por lo tanto la función de la proteína se podría afectar.

El análisis bioinformático con el programa Polyphen predice que las tres variantes son posiblemente “dañinas”, es decir la sustitución de estos aminoácidos podría afectar la actividad de la enzima (Figuras 12, 14 y 16). En el alineamiento de 40 secuencias se observó que los residuos Q355 y S289 se encuentran conservados en el 100% de las proteínas que pertenecen a las triacilglicerol lipasas (Figuras 13 y 15). El residuo S289 se codifica en el exón 6 y forma parte de un microdominio de 10 residuos hidrofóbicos que interactúa con lípidos (Stahnke y cols., 1987; Jaye y cols., 1999).

En los estudios *in vitro* en los cuales se expresó la LH F289, se observó que esta enzima no tenía actividad; además de que sólo se secretaba el 12% de la proteína comparada con la LH silvestre (Durstefeld y cols; 1994). Esta variante genera un cambio drástico en la naturaleza del aminoácido; de polar a hidrofóbico; ya que el grupo R la serina es un alcohol mientras que la fenilalanina tiene un anillo aromático, por lo cual podemos especular que el impedimento estérico así como la modificación en la polaridad generados por este cambio de aminoácido es la causa de que se disminuya la actividad de la enzima así como su secreción.

Query					Details			
Acc number	Position	AA ₁	AA ₂	Description	SEQUENCE FEATURES OF THE SUBSTITUTION SITE			
A2RUB4	289	S	F	Lipase, hepatic. LENGTH: 499 AA	Region	Site	Feature table	Critical sites
					N/A	N/A	show FT fields for A2RUB4	N/A
Prediction					Multiple alignment around substitution position			
This variant is predicted to be probably damaging					Sequences: all	Flanks: 25	Show alignment	
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data	Score1	Score2	Observations	
probably damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.546	+1.790	-0.756	40	

Figura 12. Resultados del análisis bioinformático de la variante S289F.

0	QUERY:	...AQHCFNAITQTIKCSHERSVHLFID	S	LLHACTQSMAYPCGDMNSFSQGLCL...
1	ref NP_001075501.1	lipase, hepatic [Oryctolagus cuniculus] >g	LLHPSMQSTAYQCSMDMSFSQGLCL...
2	ref NP_001030487.1	lipase, hepatic [Bos taurus] >g 110810412[s...	...	LLHADMQSMAYLCRDMDFRSQGLCL...
3	gpi P27856 LIPC_MOUSE	Hepatic triacylglycerol lipase precursor (H...	...	LQHSDLQSIGFQCSMDMSFSQGLCL...
4	ref XP_535485.2	PREDICTED: similar to Hepatic triacylglycerol L...	...	LLHPSLQSTAYQCGDMDSFSQGLCL...
5	gpi P07367 LIPC_RAT	Hepatic triacylglycerol lipase precursor (Hep...	...	LQHSNLQNTGFCNSMDSFSQGLCL...
6	ref XP_001377685.1	PREDICTED: similar to hepatic lipase [Monode...	...	LLNEHMQSIGYWCSDMNTFNKGLCL...
7	ref XP_425067.2	PREDICTED: similar to hepatic lipase [Gallus ga...	...	LLHEDKQSTAYWCNDINTFDKGLCL...
8	emb CAF99587.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...	LLNKDKQSRAYRCRDESFDRGVCL...
9	ref NP_957316.1	lipase, hepatic [Danio rerio] >g 31415274 g A...	...	LLNKDKQIMAYKCSDNATFDKGNCL...
10	gpi BAF31236.1	hepatic lipase [Pagrus major]	...	LLNEDKQSMAYRCSDNSAFVKGVCL...
11	gpi BA820997.1	lipoprotein lipase [Pagrus major]	...	LLNEEAQAKAYRCSSDMFNRMGCL...
12	ref XP_001372654.1	PREDICTED: similar to endothelial lipase [Mo...	...	LVNQDKQSFQFQCTDSNRFKKGICL...
13	gpi AAH60756.1	MGC69106 protein [Xenopus laevis]	...	LLHKDKESFAFQCTDSDRFKKGICL...
14	ref XP_586851.2	PREDICTED: similar to Lipase, endothelial [Bos	LVNQDKPQSFQFQCTDSNRFKKGICL...
15	ref NP_00106024.1	endothelial lipase precursor [Homo sapiens] >g	LVNQDKPQSFQFQCTDSNRFKKGICL...
16	ref XP_851862.1	PREDICTED: similar to Endothelial lipase precu...	...	LVNQDKPQSFQFQCTDSNRFKKGICL...
17	ref XP_697356.2	PREDICTED: similar to lipoprotein lipase [Danio...	...	LLNEEAAGRAYSCSNDMDFDRGVCL...
18	ref XP_424455.2	PREDICTED: similar to endothelial lipase [Gallu...	...	LVNQDKQSFQFQCTDSNRFKKGICL...
19	gpi AAP36976.1	Homo sapiens lipoprotein lipase [synthetic constr...	...	LLNEENPSKAYRCSSKEAFKGLCL...
20	ref NP_034850.2	lipase, endothelial [Mus musculus] >g 22001807...	...	LVNQDKPQSFQFQCTDSNRFKKGICL...
21	emb CAG07363.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	...	LLNEEAQAKAYRCSSDTFNRMGCL...
22	gpi AAT95418.1	lipoprotein lipase [Sus scrofa]	...	LLNEENPSKAYRCNSKEAFKGLCL...
23	ref NP_001036032.1	lipoprotein lipase [Felis catus] >g 1708844...	...	LLNEENPSKAYRCNSKEAFKGLCL...
24	ref NP_036730.1	lipoprotein lipase [Rattus norvegicus] >g 4625...	...	LLNEENPSKAYRCNSKEAFKGLCL...
25	gpi P11153 LPL_CAVPO	Lipoprotein lipase precursor (LPL) >g 3053...	...	LLNEENPSKAYRCNSKEAFKGLCL...
26	ref NP_001008394.1	lipoprotein lipase [Ovis aries] >g 2497683...	...	LLNEENPSKAYRCNSKEAFKGLCL...
27	ref XP_869720.1	PREDICTED: similar to Lipoprotein lipase precu...	...	LLNEENPSKAYRCNSKEAFKGLCL...
28	ref NP_001012759.1	lipase, endothelial [Rattus norvegicus] >g	LVNQDKPQSFQFQCTDPSNRFKKGICL...
29	gpi EAW62948.1	lipase, endothelial, isoform CRA_b [Homo sapiens]	...	LVNQDKPQSFQFQCTDPSNRFKKGICL...

Figura 13. Alineamiento local de la secuencia contigua al residuo S289 de la LH humana. Se observa que el aminoácido serina esta 100% conservado en la familia de triacilglicerol lipasas.

Por su parte, el aminoácido Q355 se codifica en el exón 7 y se localiza en el dominio PLAT. Se ha propuesto que la función de este dominio es favorecer la interacción con otras proteínas además de que puede estar mediando la interacción de la cadena polipeptídica con lípidos (Bateman y Sandford, 1999; Delrieu y cols., 2002). La variante Q355R no ha sido reportada por lo cual se ignora el efecto que este cambio pueda tener en la función de la proteína, además de que no se cuenta con datos suficientes para predecir si se modifica la estructura tridimensional, ya que esta enzima no ha sido cristalizada.

Query					Details			
Acc number	Position	AA ₁	AA ₂	Description	SEQUENCE FEATURES OF THE SUBSTITUTION SITE			
A2RUB4	355	Q	R	Lipase, hepatic. LENGTH: 499 AA	Region	Site	Feature table	Critical sites
					N/A	N/A	show FT fields for A2RUB4	N/A
Prediction					Multiple alignment around substitution position			
This variant is predicted to be probably damaging					Sequences: all	Flanks: 25	Show alignment	
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data	Score1	Score2	Observations	
probably damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 2.306	+2.225	-0.081	39	

Figura 14. Resultados del análisis bioinformático de la variante Q355R.

0	QUERY:	... QEPRSKSKRFLVLTTRAQSPFKVYHY	Q LKIQFINQIETPTIQTPTMSLLGTK...
1	hepatic lipase [Dryctolagus cuniculus] >emb Q46559 QEPLSKGKRLFLVLTTRAQSPFKVYHY	Q FKIQFINQIEKPLEPTPTMSLLGTK...
2	hepatic lipase [Mus spretus] >emb Q80265 Q80265 Hep...	... KDRSGKSKRFLFLITRAQSPFKVYHY	Q FKIQFINQIEKPEVPTPTMSLLGTK...
3	lipase, hepatic [Mus musculus] >gi 29423747 gb AY22...	... KDRSGKSKRFLFLITRAQSPFKVYHY	Q FKIQFINQIEKPEVPTPTMSLLGTK...
4	lipoprotein lipase [Mus musculus] >sp P27656 LIPH_MOU...	... KDRSGKSKRFLFLITRAQSPFKVYHY	Q FKIQFINQIEKPEVPTPTMSLLGTK...
5	hepatic lipase precursor [Rattus norvegicus]	... RIGHAKSKTLFLITRAQSPFKVYHY	Q FKIQFINQIEKPEVPTPTMSLLGTK...
6	unnamed protein product [Rattus norvegicus] >sp P0786...	... RIGHVSKTLFLITRAQSPFKVYHY	Q FKIQFINQIEKPEVPTPTMSLLGTK...
7	Unknown (protein for MGC:64081) [Danio rerio] >emb KVRTGKSKRFLFLITRASHMPYKLFHY	Q FKIQFINQID-KIDPTLTVSLSGTL...
8	lipoprotein lipase [Pagrus major] >emb Q98UI2 Q98UI...	... KVRKARNVQMYTKTRASHMPFKVYHY	Q LKIHFNVRSE--MEPSLTVSLYGTN...
9	lipoprotein lipase [Pagrus major] >emb Q98UI3 Q98UI...	... KVRKARNVQMYTKTRASHMPFKVYHY	Q LKIHFNVRSE--MEPSLTVSLYGTN...
10	Endothelial lipase precursor [Homo sapiens] >emb AA...	... KMRNKPNSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q MKIHFSYKMGIEPTFYVTLYGTN...
11	Unknown (protein for MGC:69106) [Xenopus laevis] >e...	... MRRSKPNSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q MHHIFNKSASEPTFSVTLHGTL...
12	endothelial lipase [Homo sapiens] >sp Q9Y5X9 LIPE_H...	... KMRNKPNSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q MKIHFSYKMGIEPTFYVTLYGTN...
13	lipoprotein lipase [Papio anubis] >pir JC4242 JC4242 KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTESETHNQAFEISLYGTV...
14	lipoprotein lipase precursor [Homo sapiens] >gi 34383...	... KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTESETHNQAFEISLYGTV...
15	Homo sapiens lipoprotein lipase [synthetic construct]	... KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTESETHNQAFEISLYGTV...
16	endothelial lipase [Mus musculus]	... KMRNKPNSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q LKIHFSYKMGIEPTFYVTLYGTN...
17	Lipoprotein lipase precursor [Homo sapiens] >gi 305...	... KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTESETHNQAFEISLYGTV...
18	lipoprotein lipase precursor [Macaca fascicularis] KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTESETHNQAFEISLYGTV...
19	lipase, endothelial [Mus musculus] >sp Q9WY65 LIPE...	... KMRNKPNSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q LKIHFSYKMGIEPTFYVTLYGTN...
20	lipoprotein lipase [Mustela vison] >sp Q46647 LIPL...	... KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTESDTQTNQAFEISLYGTV...
21	lipoprotein lipase preprotein [Gallus gallus] >sp P11...	... KVRTKRNPKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFGKNTKVDQPFILISLYGTL...
22	lipoprotein lipase [Felis catus] >sp P55031 LIPL_FELC...	... KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTESDTQTNQAFEISLYGTV...
23	lipoprotein lipase; triacyl-glycerol-protein acylhydro...	... KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTESDTQTNQAFEISLYGTV...
24	prelipoprotein lipase [Rattus norvegicus] >sp Q06000 KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTESDTQTNQAFEISLYGTV...
25	triacylglycerol lipase [Gallus gallus]	... KVRTKRNPKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFGKNTKVDQPFILISLYGTL...
26	lipoprotein lipase precursor [Cavia porcellus] >gi 553...	... KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTETTYTNQAFEISLYGTV...
27	lipoprotein lipase [Ovis aries] >sp Q29524 LIPL_SHEEP...	... KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTESNTYTNQAFEISLYGTV...
28	unnamed protein product [Mus musculus] >emb Q8C562 KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTEDGKQQAPEISLYGTV...
29	lipoprotein lipase [Mus musculus]	... KVRAKRSSKMYLKTTRAGMPFKVYHY	Q VKIHFSSTENGKQQAPEISLYGTV...

