



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA VARIACIÓN DE LOS NIVELES
PLASMÁTICOS DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (C-HDL) A
TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. EN C. LEONOR JACOBO ALBAVERA

DIRECTOR DE TESIS
DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR
DR. JAIME MAS OLIVA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. ARMANDO TOVAR PALACIO
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D. F. ENERO DE 2013



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.



FACULTAD DE MEDICINA



PDCB/grad/ 087Jur/2012

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 312ª del 07 de noviembre del 2012, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **LEONOR JACOBO ALBAVERA**, con número de cuenta **40004975-3** con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA VARIACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD (C-HDL) A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA"** dirigida por el Dr. Samuel Canizales Quintero.

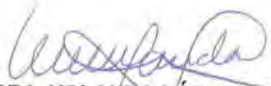
Presidente: Dr. Daniel Piñero Dalmau
Secretario: Dr. Samuel Canizales Quinteros
Vocal: Dr. Emilio Rojas del Castillo
Vocal: Dr. Gonzalo Castillo Rojas
Vocal: Dra. Martha E. Pérez Arméndariz

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud de la alumna, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, a 08 de noviembre de 2012.


DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
RESPONSABLE
FACULTAD DE MEDICINA


DR. DANIEL PIÑERO DALMAU
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p. Dr. Manuel Enrique Vázquez Yaktés, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dr. (a) Samuel Canizales Quinteros.
Coordinación de PDCB
DPD/YLV/evb

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcb.unam.mx> E-mail: pdcb@servidor.unam.mx

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y al Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

DEDICATORIAS

A mis padres, por darme la vida, su amor y su apoyo incondicional en todo momento, porque en gran parte gracias a ellos he llegado a ser la mujer y profesionalista que soy ahora.

A toda mi familia, por mantenerse unida y por enseñarme cada uno de sus integrantes siempre algo nuevo, en especial a mi hermano por su amor y apoyo incondicional.

A mi esposo, por su amor, su apoyo, su comprensión y su sabiduría. Gracias Ambar por compartir conmigo éste y todos mis proyectos de vida.

A mis amigos, que han compartido conmigo su esencia, me han apoyado en todo momento y me han dado la oportunidad de aprender de cada uno de ellos.

A la UNAM y a todos los profesores, que con su sabiduría me han enseñado el fascinante mundo de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros por su apoyo, su confianza y por compartir conmigo su experiencia y conocimiento para la realización de este trabajo.

Al Dr. Jaime Mas Oliva y al Dr. Armando Tovar Palacio por formar parte de mi comité tutorial y por su valiosa asesoría durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Ma. Teresa Villarreal Molina por su apoyo en la revisión crítica de esta tesis.

A la Dra. Sandra Romero Hidalgo por su apoyo en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

A la Dra. Ma. Teresa Tusié Luna, por ser la jefa de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, donde se realizó la parte experimental de este trabajo.

Al Biol. Salvador Ramírez Jiménez por su apoyo en el área técnica de este proyecto.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio 3 en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, por el trabajo en equipo para la captación de las muestras utilizadas en este proyecto y por los grandes momentos que hemos compartido.

A los miembros del jurado: Dr. Daniel Piñero Dalmau, Dr. Samuel Canizales Quinteros, Dr. Emilio Rojas del Castillo, Dr. Gonzalo Castillo Rojas y Dra. Martha E. Pérez Armendáriz, por su revisión y asesoría en la escritura de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Fundación TELMEX, por las becas recibidas para la realización de mis estudios de Doctorado.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
ABREVIATURAS.....	5
I.- INTRODUCCIÓN.....	6
1. Epidemiología del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL).....	6
2. Funciones y metabolismo de las HDL.....	7
3. Relación de las HDL con diversos trastornos metabólicos.....	14
4. Factores que modulan los niveles de C-HDL.....	15
4.1 Factores ambientales.....	15
4.2 Factores genéticos.....	15
5. Estrategias para la identificación de genes que regulan los niveles de C-HDL.....	16
5.1 Estudios de genes candidato.....	16
5.2 Estudios de asociación del genoma completo (GWAS).....	16
5.3 Secuenciación de genes en individuos con fenotipos extremos.....	17
5.4 Estudios de expresión génica.....	18
II.- JUSTIFICACIÓN.....	21
III.- HIPÓTESIS.....	23
IV.- OBJETIVOS.....	23
V.- METODOLOGÍA.....	24
1. Población de estudio: grupos con niveles extremos de C-HDL.....	24
2. Extracción de RNA para microarreglos.....	24
3. Análisis de la expresión génica mediante microarreglos.....	25
3.1 Microarreglos.....	25
3.2 Análisis estadístico de los microarreglos.....	26