Figura 15. Alineamiento local de la secuencia contigua al residuo Q355 de la LH humana. Se observa que el aminoácido glutamina esta 100% conservado en la familia de triacilglicerol lipasas.

Sin embargo, debido a que el cambio sustituye un aminoácido polar (glutamina) por uno con carga positiva (arginina), además del hecho de que este aminoácido este 100% conservado en todas las proteínas que pertenecen a la familia de las lipasas es indicativo de que este cambio podría tener una repercusión en la función de la enzima, hasta el punto de afectar el metabolismo de las HDL.

Query					Details			
Acc number	Position	AA ₁	AA ₂	Description	SEQUENCE FEATURES OF THE SUBSTITUTION SITE			
A2RUB4	135	R	C	Lipase, hepatic. LENGTH: 499 AA	Region	Site	Feature table	Critical sites
					N/A	N/A	show FT fields for A2RUB4	N/A
Prediction					Multiple alignment around substitution position			
This variant is predicted to be possibly damaging					Sequences: all	Flanks: 25	Show alignment	
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data	Score1	Score2	Observations	
possibly damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 1.775	+0.753	-1.022	40	

Figura 16. Resultados del análisis bioinformático de la variante R135C.

0	QUERY:	... QPAQPVNVGLVDWITLAHDHYTIAV	R	NTRLVGKEVAALLRWLEESVQLSRS...
1	ref NP_001073501.1	lipase, hepatic [Oryctolagus cuniculus] >gl QPARPQVNVGLVDWISLAHSHYAVAVR
2	ref NP_001030487.1	lipase, hepatic [Bos taurus] >gl 110810412 s... QLAQSNVGLAEWVTLAHNHYTTAVR
3	seq P27856 LIPC_MOUSE	Hepatic triacylglycerol lipase precursor (H... RQSQPVNVGLVDWISLAYQHYTIAV
4	ref XP_535495.2	PREDICTED: similar to Hepatic triacylglycerol L... GLAQPVNVVLADWLTLAYHHYTVAVR
5	seq P27867 LIPC_RAT	Hepatic triacylglycerol lipase precursor (Hep... RQSQPVNVGLVDWISLAYQHYAIAVR
6	ref XP_001377665.1	PREDICTED: similar to hepatic lipase [Monode... QKSNQNVVIVADWMTLAHQHYAVAVR
7	ref XP_429067.2	PREDICTED: similar to hepatic lipase [Gallus ga... QHKQ-INVIADWLTFAHQHYPIAV
8	emb CAF399587.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis] NLID-VNVVITDWSLAQTHYPTAAK
9	ref NP_957316.1	lipase, hepatic [Danio rerio] >gl 51419274 gb A... SEGN-INVLADWLTLAHQHYPIAAQ
10	gb BAF31236.1	hepatic lipase [Pagrus major] HLID-VNVVITDWSLAHQHYPTAAK
11	gb BA820997.1	lipoprotein lipase [Pagrus major] RE-QTANVIVVDWLTSAQNHVYVVAQ
12	ref XP_001372654.1	PREDICTED: similar to endothelial lipase [Mo... RE-QDANVVVDWLPPLAQHYTDAVN
13	gb AAH60756.1	MGC69106 protein [Xenopus laevis] RE-QYANVIVVDWMLAQHYLPDAVN
14	ref XP_586851.2	PREDICTED: similar to Lipase, endothelial [Bos RE-KGANVVVDWLPPLAQHYTDAVN
15	ref NP_006024.1	endothelial lipase precursor [Homo sapiens] >g RE-KDANVVVDWLPPLAQHYTDAVN
16	ref XP_551562.1	PREDICTED: similar to Endothelial lipase precu... RE-ANVVVDWLPPLAQHYTDAVN
17	ref XP_697356.2	PREDICTED: similar to lipoprotein lipase [Danio... RE-KDANVIVVDWLDIAQDHYVVAQ
18	ref XP_424455.2	PREDICTED: similar to endothelial lipase [Gallu... RE-KDANVVVDWLSLAHQHYTDAVN
19	gb AAP36976.1	Homo sapiens lipoprotein lipase [synthetic constr... EPDS--NVIVVDWLSRAQHYPVSA
20	ref NP_034850.2	lipase, endothelial [Mus musculus] >g 22001807... RE-KDANVVVDWLPPLAQHYTDAVN
21	emb CAG07963.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis] RE-RAANVVVDWLTSAQNHVYVVAQ
22	gb AAT95413.1	lipoprotein lipase [Sus scrofa] RE--NVIVVDWLSRAQHYPVSA
23	ref NP_001036032.1	lipoprotein lipase [Felis catus] >g 1708844... EPDS--NVIVVDWLSRAQHYPVSA
24	ref NP_036730.1	lipoprotein lipase [Rattus norvegicus] >g 4625... EPDS--NVIVVDWLYRAQHYPVSA
25	seq P11153 LPL_CAVPO	Lipoprotein lipase precursor (LPL) >g 30653... EPDS--NVIVVDWLRRAQHYPVSA
26	ref NP_001009394.1	lipoprotein lipase [Ovis aries] >g 2457633 EPDS--NVIVVDWLSRAQHYPVSA
27	ref XP_859720.1	PREDICTED: similar to Lipoprotein lipase precu... EPDS--NVIVVDWLSRAQHYPVSA
28	ref NP_001012759.1	lipase, endothelial [Rattus norvegicus] >g REKE-ANVVVDWLPPLAQHYTDAVS
29	gb EAW62948.1	lipase, endothelial, isoform CRA_b [Homo sapiens] RE-KDANVVVDWLPPLAQHYTDAVN

Figura 17. Alineamiento local de la secuencia contigua al residuo R135 de la LH humana. Se observa que el aminoácido en esta posición es polimórfico en la familia de las triacilglicerol lipasas.

Por otro lado, aunque el residuo R135 no esta 100% conservado en las lipasas analizadas (Figura 17), se pudo observar que ninguna de ellas presentaba el residuo cisteína en esta posición. El aminoácido R135 es codificado en el exón 3 de la LH y se localiza en el dominio de lipasa. Este dominio está altamente conservado, ya que está presente en todas las triacilglicerol lipasas (Chapus y cols., 1988; Persson y cols., 1989; Blow, 1990).

Debido a que esta variante no ha sido reportada y que no se cuenta con los valores de actividad sérica de la LH en el portador, no se puede predecir con exactitud si este cambio de aminoácido afecta la función de la enzima. Sin embargo, en este caso también se modifica la naturaleza del aminoácido; de cargado positivamente a polar, además de que la cisteína pudiera estar formando un puente disulfuro.

En conclusión, es probable que tanto la variante Q355R como R135C tengan un efecto semejante al de la variante S289F; ya que la sustitución de estos aminoácidos no se observa en la familia de las triacilglicerol lipasas además de que se modifica la naturaleza de los aminoácidos (de polar a cargado positivamente y de cargado positivamente a polar, respectivamente).

Por lo tanto, se deben realizar los estudios funcionales *in vitro* de estas 2 variantes, además de medir la actividad enzimática de la LH en suero de los portadores. También es necesario estudiar una muestra de la población abierta para conocer cual es la frecuencia de estas variantes en la población general, además de analizar cual es su efecto en la modulación de las HDL.

20. CONCLUSIONES

- La estrategia utilizada nos permitió identificar variantes de secuencia del gen de la *LH* en individuos con niveles bajos o altos de HDL. Los criterios de exclusión e inclusión permitieron seleccionar individuos donde el efecto de los determinantes genéticos fuera más evidente.
- Se identificaron 15 variantes que estuvieron presentes en ambos grupos, pero ninguna parece tener un efecto importante en la modulación de las HDL.
- Se identificaron 6 variantes exclusivas de alguno de los grupos, las cuales por lo tanto tienen un papel potencialmente importante en la modulación de los niveles de colesterol HDL.
- Cinco de las variantes con posible efecto funcional se identificaron en el grupo con HDL altas, mientras que solo una de ellas se identificó en una paciente con HDLs bajas.
- Tres de las variantes se localizaron en el promotor (-451 A>G, -480 C>T y -592 G>A) y el resto en la secuencia codificante (R135C, S289F y Q355R).
- Las variantes del promotor: -451 A>G y -480 C>T se localizan en secuencias de DNA donde no se han identificado motivos que sean reconocidos por factores de transcripción.
- Sin embargo, un punto que apoya la posibilidad de que estas dos variantes sean funcionales es el hallazgo de que la portadora de la variante -451 A>G presenta una disminución sustancial de la subfracción HDL_{2a}.
- La variante de promotor -592 G>A se localiza dentro de una secuencia de DNA donde es probable que se localice un elemento de respuesta para el factor FXR.
- En estudios realizados por otro grupo de investigación se determinó que la variante S289F disminuye dramáticamente la actividad enzimática de la enzima LH, lo cual genera un aumento en los niveles de colesterol HDL.

- Las variantes alélicas R135C y Q355R podrían afectar la función de la enzima, ya que se modifica la naturaleza de los aminoácidos, además de que ninguna de las proteínas de la familia de las lipasas contiene los aminoácidos cisteína y arginina en estas posiciones.

21. PERSPECTIVAS

- Se realizarán ensayos funcionales de las 5 variantes que tienen un papel potencial en la modulación de las HDL y que no han sido caracterizadas.
- Se realizarán ensayos de EMSA con oligonucleótidos que contengan la secuencia contigua a las variantes del promotor, utilizando para ello extractos nucleares de células HepG2.
- Se construirá un vector que contengan un gen reportero bajo el control de la secuencia promotora de la LH.
- Se generarán de manera individual las 3 variantes del promotor mediante mutagénesis dirigida y se medirá si se modifica la transcripción con respecto al promotor silvestre.
- Se construirá un vector de expresión de la LH y se generarán por mutagénesis dirigida las 2 variantes de la secuencia codificante que no han sido estudiadas. Se analizará si se modifica la actividad de la enzima con respecto a la enzima nativa.
- Se determinará el efecto *in vivo* de estas 5 variantes mediante la medición de la actividad sérica de la LH en los portadores.
- También se realizará el estudio de estas variantes en sujetos de la población abierta, esto nos permitirá determinar las frecuencias alélicas de cada una de las variantes en la población general, así como su contribución en la modulación de las HDL en población mexicana.

22. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Acton, S., A. Rigotti, K. T. Landschulz, S. Xu, H. H. Hobbs, and M. Krieger. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271: 518–20.
- 2) Agellon, L.B., A Walsh, T Hayek, P Moulin, XC Jiang, SA Shelanski, JL Breslow, and AR Tall. Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J Biol Chem* 1991; 266: 10796–801.
- 3) Aguilar-Salinas, C. A., G. Olaiz, V. Valles, J. M. RíosTorres, F. J. Gómez Perez, J. A. Rull, R. Rojas, A. Franco, J. Sepúlveda. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001; 42 (8): 1298-307.
- 4) Alex, R., O. Sozeri, S. Meyer, and R. Dildrop. Determination of the DNA sequence recognized by the bHLH-zip domain of the N-Myc protein. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 2257–63.
- 5) Ameis, D., G. Stahnke, J. Kobayashi, J. McLean, G. Lee, M. Buscher M. C. Schotz, and H. Will. Isolation and characterization of the human hepatic lipase gene. *J Biol Chem* 1990; 265: 6552–55.
- 6) Applebaum, D. Lipases and lecithin: cholesterol acyltransferase in the control of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1995; 6: 130–35.
- 7) Arya, R., R. Duggirala, L. Almasy, D. L. Rainwater, M. C. Mahaney, S. Cole, T. D. Dyer, K. Williams, R. J. Leach, J. E. Hixson, J. W. MacCluer, P. O'Connell, M. P. Stern, J. Blangero. Linkage of high-density lipoprotein-cholesterol concentrations to a locus on chromosome 9p in Mexican Americans. *Nat Genet* 2002; 30: 102-05.
- 8) Auwerx, J. H., C. A. Marzetta, J. E. Hokanson and J. D. Brunzell. Large buoyant LDL-like particles in hepatic lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1989; 9, 319-25.
- 9) Bamberger, M., J. M. Glick, and G. H. Rothblat. Hepatic lipase stimulates the uptake of high density lipoprotein cholesterol by hepatoma cells. *J Lipid Res* 1983; 24: 869-76.
- 10) Bateman A., R. Sandford. The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Curr Biol* 1999; 9:R588-90.
- 11) Bausserman, L. L., A. L. Saritelli, P. N. Herbert. Effects of short-term stanozolol administration on serum lipoproteins in hepatic lipase deficiency. *Metabolism* 1997; 46 (9): 992-6.
- 12) Benhizia, F., D. Lagrange, M. I. Malewiak, and S. Griglio. In vivo regulation of hepatic lipase activity and mRNA levels by diets which modify cholesterol influx to the liver. *Biochim Biophys Acta* 1994b; 1211: 181–88.
- 13) Benhizia, F., I. Hainault, C. Serougne, D. Lagrange, E. Hajdouch, C. Guichard, M. I. Malewiak, A. Quignard-Boulange, M. Lavau, and S. Griglio. Effects of a fish oil-lard diet on rat plasma lipoproteins, liver FAS, and lipolytic enzymes. *Am J Physiol* 1994a; 267: E975–82.
- 14) Benoit, P., F. Emmanuel, J. M. Caillaud, L. Bassinet, G. Castro, P. Gallix, J. C. Fruchart, D. Branellec, P. Deneffe, N. Duverger. Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation* 1999; 99 (1): 105-10.

- 15) Ben-Zeev, O., G. Stahnke, G. Liu, R. C. Davis, and M. H. Doolittle. Lipoprotein lipase and hepatic lipase: the role of asparaginyl-linked glycosylation in the expression of a functional enzyme. *J Lipid Res* 1994; 35: 1511–23.
- 16) Berg, A. L., and P. Nilsson-Ehle. Direct effects of corticotrophin on plasma lipoprotein metabolism in man—studies in vivo and in vitro. *Metabolism* 1994; 43: 90–97.
- 17) Bersot, T. P., G. L. Vega, S. M. Grundy, K. E. Palaoglu, P. Atagunduz, S. Ozbayrakci, O. Gokdemir, and R. W. Mahley. Elevated hepatic lipase activity and low levels of high density lipoprotein in a normotriglyceridemic, nonobese Turkish population. *J Lipid Res* 1999; 40: 432–38.
- 18) Bhopal, R., N. Unwin, M. White, J. Yallop, L. Walker, K. G. Alberti, J. Harland, S. Patel, N. Ahmad, C. Turner, B. Watson, D. Kaur, A. Kulkarni, M. Laker, A. Tavidou. Heterogeneity of coronary heart disease risk factors in Indian, Pakistani, Bangladeshi, and European origin populations: cross sectional study. *BMJ* 1999; 319 (7204): 215–20.
- 19) Blow, D. Enzymology. More of the catalytic triad. *Nature* 1990; 343: 694–95.
- 20) Boedeker, J. C., M. Doolittle, S. Santamarina-Fojo, and A. L. White. Role of N-linked carbohydrate processing and calnexin in human hepatic lipase secretion. *J Lipid Res* 1999; 40: 1627–35.
- 21) Brand, K., K. A. Dugi, J. D. Brunzell, D. N. Nevin, and S. Santamarina-Fojo. A novel A→G leads to alternative splicing resulting in enzyme deficiency. *J Lipid Res* 1996; 37: 1213–23
- 22) Breathnach, R., & P Chambon. *Annu Rev Biochem* 1981; 50: 349–83.
- 23) Breckenridge, W.C., J. A. Little, P. Alaupovic, et al. Lipoprotein abnormalities associated with a familial deficiency of hepatic lipase. *Atherosclerosis* 1982; 45: 161–79.
- 24) Breedveld, B., K. Schoonderwoerd, A. J. Verhoeven, R. Willemsen, and H. Jansen. Hepatic lipase is localized at the parenchymal cell microvilli in rat liver. *Biochem J* 1997; 321: 425–30.
- 25) Brinton, E. A. Oral estrogen replacement therapy in postmenopausal women selectively raises levels and production rates of lipoprotein A-I and lowers hepatic lipase activity without lowering the fractional catabolic rate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 431–40.
- 26) Brousseau, M. E., M. Bodzioch, E. J. Schaefer, A. L. Goldkamp, D. Kielar, M. Probst, J. M. Ordovas, C. Aslanidis, K. J. Lackner, H. Bloomfield, D. Collins, S. J. Robins, P. W. Wilson, G. Schmitz. Common variants in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 in men with low HDL cholesterol levels and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2001; 154: 607–11.
- 27) Brunham, L. R., J. K. Kruit, J. Iqbal, C. Fievet, J. M. Timmins, T. D. Pape, B. A. Coburn, N. Bissada, B. Staels, A. K. Groen, M. M. Hussain, J. S. Parks, F. Kuipers, M. R. Hayden. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006; 116:1052–62.
- 28) Bush, S. J., G. A. Martin, R. L. Barnhart, and R. L. Jackson. Heparin induces the expression of hepatic triglyceride lipase in a human hepatoma cell line. *J Biol Chem* 1989; 264: 22474–79.

- 29) Byberg, L., B. Zethelius, P. M. McKeigue, H. O. Lithell. Changes in physical activity are associated with changes in metabolic cardiovascular risk factors. *Diabetologia* 2001; 44: 2134-39.
- 30) Cai, S. J., D. M Wong., S. H. Chen, and L. Chan. Structure of the human hepatic triglyceride lipase gene. *Biochemistry* 1989; 28: 8966-71.
- 31) Caixas, A., A. Perez, A. Payes, C. Otal, G. Carreras, J. Ordonez-Llanos, J. Reviriego, J. H. Anderson, and A. de Leiva. Effects of a short-acting insulin analog (Insulin Lispro) versus regular insulin on lipid metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47: 371-76.
- 32) Canizales, S., C. A. Aguilar, E. Reyes, L. Riba, M. Rodríguez, S. Ramírez, A. Huertas-, V. Fragoso, A. Zentella, J. L. Ventura, G. Vega, A. López, M. Aurón, F. Gómez, J. Rull, N. J. Cox, G. I. Bell and M. T. Tusié. Locus on chromosome 6p linked to elevated HDL cholesterol serum levels and to protection against premature atherosclerosis in a kindred with familial hypercholesterolemia. *Circ Res* 2003; 92: 569-76.
- 33) Cao, Z., R. M. Umek and S. L. McKnight. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & Dev* 1991; 5: 1538 - 52.
- 34) Carlson, L. A., L. Holmquist, P. Nilsson-Ehle. Deficiency of hepatic-lipase activity in post-heparin plasma in familial hyper-beta-triglyceridemia. *Acta Med Scand* 1986; 219: 435-47.
- 35) Carr, M. C., A. F. Ayyobi, S. J. Murdoch, S. S. Deeb, J. D. Brunzell. Contribution of hepatic lipase, lipoprotein lipase, and cholesteryl ester transfer protein to LDL and HDL heterogeneity in healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 667-73.
- 36) Carr, M. C., J.E. Hokanson, S. S. Deeb, J. Q. Purnell, E.S. Mitchell and J. D. Brunzell. A Hepatic Lipase Gene Promoter Polymorphism Attenuates the Increase in Hepatic Lipase Activity With Increasing Intra-abdominal Fat in Women. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2701-07.
- 37) Carter, M. E., T. Gulick, D. D. Moore, and D. P. Kelly. A pleiotropic element in the medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene promoter mediates transcriptional regulation by multiple nuclear receptor transcription factors and defines novel receptor-DNA binding motifs. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4360-72.
- 38) Cenarro, A., M. Artieda, S. Castillo, P. Mozas, G. Reyes, D. Tejedor, R. Alonso, P. Mata, M. Pocoví, F. Civeira. A common variant in the ABCA1 gene is associated with a lower risk for premature coronary Herat disease in familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet* 2003; 40: 163-68.
- 39) Chan, J., H. Nakabayashi, and N. C. Wong. HNF-4 increases activity of the rat Apo A1 gene. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 1205-11.
- 40) Chang, S. F., J. G. Scharf, and H. Will. Structural and functional analysis of the promoter of the hepatic lipase gene. *Eur J Biochem* 1997; 247: 148-59.
- 41) Chapus, C., M. Roverly, L. Sarda, R. Verger. Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie* 1988; 70: 1223-34.
- 42) Choi, S. Y., M. C. Komaromy, J. Chen, L. G. Fong, and A. D. Cooper. Acceleration of uptake of LDL but not chylomicrons or chylomicron remnants by cells that secrete apoE and hepatic lipase. *J Lipid Res* 1994; 35: 848-59.