4. Validación de los resultados de los microarreglos mediante PCR en tiempo real.....	26
5. Análisis de expresión de los genes Vanina 1 (<i>VNN1</i>) y Cubilina (<i>CUBN</i>) en población infantil.....	27
5.1 Población de estudio.....	27
5.1.1 Determinación de parámetros bioquímicos y antropométricos....	28
5.2 Extracción de RNA.....	28
5.3 Análisis de la expresión del gen <i>VNN1</i>	29
5.4 Extracción de DNA.....	30
5.5 Genotipificación de la variante G-137T del promotor de <i>VNN1</i>	30
5.6 Genotipificación de 10 marcadores de ancestría.....	31
5.7 Análisis de la expresión del gen <i>CUBN</i>	31
5.8 Secuenciación de la región promotora del gen <i>CUBN</i>	32
5.8.1 Genotipificación de la variante T-405A del promotor de <i>CUBN</i> ..	32
5.9 Análisis estadístico.....	33
VI.- RESULTADOS.....	35
6.1 Estudio de la expresión génica mediante microarreglos.....	35
-Características de los grupos con niveles extremos de C-HDL.....	35
-Análisis de redes de interacción biológica.....	37
-Validación de los resultados de los microarreglos mediante PCR en tiempo real.....	38
6.2 Análisis de la expresión del gen <i>VNN1</i>	39
-Variante G-137T y su asociación a los niveles de expresión del gen <i>VNN1</i> y a distintos parámetros metabólicos.....	42
6.3 Análisis de la expresión del gen <i>CUBN</i>	45
-Secuenciación de la región promotora del gen <i>CUBN</i>	47
-Variante T-405A y su asociación a los niveles de expresión del gen <i>CUBN</i> y a distintos parámetros metabólicos.....	48
VII.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51
VIII.-CONCLUSIONES.....	60
IX.- PERSPECTIVAS.....	61
X.- REFERENCIAS.....	62

XI. ANEXOS..... 75
- Artículo publicado..... 80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transporte reverso del colesterol.....	11
Figura 2. Mapa de calor mostrando la correlación entre los niveles de expresión de los genes identificados y la clasificación de las muestras en base a los niveles de C-HDL.....	36
Figura 3. Efecto de la variante G-137T sobre los niveles de expresión del gen <i>VNN1</i> en niños mexicanos prepúberes.....	43
Figura 4. Electroferograma de un individuo heterocigoto para la variante T-405A...	48
Figura 5. Efecto de la variante T-405A sobre los niveles de expresión del gen <i>CUBN</i> en niños mexicanos.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros antropométricos y bioquímicos de los niños analizados por microarreglos	35
Tabla 2. Genes con valores de <i>P</i> más significativos en el análisis de microarreglos...	38
Tabla 3. Análisis por PCR en tiempo real de los genes con mayor significancia en los microarreglos.....	39
Tabla 4. Parámetros bioquímicos y antropométricos de acuerdo al género de la población de estudio del gen <i>VNN1</i>	40
Tabla 5. Correlación de los niveles de expresión de <i>VNN1</i> en leucocitos con los fenotipos metabólicos	41
Tabla 6. Asociación de la variante G-137T con los parámetros metabólicos	44
Tabla 7. Parámetros bioquímicos y antropométricos de acuerdo al género de la población de estudio del gen <i>CUBN</i>	46
Tabla 8. Correlación de los niveles de expresión de <i>CUBN</i> en leucocitos con los fenotipos metabólicos	47
Tabla 9. Asociación de la variante T-405A con los parámetros metabólicos	50

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Oligonucleótidos y sondas empleados para el análisis de los genes con la expresión diferencial más significativa en los microarreglos.....	75
Tabla suplementaria 2. Oligonucleótidos empleados en la secuenciación del promotor del gen <i>CUBN</i>	76
Tabla suplementaria 3. Genes subexpresados con un FC < -1.50 y $P < 0.05$	77
Tabla suplementaria 4. Genes sobreexpresados con un FC > 1.50 y $P < 0.05$	78