- 43) Cisar, L. A., and A. Bensadoun. Characterization of the intracellular processing and secretion of hepatic lipase in FU5AH rat hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1987; 927: 305–14.
- 44) Claudel, T., E. Sturm, H. Duez, I. P. Torra, A. Sirvent, V. Kosykh, J. C. Fruchart, J. Dallongeville, D. W. Hum, F. Kuipers, and B. Staels. Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest* 2002; 109: 961–71.
- 45) Clee, S. M., A. H. Zwinderman, J. C. Engert, K. Y. Zwarts, H. O. Molhuizen, K. Roomp, J. W. Jukema, M. van Wijland, M. van Dam, T. J. Hudson, A. Brooks, J. J. Genest, J. J. Kastelein, M. R. Hayden. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 1198-205.
- 46) Cohen, J.C., R.S. Kiss, A. Pertsemlidis, Y. L. Marcel, R. McPherson, H. H. Hobbs. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004; 305: 869-72.
- 47) Collet, X., B. P. Perret, G. Simard, C. Vieu, and L. Douste-Blazy. Behaviour of phospholipase-modified HDL towards cultured hepatocytes. I. Enhanced transfers of HDL sterols and apoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1043: 301–10.
- 48) Colvin, P. L., B. J. Auerbach, L. D. Case, W. R. Hazzard, and D. Applebaum-Bowden. A dose-response relationship between sex hormone-induced change in hepatic triglyceride lipase and high-density lipoprotein cholesterol in postmenopausal women. *Metab Clin Exper* 1991; 40: 1052–56.
- 49) Connelly, P. W., G. F. Maguire, M. Lee, J. A. Little. Plasma lipoproteins in familial hepatic lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1990; 10 (1): 40-8.
- 50) Connelly, P. W., S. Ranganathan, G. F. Maguire, M. Lee, J. J. Myher, B. A. Kottke, A. Kuksis, J. A. Little. The beta very low density lipoprotein present in hepatic lipase deficiency competitively inhibits low density lipoprotein binding to fibroblasts and stimulates fibroblast acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem* 1988; 263 (28): 14184-8.
- 51) Criqui, M. H. Epidemiology of atherosclerosis: an updated overview. *Am J Cardiol* 1986; 57: 18C-23C.
- 52) Davis, R. A., J. H. Miyake, T. Y. Hui, and N. J. Spann. Regulation of cholesterol-7 α -hydroxylase: BAREly missing a SHP. *J Lipid Res* 2002; 43: 533–43.
- 53) Davis, R. C., G. Stahnke, H. Wong, M. H. Doolittle, D. Ameis, H. Will, and M. C. Schotz. Hepatic lipase: site-directed mutagenesis of a serine residue important for catalytic activity. *J Biol Chem* 1990; 265: 6291–95.
- 54) De Beer, F. C., P. M. Connell, M. C. De Beer, N. R. Webb, and D. R. van de Westhuyzen. SAA and sPLA2 modification of HDL influences SR-BI mediated lipid flow. *Circulation* 1998; 7: I202 (Abstract).
- 55) Deeb, S. S. and R. Peng. The C-514T polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter diminishes its activity *J Lipid Res* 2000; 41: 155–58
- 56) Delrieu, I., C.C. Waller, M.M. Mota, M. Grainger, J. Langhorne, A.A. Holder. PSLAP, a protein with multiple adhesive motifs, is expressed in *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 121:11-20.
- 57) Demant, T., L. A. Carlson, L. Holmquist, F. Karpe, P. Nilsson-Ehle, C. J. Packard, and J. Shepherd. Lipoprotein metabolism in hepatic lipase deficiency: studies on the

- turnover of apolipoprotein B and on the effect of hepatic lipase on high density lipoprotein. *J Lipid Res* 1988; 29: 1603-1611
- 58) Diard, P., M-I. Malewiak, D. Lagrange, and S. Griglio. Hepatic lipase may act as a ligand in the uptake of artificial chylomicron remnant-like particles by isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1994; 299: 889-94.
 - 59) Dichek, H. L., W. Brecht, J. Fan, Z. S. Ji, S. P. McCormick, H. Akeefe, L. Conzo, D. A. Sanan, K. H. Weisgraber, S. G. Young, J. M. Taylor, and R. W. Mahley. Overexpression of hepatic lipase in transgenic mice decreases apolipoprotein B-containing and high density lipoproteins. Evidence that hepatic lipase acts as a ligand for lipoprotein uptake. *J Biol Chem* 1998; 273:1896-1903.
 - 60) Donner, C., C. Sungshin, M. Komaromy, and A. D. Cooper. Accelerated lipoprotein uptake by transplantable hepatomas that express hepatic lipase. *J Lipid Res* 1998; 39: 1805-15.
 - 61) Doolittle, M. H., H. Wong, R. C. Davis, and M. C. Schotz. Synthesis of hepatic lipase in liver and extrahepatic tissues. *J Lipid Res* 1987; 28: 1326-34.
 - 62) Duda, K., Y. I. Chi, and S. E. Shoelson. Structural basis for HNF-4alpha activation by ligand and coactivator binding. *J Biol Chem* 2004; 279: 23311-16.
 - 63) Dugi, K. A., M. J. A. Amar, R. D. Haudenschild, R. D. Shamburek, A. Bensadoun, R. F. Hoyt, J. Fruchart-Najib, Z. Madj, H. B. Brewer, and S. Santamarina-Fojo. In vivo evidence of both lipolytic and nonlipolytic function of hepatic lipase in the metabolism of HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 793-800.
 - 64) Durstenfeld, A., O. Ben-Zeev, K. Reue, G. Stahnke, M. H. Doolittle. Molecular characterization of human hepatic lipase deficiency. In vitro expression of two naturally occurring mutations. *Arterioscler Thromb* 1994; 14 (3): 381-5.
 - 65) Duverger, N., C. Viglietta, L. Berthou, F. Emmanuel, A. Tailleux, L. Parmentier-Nihoul, B. Laine, C. Fievet, G. Castro, J. C. Fruchart, L. M. Houbebine, P. Deneffe. Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein A-I in the liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16 (12): 1424-29.
 - 66) Edelstein C., F. Kezdy, A. M. Scanu; B. W. Shen. Apolipoproteins and the structural organization of plasma lipoproteins: Human plasma high-density lipoprotein-3. *J Lipid Res* 1979; 20: 143-153.
 - 67) Eisenberg, S., Y. Oschry and J. Zimmerman. Intravascular metabolism of the cholesteryl ester moiety of rat plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 1984; 25: 121-28.
 - 68) Emmison, N., V. A. Zammit, and L. Agius. Triacylglycerol accumulation and secretion in hepatocyte cultures. Effects of insulin, albumin and Triton WR 1339. *Biochem J* 1992; 285: 655-60.
 - 69) Evans, D., and F. U. Beil. The association of the R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene with coronary artery disease and hyperlipidemia. *J Mol Med* 2003; 81: 264-70.
 - 70) Fielding, C. J. and P. E. Fielding. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36 (2): 211-28.
 - 71) Fraser, J. D., V. Martinez, R. Straney, and M. R. Briggs. DNA binding and transcription activation specificity of hepatocyte nuclear factor 4. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 2702-07.
 - 72) Genest, J. Jr., M. Marcil, M. Denis, L. Yu. High density lipoproteins in health and in disease. *J Investig Med* 1999; 47 (1): 31-42.

- 73) Glass, C., R. C. Pittman, D. B. Weinstein, and D. Steinberg. Dissociation of tissue uptake of cholesterol ester from that of apoprotein A-I of rat plasma high density lipoprotein: selective delivery of cholesterol ester to liver, adrenal, and gonad. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 5435–39.
- 74) Goldberg, I. J., N. A. Le, H. N. Ginsberg, R. M. Krauss, F. T. Lindgren. Lipoprotein metabolism during acute inhibition of lipoprotein lipase in the cynomolgus monkey. *J Clin Invest* 1988; 81 (2): 561-8.
- 75) Gordon, D. J. and B. M. Rifkind. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989b; 321 (19): 1311-16.
- 76) Gordon, D.J., J. L. Probstfield, R. J. Garrison, J. D. Neaton, W. P. Castelli J. D. Knoke. D. R. Jacobs, Jr., S. Bangdiwala and H. A. Tyroler. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989a; 79: 8-15.
- 77) Gotto A. M., H. R. Pownall, R. J. Havel. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986; 128: 3-41.
- 78) Grundy, S. M., G. L. Vega, J. D. Otvos, D. L. Rainwater, J. C. Cohen. Hepatic lipase activity influences high density lipoprotein subclass distribution in normotriglyceridemic men. Genetic and pharmacological evidence. *J Lipid Res* 1999a; 40: 229–34.
- 79) Grundy, S. M., R. Pasternak, P. Greenland, S. Smith, Jr., V. Fuster. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999b; 100 (13): 1481-92.
- 80) Guendouzi, K., X. Collet, B. Perret, H. Chap, and R. Barbaras. Remnant high density lipoprotein2 particles produced by hepatic lipase display high-affinity binding and increased endocytosis into a human hepatoma cell line (HEPG2). *Biochemistry* 1998; 37:14974–80.
- 81) Guerra, R., J. Wang, S. M. Grundy, J. C. Cohen. A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4532–37.
- 82) Hadzopoulou-Cladaras, M., and P. Cardot. Identification of a cis-acting negative DNA element which modulates human hepatic triglyceride lipase gene expression. *Biochemistry* 1993; 32: 9657-67.
- 83) Harada, T., Y. Imai, T. Nojiri, H. Morita, D. Hayashi, K. Maemura, K. Fukino, D. Kawanami, G. Nishimura, K. Tsushima, K. Monzen, T. Tamazaki, S. Mitsuyama, T. Shintani, N. Watanabe, K. Seto, T. Sugiyama, F. Nakamura, M. Ohno, Y. Hirata, T. Yamazaki and R. Nagai. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* 2003; 169:105-12.
- 84) Hegele, R. A., J. A. Little, C. Vezina, G. F. Maguire, L. Tu, T. S. Wolever, D. J. Jenkins, P. W. Connelly. Hepatic lipase deficiency. Clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics. *Arterioscler Thromb* 1993; 13 (5): 720-8.
- 85) Hegele, R. A., H. Cao, S. B. Harris, A. J. Hanley, B. Zinman, and P. W. Connelly. The private hepatocyte nuclear factor-1alpha G319S variant is associated with plasma lipoprotein variation in Canadian Oji-Cree. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 217-22.

- 86) Hegele, R. A., J. A. Little, and P. W. Connelly. Compound heterozygosity for mutant hepatic lipase in familial hepatic lipase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 78–84.
- 87) Hegele, R. A., L. Tu, P. W. Connelly. Human hepatic lipase mutations and polymorphisms. *Hum Mutat* 1992; 1 (4): 320-24.
- 88) Heller, D. A., U. de Faire, N. L. Pedersen, G. Dahlen, G. E. McClearn. Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. *N Engl J Med* 1993; 328 (16): 1150-56.
- 89) Hill, J. S., R. C. Davis, D. Yang, J. Wen, J. S. Philo, P. H. Poon, M. L. Phillips, E. S. Kempner, and H. Wong. Human hepatic lipase subunit structure determination. *J Biol Chem* 1996; 271: 22931–36.
- 90) Hinds, D. A., R. P. Stokowski, N. Patil, K. Konvicka, D. Kershenovich, D. R. Cox, D. G. Ballinger. Matching strategies for genetic association studies in structured populations. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 317-25.
- 91) Hixenbaugh, E. A., T. R. Sullivan, J. F. Strauss III, E. A. Laposata, M. Komaromy, and L. G. Paavola. Hepatic lipase in rat ovary; Ovaries cannot synthesize hepatic lipase but accumulate it from the circulation. *J Biol Chem* 1989; 266: 4222–30.
- 92) Hoffer, M. J. V., H. Sniederb, S. J. H. Bredie, P. N. M. Demackerc, J. J. P. Kasteleind, R. R. Frants. and A. F. H. Stalenhoef. The V73M mutation in the hepatic lipase gene is associated with elevated cholesterol levels in four Dutch pedigrees with familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2000; 151 (2): 443-50.
- 93) Hu, C. and D. H. Perlmutter. Regulation of alpha1-antitrypsin gene expression in human intestinal epithelial cell line caco-2 by HNF-1alpha and HNF-4. *Am J Physiol* 1999; 276: G1181-94.
- 94) Huff, M. W., C. G. Sawyez, P. W. Connelly, G. F. Maguire, J. A. Little, and R. A. Hegele. Beta-VLDL in hepatic lipase deficiency induces apoE-mediated cholesterol ester accumulation in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993; 13: 1282 - 90.
- 95) Huuskonen, J., V. M. Olkkonen, M. Jauhiainen, C. Ehnholm. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 2001; 155: 269 –81.
- 96) Ikewaki, K., D. J. Rader, T. Sakamoto, M. Nishiwaki, N. Wakimoto, J. R. Schaefer, T. Ishikawa, T. Fairwell, L. A. Zech, H. Nakamura. Delayed catabolism of high density lipoprotein apolipoproteins A-I and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest* 1993; 92: 1650–58.
- 97) Isaacs, A., F. A. Sayed-Tabatabaei, O. T. Njajou, J. C. M. Witteman and C. M. van Duijn. The –514 C→T hepatic lipase promoter region polymorphism and plasma lipids: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3858-63.
- 98) Iverius, P. H. and J. D. Brunzell. Human adipose tissue lipoprotein lipase changes with feeding and relation to post-heparin enzyme. *Am J Physiol* 1985; 249: E107-14.
- 99) Jackson, R. L. (1983) Lipoprotein lipase and hepatic lipase. In: Boyer, P. D. (Ed.), *The Enzymes*, 3rd ed., vol. 16. Academic Press, New York, pp.141-181.
- 100) Jansen, H., A. J. Verhoeven, L. Weeks, J. J. Kastelein, D. J. Halley, A. van den Ouweland, J. W. Jukema, J. C. Seidell, J. C. Birkenhäger. Common C-to-T substitution at position -480 of the hepatic lipase promoter associated with a

- lowered lipase activity in coronary artery disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2837–42.
- 101) Jansen, H., A. van Tol, and W. C. Hülsmann. On the metabolic function of heparin releasable liver lipase. *Biochem biophys Res Commun* 1980; 92: 53-59.
- 102) Jansen, H., K. Schoonderwoerd, M. G. Baggen, and W. J. De Greef. The effect of corticotrophin on liver-type lipase activity in adrenals, liver and high-density lipoprotein subfractions in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1983; 753: 205–12.
- 103) Jansen, H., W. J. de Greef, and J. T. Uilenbroek. Localization of liver-type lipase in rat ovaries and its activity during the estrous cycle and lactation. *Mol Cell Endocrinol* 1985, 42: 253–58.
- 104) Jaye, M., K. J. Lynch, J. Krawiec, D. Marchadier, C. Maugeais, K. Doan, V. South, D. Amin, M. Perrone, and D. J. Rader. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 1999; 21: 424–28.
- 105) Jensen, G. L., B. Daggy, and A. Bensadoun. Triacylglycerol lipase, monoacylglycerol lipase and phospholipase activities of highly purified rat hepatic lipase. *Biochim Biophys Acta* 1982; 710: 464-70.
- 106) Ji, Z-S., H. L. Dichek, R. D. Miranda, and R. W. Mahley. Heparan sulfate proteoglycans participate in hepatic lipase and apolipoprotein E-mediated binding and uptake of plasma lipoproteins, including high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1997; 272: 31285–92.
- 107) Ji, Z-S., S. J. Lauer, S. Fazio, A. Bensadoun, J. M. Taylor, and R. W. Mahley. Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipase-secreting hepatoma cells in culture. *J BiolChem* 1994; 269: 13429–36.
- 108) Jiang, X. C, C. Bruce, J. Mar, M. Lin, Y. Ji, O. L. Francone, A. R. Tall. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest* 1999; 103: 907–14.
- 109) Jiang, X., O. L. Francone, C. Bruce, R. Milne, J. Mar, A. Walsh, J. L. Breslow, A.R. Tall. Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J Clin Invest* 1996; 98: 2373–380.
- 110) Jones, D. R., R. J. Schmidt, R. T. Pickard, P. S. Foxworthy, and P. I. Eacho. Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *J Lipid Res* 2002; 43: 383-91.
- 111) Kadowaki, H., G. M. Patton, and S. J. Robins. Metabolism of high density lipoprotein lipids by the rat liver: evidence for participation of hepatic lipase in the uptake of cholesteryl ester. *J Lipid Res* 1992; 33: 1689–98.
- 112) Kakko, S., J. Kelloniemi, P. von Rohr, I. Hoeschele, M. Tamminen, M. E. Brousseau, Y. A. Kesaniemi, M. J. Savolainen. ATP-binding cassette transporter A1 locus is not a major determinant of HDL-C levels in a population at high risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003; 166: 285-90.
- 113) Kardassis, D., E. Sacharidou, and V. I. Zannis. Transactivation of the human apolipoprotein CII promoter by orphan and ligand-dependent nuclear receptors. The regulatory element CIIC is a thyroid hormone response element. *J Biol Chem* 1998; 273: 17810-16.
- 114) Kaser, S., A. Sandhofer, B. Holzl, R. Gander, C. F. Ebenbichler, B. Paulweber, J.R. Patsch. Phospholipid and cholesteryl ester transfer are increased in lipoprotein lipase deficiency. *J Intern Med* 2003; 253: 208 –16.

- 115) Kihara, S., J. Wolle, C. Ehnholm, L. Chan, and K. Oka. Regulation of hepatic triglyceride lipase by thyroid hormone in HepG2 cells. *J Lipid Res* 1993; 34: 961–70.
- 116) Kimura, A., A. Nishiyori, T. Murakami, T. Tsukamoto, S. Hata, T. Osumi, R. Okamura, M. Mori, and M. Takiguchi. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the gene for ornithine transcarbamylase in a manner antagonistic to hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4). *J Biol Chem*; 1993. 268: 11125-33.
- 117) Kinnunen, P. K. 1984. Hepatic endothelial lipase: isolation, some characteristics, and physiological role. In *Lipases*. B. Borgstrom and H. L. Brockman, Editors. Elsevier Scientific Publishers, New York, 307-82.
- 118) Kinnunen, P. K., H. A. Unnerus, T. Ranta, C. Ehnholm, E. O. Nikkilä, and M. Seppala. Activities of post-heparin plasma lipoprotein lipase and hepatic endothelial lipase during pregnancy and lactation. *Eur J Clin Invest* 1980; 10: 469–74.
- 119) Knoblauch, H., A. Bauerfeind, M. R. Toliat, C. Becker, T. Luganskaja, U. P. Günther, K. Rohde, H. Schuster, C. Junghans, F. C. Luft, P. Nürnberg and J. G. Reich. Haplotypes and SNPs in 13 lipid-relevant genes explain most of the genetic variance in high density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol. *Hum Mol Gen* 2004; 13: 993-1004.
- 120) Knudsen, P., M. Antikainen, M. Uusi-Oukari, S. Ehnholm, S. Lahdenperä, A. Bensadoun, H. Funke, H. Wiebusch, G. Assmann, M. R. Taskinen, C. Ehnholm. Heterozygous hepatic lipase deficiency, due to two missense mutations R186H and L334F, in the HL gene. *Atherosclerosis* 1997; 128 (2): 165-74.
- 121) Knudsen, P., M. Antikainen, S. Ehnholm, M. Uusi-Oukari, H. Tenkanen, S. Lahdenpera, J. Kahri, M. Tilly-Kiesi, A. Bensadoun, M. R. Taskinen and C. Ehnholm. A compound heterozygote for hepatic lipase gene mutations Leu334-->Phe and Thr383-->Met: correlation between hepatic lipase activity and phenotypic expression. *Journal of Lipid Research* 1996; 37: 825-34.
- 122) Komaromy, M. C. and M. C. Schotz. Cloning of Rat Hepatic Lipase cDNA: Evidence for a Lipase Gene Family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1526 - 130.
- 123) Komaromy, M., S. Azhar, and A. D. Cooper. Chinese hamster ovary cells expressing a cell surface-anchored form of hepatic lipase. *J Biol Chem* 1996; 271: 16906–14.
- 124) Krapp, A., S. Ahle, S. Kersting, Y. Hua, K. Kneser, M. Nielsen, J. Gliemann, and U. Beisiegel. Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and b-VLDL into cells via the LDL receptorrelated protein (LRP). *J Lipid Res* 1996; 37: 926–36.
- 125) Krieger, M. The "best" of cholesterol, the "worst" of cholesterol: A tale of two receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4077 - 80.
- 126) Ktistaki, E. and I. Talianidis. Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* 1997; 277: 109-12.
- 127) Kuusi, T., E. A. Nikkilä, M. R. Taskinen, P. Somerharju and C. Ehnholm. Human postheparin plasma hepatic lipase activity against triacylglycerol and phospholipid substrates. *Clin Chim Acta* 1982; 122: 39-45.
- 128) Kuusi, T., P. Saarinen, and E. A. Nikkilä. Evidence for the role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of plasma high density lipoprotein2 in man. *Atherosclerosis*. 1980; 36: 589–93.

- 129) Kuusi, T., Y. A. Kesaniemi, M. Vuoristo, T. A. Miettinen, and M. Koskenvuo. Inheritance of high density lipoprotein and lipoprotein lipase and hepatic lipase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1987; 7: 421-25.
- 130) Ladias, J. A., M. Hadzopoulou-Cladaras, D. Kardassis, P. Cardot, J. Cheng, V. Zannis, and C. Cladaras. Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes ApoB, ApoCIII, and ApoAII by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J Biol Chem* 1992; 267: 15849-60.
- 131) Lambert, G., M. B. Chase, K. Dugi, A. Bensadoun, H. B. Brewer, Jr., and S. Santamarina-Fojo. Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. *J Lipid Res* 1999; 40: 1294-303.
- 132) Landschulz, K. T., R. K. Pathak, A. Rigotti, M. Krieger, and H. H. Hobbs. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest* 1996; 98: 984-95.
- 133) Lee, Y. H., B. Sauer, and F. J. Gonzalez. Laron dwarfism and non insulindependent diabetes mellitus in the Hnf-1alpha knockout mouse. *Mol Cell Biol* 1998; 18:3059-68.
- 134) Lewis, G.F., and D. J. Rader. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005; 96: 1221-32.
- 135) Li, J., G. Ning, and S. A. Duncan. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev* 2000; 14: 464-74.
- 136) Liang, C. P., and A. R. Tall. Transcriptional profiling reveals global defects in energy metabolism, lipoprotein, and bile acid synthesis and transport with reversal by leptin treatment in ob/ob mouse liver. *J Biol Chem* 2001; 276: 49066-76.
- 137) Little, J. A., and P. W. Connelly. Familial hepatic lipase deficiency. *Adv Exp Med Biol* 1986; 201: 253-60.
- 138) Lockwood, C. R. and T. M. Frayling. Combining genome and mouse knockout expression data to highlight binding sites for the transcription factor HNF1alpha. *In Silico Biol* 2003; 3: 57-70.
- 139) Louet, J. F., G. Hayhurst, F. J. Gonzalez, J. Girard, and J. F. Decaux. The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J Biol Chem* 2002; 277: 37991-38000.
- 140) Lutucuta, S., C. M. Ballantyne, H. Elghannam, A. M. Gotto, A. J. Marian. Novel polymorphisms in promoter region of ATP-binding cassette transporter gene and plasma lipids, severity, progression, and regression of coronary atherosclerosis and response to therapy. *Circ Res* 2001; 88: 969-73.
- 141) Mahley, R. W., K. E. Palaoglu, Z. Atak, J. Dawson-Pepin, A. M. Langlois, V. Cheung, H. Onat, P. Fulks, L. L. Mahley, F. Vakar, et al. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1995; 36 (4): 839-59.
- 142) Makishima, M., A. Okamoto Y., Repa J. J., Tu H., Learned R. M., Luk A., Hull M. V., Lustig K. D., Mangelsdorf D. J., and Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999; 284: 1362-65.
- 143) Malik, S. and S. Karathanasis. Transcriptional activation by the orphan nuclear receptor ARP-1. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 1536-43.

- 144) Marques-Vidal, P., C. Azéma, X. Collet, C. Vieu, H. Chap, and B. Perret. Hepatic lipase promotes the uptake of HDL esterified cholesterol by the perfused rat liver: A study using reconstituted HDL particles of defined phospholipid composition. *J Lipid Res* 1994; 35: 373–84.
- 145) Marrugat, J., R. Elosua, M. I. Covas, L. Molina, J. Rubies-Prat. Amount and intensity of physical activity, physical fitness and serum lipids in men. The MARATHOM Investigators. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 562-69.
- 146) Martin, G. A., S. J. Busch, G. D. Meredith, A. D. Cardin, D. T. Blankenship, S. J. Mao, A. E. Rechten, C. W. Woods, M. M. Racke, M. P. Schafer, M. C. Fitzgerald, D. W. Burke, M. A. Flanagan, and R. L. Jackson. Isolation and cDNA sequence of human postheparin plasma hepatic triglyceride lipase. *J Biol Chem* 1988; 263: 10907–14.
- 147) Merkel, M., R. H. Eckel, I. J. Goldberg. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 2002; 43: 1997–2006.
- 148) Mezdour, H., R. Jones, C. Dengremont, G. Castro, N. Maeda. Hepatic lipase deficiency increases plasma cholesterol but reduces susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *J Biol Chem* 1997; 272: 13570–75.
- 149) Miller, D. B., and J. D. Spence. Clinical pharmacokinetics of fibric acid derivatives (fibrates). *Clin Pharmacokinet* 1998; 34: 155–62.
- 150) Mullis, K.B. and F. Faloona. Specific Synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Meth Enzymol* 1987; 155: 335-50.
- 151) Murao, K., V. Terpstra, S. R. Green, N. Kondratenko, D. Steinberg, and O. Quehenberger. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 17551–57.
- 152) Neale, B. M. and P. C. Sham. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 353-62.
- 153) Neve, B. P., A. J. Verhoeven, and H. Jansen. Acute effects of adrenaline on hepatic lipase secretion by rat hepatocytes. *Metabolism* 1997; 46: 76–82.
- 154) Oka, K., K. Ishimura-Oka, M-J. Chu, and L. Chan. Transcription of the human hepatic lipase gene is modulated by multiple negative elements in HepG2 cells. *Gene* 1996; 180: 69-80.
- 155) Park, J.-I., S. Y. Tsai, and M. J. Tsai. Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J Med* 2003; 52: 174-81.
- 156) Parks, D. J., S. G. Blanchard, R. K. Bledsoe, G. Chandra, T. G. Consler, S. A. Kliewer, J. B. Stimmel, T. M. Willson, A. M. Zavacki, D. D. Moore, and J. M. Lehmann. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999; 284: 1365–68.
- 157) Peacock, J. M., D. K. Arnett, L. D. Atwood, R. H. Myers, H. Coon, S. S. Rich, M. A. Province, G. Heiss. Genome scan for quantitative trait loci linked to high-density lipoprotein cholesterol: The NHLBI Family Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1823-28.
- 158) Pereira, F. A., Y. Qiu, G. Zhou, M. J. Tsai, and S. Y. Tsai. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev* 1999; 13:1037-49.

- 159) Perret, B., L. Mabile, L. Martinez, F. Tercé, R. Barbaras, and X. Collet. Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation Bertrand. *J Lipid Res* 2002; 43: 1163–69.
- 160) Persoon, N. L., H. J. Sips, W. C. Hulsmann, and H. Jansen. Monoclonal antibodies against salt-resistant rat liver lipase. Crossreactivity with lipases from rat adrenals and ovaries. *Biochim Biophys Acta* 1986; 875: 286–92.
- 161) Persson, B., G. Bengtsson-Olivecrona, S. Enerback, T. Olivecrona, H. Jornvall. Structural features of lipoprotein lipase. Lipase family relationships, binding interactions, non-equivalence of lipase cofactors, vitellogenin similarities and functional subdivision of lipoprotein lipase. *Eur J Biochem* 1989; 179:39-45.
- 162) Pownall, H. J. Alcohol: lipid metabolism and cardioprotection. *Curr Atheroscler Res* 2002; 4: 107-12.
- 163) Prieur, X., F. G. Schaap, H. Coste, and J. C. Rodriguez. Hepatocyte nuclearfactor-4alpha regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, AMP-activated protein kinase, and mitogenactivated protein kinase pathway. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 3107-25.
- 164) Ragab, A., U. Rittner, C. Danet, J. Ragab, H. Chap, and B. P. Perret. Competitive PCR as a tool to study hepatic lipase regulation in Hep G2 cells. *Bull Mol Biol and Med* 1995; 20: 19–21.
- 165) Ramensky, V., P. Bork, and S. Sunyaev. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(17): 3894-900.
- 166) Rao, S. N., C. Cortese, N. E. Miller, Y. Levy, and B. Lewis. Effects of heparin infusion on plasma lipoproteins in subjects with lipoprotein lipase deficiency. Evidence for a role of hepatic endothelial lipase in metabolism of high-density lipoprotein subfractions in man. *FEBS Lett* 1982; 150: 255-59.
- 167) Rhee, J., Y. Inoue, J. C. Yoon, P. Puigserver, M. Fan, F. J. Gonzalez, and B. M. Spiegelman. Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2003; 100: 4012-17.
- 168) Rigotti, N. A., and R. C. Pasternak. Cigarette smoking and coronary heart disease: risks and management. *Cardiol Clin* 1996; 14: 51-68.
- 169) Rinninger, F., W. A. Mann, T. Kaiser, S. Ahle, N. Meyer, and H. Greten. Hepatic lipase mediates an increase in selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters by human Hep3B hepatoma cells in culture. *Atherosclerosis* 1998; 141: 273–85.
- 170) Rufibach, L. E., S. A. Duncan., M. Battle, and S. S. Deeb. Transcriptional regulation of the human hepatic lipase (LIPC) gene promoter. *J Lipid Res* 2006; 47: 1463-77.
- 171) Ruotolo, G., M. Parlavecchia, M. R. Taskinen, G. Galimberti, A. Zoppo, N. A. Le, F. Ragona, P. Micossi, and G. Pozza. Normalization of lipoprotein composition by intraperitoneal insulin in IDDM. Role of increased hepatic lipase activity. *Diabetes Care* 1994, 17: 6–12.
- 172) Rye, K-A, M. Jauhiainen, P. J. Barter, C. Ehnholm. Triglyceride-enrichment of high density lipoproteins enhances their remodelling by phospholipids transfer protein. *J Lipid Res* 1998; 39: 613–22.

- 173) Sagami, I., S. Y. Tsai, H. Wang, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley. Identification of two factors required for transcription of the ovalbumin gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 4259-67.
- 174) Saiki, R.K., S.J. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arheim, Enzymatic amplification of b-globin genomic and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-54.
- 175) Sambrook, J., F. Fritsh, T. Maniatis. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. Cold spring Harbor Laboratory Press USA, 1989; 2da. Ed. Anexo B4.
- 176) Sanan, D. A., J. Fan, A. Bensadoun, and J. M. Taylor. Hepatic lipase is abundant on both hepatocyte and endothelial cell surfaces in the liver. *J Lipid Res* 1997; 38: 1002-13.
- 177) Schaefer, E.J., W.H. Heaton, M.G. Wetzel, and H.B. Brewer. Plasma apolipoprotein A-1 absence associated with a marked reduction of high density lipoproteins and premature coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 1982; 2: 16-26.
- 178) Schwartz, C.C., VandenBroek, J.M., and Cooper, P.S. Lipoprotein cholesteryl ester production, transfer, and output in vivo in humans. *J Lipid Res* 2004; 45: 1594-1607.
- 179) Scriver, C. R., A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, B. Childs, K. W. Kinzler, B. Vogelstein. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill USA, 2001; V II pp 2706, 2709, 2915- 2918, 2925.
- 180) Secretaría de Salud. *Salud pública de México* 2002; 44 (6): noviembre-diciembre.
- 181) Sehayek, E., J. G. Ono, S. Shefer, L. B. Nguyen, N. Wang, A. K. Batta, G. Salen, J. D. Smith, A. R. Tall, and J. L. Breslow. Biliary cholesterol excretion: a novel mechanism that regulates dietary cholesterol absorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10194-99.
- 182) Semenkovich, C. F., S. H. Chen, M. Wims, C. C. Luo, W. H. Li, and L. Chan. Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. *J Lipid Res* 1989; 30: 423-31.
- 183) Sendak, R. A., D. E. Berryman, G. Gellman, K. Melford, and A. Bensadoun. Binding of hepatic lipase to heparin. Identification of specific heparin-binding residues in two distinct positive charge clusters. *J Lipid Res* 2000; 41: 260-68.
- 184) Sensel, M. G., A. Legrand-Lorans, M. E. Wang, and A. Bensadoun. Isolation and characterization of clones for the rat hepatic lipase gene upstream regulatory region. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1048: 297-302.
- 185) Seol, W., H. S. Choi, and D. D. Moore. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 72-85.
- 186) Shafi, S., S. E. Brady, A. Bensadoun, and R. J. Havel. Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver. *J Lipid Res* 1994; 35: 709-720.
- 187) Sheena, V., R. Hertz, J. Noursbeck, I. Berman, J. Magenheimer, and J. Bar-Tana. Transcriptional regulation of human microsomal triglyceride transfer protein by hepatocyte nuclear factor-4alpha. *J Lipid Res* 2005; 46: 328-41.
- 188) Shih, D. Q., M. Bussen, E. Sehayek, M. Ananthanarayanan, B. L. Shneider, F. J. Suchy, S. Shefer, J. S. Bollileni, F. J. Gonzalez, J. L. Breslow, and M. Stoffel. Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat Genet* 2001; 27: 375-82.

- 189) Shin, D. J., J. A. Campos, G. Gil, and T. F. Osborne. PGC-1 α activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 2003; 278: 50047-52.
- 190) Shioji, K., J. Nishioka, H. Naraba, Y. Kokubo, T. Mannami, N. Inamoto, K. Kamide, S. Takiuchi, M. Yoshii, Y. Miwa, Y. Kawano, T. Miyara, S. Miyazaki, Y. Goto, H. Nonogi, N. Tago, N. Iwai. A promoter variant of the ATP-binding cassette transporter A1 gene alters the HDL cholesterol level in the general Japanese population. *J Hum Genet* 2004; 49: 141-47.
- 191) Shirai, K., R. L. Barnhart, R. L. Jackson. Hydrolysis of human plasma high density lipoprotein 2- phospholipids and triglycerides by hepatic lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 100 (2): 591-9.
- 192) Sinal, C. J., M. Tohkin, M. Miyata, J. M. Ward, G. Lambert, and F. J. Gonzalez. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000; 102: 731-44.
- 193) Singaraja, R.R., L. R. Brunham, H. Visscher, J. J. Kastelein and M. R. Hayden. Efflux and Atherosclerosis: The clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 720-27.
- 194) Sirvent, A., A. J. M. Verhoeven, H. Jansen, V. Kosykh, R. Darteil, D. W. Hum, J.-C. Fruchart, and B. Staels. Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *J Lipid Res* 2004; 45: 2110-15.
- 195) Soro, A., P. Pajukanta, H. E. Lilja, K. Ylitalo, T. Hiekkalinna, M. Perola, R. M. Cantor, J. S. Viikari, M. R. Taskinen, L. Peltonen. Genome scans provide evidence for low-HDL-C loci on chromosomes 8q23, 16q24.1-24.2, and 20q13.11 in Finnish families. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1333-40.
- 196) Sorva, R., T. Kuusi, M. R. Taskinen, J. Perheentupa, and E. A. Nikila. testosterone substitution increases the activity of lipoprotein lipase and hepatic lipase in hydrogonadal males. *Atherosclerosis* 1988; 69: 191-97.
- 197) Srinivasan, S. R., S. Li, W. Chen, E. Boerwinkle and G. Berenson. R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides related to age and adiposity in white versus black young adults. The Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 2003; 52: 930-34.
- 198) Staels, B., H. Jansen, A. van Tol, G. Stahnke, H. Will, G. Verhoeven, and J. Auwerx. Development, food intake, and ethinylestradiol influence hepatic triglyceride lipase and LDL-receptor mRNA levels in rats. *J Lipid Res* 1990; 31: 1211-18.
- 199) Stahnke, G., R. C. Davis, M. H. Doolittle, H. Wong, M. C. Schotz, and H. Will. Effect of N-linked glycosylation on hepatic lipase activity. *J Lipid Res* 1991; 32: 477-84.
- 200) Stahnke, G., R. Sprengel, J. Augustin, and H. Will. Human hepatic triglyceride lipase: cDNA cloning, amino acid sequence and expression in a cultured cell line. *Differentiation* 1987; 35: 45-52.
- 201) Stroup, D. and J. Y. Chiang. HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1). *J Lipid Res* 2000; 41: 1-11.
- 202) Su, Z., S. Zhang, D. W. Nebert, L. Zhang, D. Huang, Y. Hou, L. Liao, and C. Xiao. A novel allele in the promoter of the hepatic lipase is associated with increased

- concentration of HDL-C and decreased promoter activity. *J Lipid Res* 2002; 43: 1595–601.
- 203) Summerfield, J. A., D. Applebaum-Bowden, and W. R. Hazzard. Effects of diet and age on lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase activities in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 175: 158–63.
- 204) Sunyaev, S., V. Ramensky, I. Koch, W. Lathe III, A. S. Kondrashov, and P. Bork. Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 591-97.
- 205) Syvanne, M., M. Ahola, S. Lahdenpera, J. Kahri, T. Kuusi, K. S. Virtanen, and M. R. Taskinen. High density lipoprotein subfractions in non-insulin-dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. *J. Lipid Res* 1995; 36: 573–82.
- 206) Tahvanainen, E., M. Syv anne, M. H. Frick, et al. Association of variation in hepatic lipase activity with promoter variation in the hepatic lipase gene. *J Clin Invest* 1998; 101: 956–60.
- 207) Takagi, S., N. Iwai, S. Miyazaki, H. Nonogi, Y. Goto. Relationship between ABCA1 genetic variation and HDL cholesterol level in subjects with ischemic heart diseases in Japanese. *Thromb Haemost* 2002; 88: 369-70.
- 208) Tall, A. R., D. M. Small, R. J. Deckelbaum, G. Shipley. Structure and thermodynamic properties of high-density lipoprotein recombinants. *J Biol Chem* 1977; 252: 4701-11.
- 209) Tall, A. R., N. Wang, and P. Mucksavage. Is it time to modify the reverse cholesterol transport model? *J Clin Invest* 2001; 108: 1273-75.
- 210) Tall, A.R. An overview of reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* 1998; 19 (Suppl A): A31-A35.
- 211) Tan, J. H., P. S. Low, Y. S. Tan, M. C. Tong, N. Saha, H. Yang, C. K. Heng. ABCA1 gene polymorphisms and their associations with coronary artery disease and plasma lipids in males from three ethnic populations in Singapore. *Hum Genet* 2003; 113: 106-17.
- 212) Temel, R. E., B. Trigatti, R. B. DeMattos, S. Azhar, M. Krieger, and D. L. Williams. Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13600–05.
- 213) Teran-Garcia, M., N. Santero, T. Rankinen, J. Bergeron, T. Rice, A. S. Leon, D. C. Rao, J. S. Skinner, R. N. Bergman, J-P Despr es, and C. Bouchard. Hepatic Lipase Gene Variant –514C>T Is Associated With Lipoprotein and Insulin Sensitivity Response to Regular Exercise: The HERITAGE Family Study. *Diabetes* 2005; 54: 2251-55.
- 214) Tikkanen, M. J., E. A. Nikkil , T. Kuusi, and S. Sipinen. High density lipoprotein2 and hepatic lipase:reciprocal changes produced by oestrogens and norgestrel. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 1113–17.
- 215) Tikkanen, M. J., T. Kuusi, E. A. Nikkila, and U. H. Stenman. Variation of postheparin plasma hepatic lipase by menstrual cycle. *Metab Clin Exper* 1986; 35: 99–104.
- 216) Timmins, J.M., et al. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 2005; 115: 1333–42.
- 217) Todorova, B., A. Kubaszek, J. Pihlajam ki, J. Lindstr m, J. Eriksson, T. T. Valle, H. H m l inen, P. Ilanne-Parikka, S. Kein nen-Kiukaanniemi, J. Tuomilehto, M.

- Uusitupa, and M. Laakso. The G-250A Promoter Polymorphism of the Hepatic Lipase Gene Predicts the Conversion from Impaired Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes Mellitus: The Finnish Diabetes Prevention Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2019-23.
- 218) Tomchick, D. R., P. Phan, M. Cymborowski, W. Minor, T. R. Holman. Structural and functional characterization of second-coordination sphere mutants of soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* 2001; 40 (25):7509-17.
- 219) Tornvall, P., G. Olivecrona, F. Karpe, A. Hamsten, T. Olivecrona. Lipoprotein lipase mass and activity in plasma and their increase after heparin are separate parameters with different relations to plasma lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1086–93.
- 220) Tregouet, D. A., S. Ricard, V. Nicaud, I. Arnould, S. Soubigou, M. Rosier, N. Duverger, O. Poirier, S. Macé, F. Kee, C. Morrison, P. Deneffe, L. Tiret, A. Evans, J. F. Deleuze, F. Cambien. In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 775-81.
- 221) Valdemarsson, S., P. Hansson, P. Hedner, and P. Nilsson-Ehle. Relations between thyroid function, hepatic ant lipoprotein lipase activities, and plasma lipoprotein concentrations. *Acta Endocrinol* 1983; 104: 50–56.
- 222) van't Hooft, F. M., B. Lundahl, F. Ragogna, F. Karpe, G. Olivecrona, A. Hamsten Functional Characterization of 4 Polymorphisms in Promoter Region of Hepatic Lipase Gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1335-39.
- 223) Vaulont, S., A. Kahn. Transcriptional regulation of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J* 1994; 8: 28–35.
- 224) Vega, G. L., J. Gao, T. P. Bersot, R. W. Mahley, R. Verstraete, S. M. Grundy, A. White, J. C. Cohen The -514 polymorphism in the hepatic lipase gene (LIPC) does not influence androgen-mediated stimulation of hepatic lipase activity. *J Lipid Res* 1998; 39: 1520–24.
- 225) Verhoeven, A. J., and H. Jansen. Hepatic lipase mRNA is expressed in rat and human steroidogenic organs. *Biochim Biophys Acta* 1994b; 1211: 121–24.
- 226) Verhoeven, A. J., and H. Jansen. Secretion of rat hepatic lipase is blocked by inhibition of oligosaccharide processing at the stage of glucosidase I. *J Lipid Res* 1990; 31: 1883–93.
- 227) Verhoeven, A. J., D. Carling, and H. Jansen. Hepatic lipase gene is transcribed in rat adrenals into a truncated mRNA. *J Lipid Res* 1994a; 35: 966–75.
- 228) Villarreal, M. T., C. A. Aguilar, M. Rodríguez, D. Riaño, M. Villalobos, R. Coral, M. Menjivar, P. Yescas, M. Königsoerg, S. Romero, M. T. Tusie, S. Canizales, and the Metabolic Study Group. The ATP-Binding Cassette Transporter A1 R230C Variant Affects HDL Cholesterol Levels and BMI in the Mexican Population: Association With Obesity and Obesity-Related Comorbidities. *Diabetes*, Jul 2007; 56: 1881 – 1887
- 229) von Eckardstein, A., J-R Nofer, G. Assmann. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21 (1): 13-27.
- 230) Wang, D., and H. S. Sul. Upstream stimulatory factors bind to insulin response sequence of the fatty acid synthase promoter. USF1 is regulated. *J Biol Chem* 1995; 270: 28716–22.

- 231) Wang, N., T. Arai, Y. Ji, F. Rinninger, , and A. R. Tall. Liver-specific Overexpression of Scavenger Receptor BI Decreases Levels of Very Low Density Lipoprotein ApoB, Low Density Lipoprotein ApoB, and High Density Lipoprotein in Transgenic Mice. *J Biol Chem* 1998; 273: 32920-26.
- 232) Wang, N., W. Weng, J. L. Breslow, and A. R. Tall. Scavenger receptor BI (SR-BI) is up-regulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knock-out mice as a response to depletion of cholesterol stores: in vivo evidence that SR-BI is a functional high density lipoprotein receptor under feedback control. *J Biol Chem* 1996; 271: 21001-04.
- 233) Wang, X., and B. Paigen, Genetics of variation in HDL cholesterol in humans and mice. *Circ Res* 2005; 96: 27-42.
- 234) Weinstock, P. H., C. L. Bisgaier, K. Aalto-Setala, H. Radner, R. Ramakrishnan, S. Levak-Frank, A. D. Essenburg, R. Zechner, J. L. Breslow. Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes. *J Clin Invest* 1995; 96: 2555-68.
- 235) Weng, W., and J.L. Breslow. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1996; 93: 14788-94.
- 236) Whitfield, J. B., Martin N. G. Plasma lipids in twins. Environmental and genetic influences. *Atherosclerosis* 1983; 48 (3): 265-77.
- 237) Williams, S. C., C. A. Cantwell and P F Johnson. A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes & Dev* 1991; 5: 1553 - 67.
- 238) Williamson, R., D. Lee, J. Hagaman, and N. Maeda. Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1992; 89: 7134-38.
- 239) Wisely, G. B., A. B. Miller, R. G. Davis, A. D. Thornquest, Jr., R. Johnson, T. Spitzer, A. Seffler, B. Shearer, J. T. Moore, T. M. Willson, and S. P. Williams. Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure* 2002; 10: 1225-34.
- 240) Wolle, J., H. Jansen, L. C. Smith, and L. Chan. Functional role of N-linked glycosylation in human hepatic lipase: asparagine-56 is important for both enzyme activity and secretion. *J Lipid Res* 1993; 34: 2169-76.
- 241) Yancey P. G., A. E. Bortnick, G. Kellner, M. Llera, M. C. Phillips, G. H. Rothblat. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 712-19.
- 242) Yoon, J. C., P. Puigserver, G. Chen, J. Donovan, Z. Wu, J. Rhee, G. Adelmant, J. Stafford, C. R. Kahn, D. K. Granner, C. B. Newgard, and B. M. Spiegelman. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 2001; 413: 131-38.
- 243) Zambon, A., S. S. Deeb, A. Bensadoun, K. E. Foster, and J. D. Brunzell. In vivo evidence of a role for hepatic lipase in human apoB-containing lipoprotein metabolism, independent of its lipolytic activity. *J Lipid Res* 2000; 41: 2094-99.

- 244) Zambon, A., S. S. Deeb, B. G. Brown, J. E. Hokanson, and J. D. Brunzell. Common hepatic lipase gene promoter variant determines clinical response to intensive lipid-lowering treatment. *Circulation* 2001; 103: 792–98.
- 245) Zhang, Y., L. W. Castellani, C. J. Sinal, F. J. Gonzalez, and P. A. Edwards. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev* 2004; 18: 157-69.
- 246) Ziv, E., E. González. Human population structure and genetic association studies. *Pharmacogenomics* 2003; 4: 431-41.

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Registro Comité de Ética REF. 1518)

CONTRIBUCIÓN DE LAS VARIANTES ALÉLICAS FUNCIONALES DE LOS GENES *ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG4*, *SR-BI*, *LPL*, *LH* y *APOA1* EN LA VARIACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)

Yo _____ con No de Registro _____ declaro libre y voluntariamente que acepto participar en el proyecto para estudiar los genes del metabolismo de las HDL, que se llevará a cabo en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. También es de mi conocimiento que puedo retirarme de este estudio en cualquier momento si así lo deseo. En caso que decidiera retirarme, la atención que recibo como paciente no se verá afectada.

Entiendo que la muestra de sangre que done para el proyecto servirá para estudiar los genes que pudieran estar relacionados con el metabolismo del colesterol, principalmente de las HDL. Se me ha explicado que esto no representa un riesgo adicional para mi salud. También se me ha explicado que en el futuro, este estudio podría ayudar a identificar posibles blancos terapéuticos para prevenir o mejorar la calidad de vida de pacientes con enfermedad cardiovascular.

Estoy consciente de que los resultados de la investigación son confidenciales y que se contestarán todas las dudas que pueda tener sobre el estudio.

Firma del Paciente _____

Firma del Investigador _____

Testigo 1 (firma) _____

Testigo 2 (firma) _____

México, D. F. ____ de _____ del _____ .

Investigador Responsable **Dr. Samuel Canizales Quinteros**

ANEXO 2

CUESTIONARIO

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Fecha: ____/____/____				Pariente:				Clasif: _____		No.Exp.		
Fecha nacimiento ____/____/____				Edad				Estado civil				
Nombre:								Teléfono				
Domicilio:								E-mail				
Lugar de nacimiento:								Lengua:				
ANTROPOMETRIA												
Peso	Talla	IMC	C. Abd	C Cadera	Indice Cintura/Cadera	P. Sistólica	P. Diastólica					
kg	cm		cm	cm								
ESTUDIOS DE LABORATORIO										FECHA: _____		
TG	CT	HDL	LDL	Glu	Cre	INS	HBA1	ApoA ₁	Apo B	Leptin	adiponec	PCR
CONSUMO DE TABACO Y ALCOHOL												
¿Actualmente fuma?								Sí (1) NUNCA (0) _____ No (2)				
¿Cuántos cigarrillos fuma (fumaba) y con qué frecuencia?								Diario (1) Semanal (2) Mensual (3) Ocasional(4)		Frecuencia _____ Cantidad _____		
¿Durante cuánto tiempo ha fumado regularmente?								Menos de un mes (0)		Años _____		
¿Actualmente toma alcohol?								Nunca (0) Si (1) No (2)		_____		
Aproximadamente, ¿cuántas copas toma (tomaba), con que frecuencia, durante cuánto tiempo?								Diario (1) Semanal (2) Mensual (3) Ocasional (4)		Frecuencia _____ Cantidad _____ Meses _____ Años _____		
ACTIVIDAD FÍSICA SI NO								¿Cuál?				
# VECES A LA SEMANA								¿Tiene alguna incapacidad para moverse?				
DURACIÓN												
ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES												
	¿Vive? (Si/No)	Edad (años)	Causa	DM (Si/no)	C. I (Si/no)	Nefrop. diabética (Si/no)	Dislipidemia (Si/no)	Obesidad (Si/No)	Otra			
Padre												
Abo p Aba p Madre												

Abo m									
Aba m									
Hermanos									
Otros									
LUGAR DE NACIMIENTO					ESCOLARIDAD				
Padre									
Madre									
Abuelo Paterno									
Abuela paterna									
Abuelo materno									
Abuela materna									
ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS									
ANT. GINECO-OBSTETRICOS			Menarca	años	Frecuencia y duración de los ciclos			_____ x _____ días	
Irregularidades menstruales	S	N	¿Cuáles?						
Embarazos: _____ #	Edad 1er.embarazo: _____ años				Edad último embarazo _____ años				
Peso productos al nacer	_____ / _____ / _____ / _____ / _____ / _____ / _____ / _____ / _____ / _____								
Ha tenido algún aborto, óbito o alguno de los productos tuvo malformaciones?								_____ S _____ N	
Fecha última menstruación	___/___/___ D/M/A			Se encuentra en climaterio			_____ S _____ N		
Edad de presentación	_____ años			Recibe sustitución con estrógenos			_____ S _____ N		
COMORBILIDADES									
DIABETES MELLITUS		¿Tiene DM?			NO	Fecha de diagnóstico: ___/___/___ D/M/A			
Glucemia promedio último año: _____ mg/dl				SI	Edad de diagnóstico _____ años				
HIPERTENSION ARTERIAL		¿Tiene HAS?			NO	Fecha de diagnóstico: ___/___/___ D/M/A			
					SI	Edad de diagnóstico _____ años			
ALBUMINURIA O MICROALBUMINURIA				NO	Creatinina > 2 mg/dl			SI NO	
				SI	Edad de diagnóstico _____ años				
OBESIDAD	SI	NO			Edad de inicio _____ años			Peso al nacer Kg	

Peso > Kg.	F: ___/___/___ D/M/A		Peso < Kg	F: ___/___/___ D/M/A
Peso más reciente Kg	Peso hace 1 año Kg.		Peso habitual Kg	
Cambio crónico de peso	NO	SI	¿CUANTO? Kg	tiempo
Cambio agudo de peso	NO	SI	¿CUANTO? Kg	tiempo
DISLIPIDEMIA	Alguna vez se le han medido las concentraciones de:			
	Colesterol	SI	NO	Concentración mg/dl
	Triglicéridos	SI	NO	Concentración mg/dl
	Colesterol HDL	SI	NO	Concentración mg/dl
	Colesterol LDL	SI	NO	Concentración mg/dl