RESUMEN

Los niveles bajos de colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL), condición conocida como hipoalfalipoproteinemia, es la dislipidemia más común en niños y adultos mexicanos, y es modulada por factores genéticos y ambientales. Existen pocos estudios de expresión génica global para la identificación de loci asociados a rasgos cuantitativos (eQTLs) para los niveles de C-HDL. Estos estudios han identificado algunos genes asociados a los niveles de C-HDL que no habían sido previamente reportados en los estudios de asociación del genoma completo (GWAS). Tal es el caso de Vanina 1 (*VNN1*), un gen que mostró una correlación significativa con los niveles de C-HDL en linfocitos de adultos México-americanos y cuya variante en promotor (G-137T) se asoció a la expresión del gen y a los niveles de C-HDL. El objetivo del presente estudio fue identificar genes asociados a la variación de los niveles de C-HDL a través del análisis de expresión génica en población infantil mexicana. El estudio de expresión génica global en grupos con niveles extremos de C-HDL permitió identificar 34 genes con expresión diferencial significativa. Aún cuando *VNN1* no presentó una expresión diferencial en los microarreglos, el análisis de su expresión en 224 niños de población general infantil mostró una correlación positiva con los niveles de C-HDL ($r=0.220$; $P=0.017$) y una correlación negativa con el z-score del IMC ($r=-0.225$; $P=0.015$) particularmente en las niñas. El genotipo TT de la variante G-137T se asoció significativamente con una menor expresión de *VNN1* ($P=2.9 \times 10^{-5}$), niveles más bajos de C-HDL ($\beta=-6.19$, $P=0.028$) y un mayor z-score del IMC ($\beta=0.48$, $P=0.024$) en la muestra total. La expresión de *CUBN*, uno de los genes más significativos en el microarreglo, correlacionó positivamente y de manera significativa con los niveles de C-HDL en una muestra de población infantil ($P=9.2 \times 10^{-5}$). Se identificó una variante en el promotor de este gen (T-405A) asociada significativamente a su expresión ($P=2.5 \times 10^{-6}$), pero no a los niveles de C-HDL. En conclusión, el análisis de patrones de expresión génica global en niños con niveles extremos de C-HDL permitió la identificación de genes, como *CUBN*, asociados a los niveles de este rasgo. Aun cuando la relevancia de *CUBN* en la modulación de los niveles de C-HDL ha sido documentada en modelos animales, este es el primer estudio en el que se muestra la correlación entre su expresión y los niveles de C-HDL en humanos. Los niveles de expresión del gen *VNN1* y la variante G-137T se asociaron a los niveles de C-HDL, en niñas prepúberes mexicanas. Sin embargo, se requieren estudios adicionales con un tamaño de muestra mayor para confirmar estos hallazgos.

ABSTRACT

Low plasma levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), a condition known as hypoalphalipoproteinemia, is the most common dyslipidemia in Mexican children and adults, modulated by both genetic and lifestyle factors. Relatively few genome-wide quantitative gene expression studies identifying expression quantitative trait loci (eQTLs) for HDL-C levels have been reported. Interestingly, these studies have identified some genes associated with HDL-C levels not previously associated with this trait by GWAS. In this regard, Vanin 1 (*VNN1*) gene expression levels were reported to show the strongest correlation with HDL-C concentrations in lymphocytes of Mexican-American adults, and the functional G-137T polymorphism (rs4897612) was associated with both *VNN1* expression levels and HDL-C concentrations in this population. We aim to identify genes associated with HDL-C levels through gene expression analysis in individuals with low and high plasma levels of HDL-C. Global gene expression analyses in groups with extreme HDL-C levels identified 34 genes with significant differential expression. Although *VNN1* did not show differential expression on microarray analysis, *VNN1* expression showed a positive correlation with HDL-C levels ($r=0.220$; $P=0.017$) in Mexican prepubertal children and a negative correlation with BMI z-score ($r=-0.225$; $P=0.015$) particularly in girls. The TT genotype was significantly associated with lower *VNN1* mRNA expression levels ($P=2.9 \times 10^{-5}$), decreased HDL-C levels ($\beta=-6.19$, $P=0.028$) and with higher body mass index (BMI) z-score ($\beta=0.48$, $P=0.024$) in the total sample. *CUBN* was one of the genes showing most significant differential expression and was analyzed in a distinct cohort of Mexican children; its expression had a positive and significant correlation with HDL-C levels ($P=9.2 \times 10^{-5}$). We identified a variant in the *CUBN* promoter that was significantly associated to *CUBN* expression ($P=2.5 \times 10^{-6}$) but not with HDL-C levels. In conclusion, global gene expression analyses in groups with extreme HDL-C levels allowed the identification of genes associated with this parameter. Although the role of *CUBN* in the modulation of HDL-C levels has been documented in animal models, this is the first study that shows correlation between *CUBN* expression and HDL-C levels in humans. *VNN1* gene expression and the G-137T variant are associated with HDL-C levels in Mexican children, particularly in prepubertal girls. However, these results should be interpreted with caution and further studies with larger samples sizes are required to confirm these findings.

ABREVIATURAS

C-HDL:	Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
Apo A1:	Apolipoproteína A1
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
SNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido
GWAS:	Estudios de asociación del genoma completo
HapMap:	Mapa de haplotipos; Proyecto Internacional del HapMap
IMC:	Índice de masa corporal
TG:	Triglicéridos
CT:	Colesterol total

I.- INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL).

La presencia de niveles bajos de colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL, High Density Lipoprotein Cholesterol) es una condición conocida como hipoalfalipoproteinemia y se define como niveles de C-HDL menores de 35 mg/dL en hombres y menores de 45 mg/dL en mujeres (von Eckardstein y cols., 2001). En el caso de los niños, el Panel de Expertos en Instrucciones para la Salud Cardiovascular y Reducción del Riesgo en Niños y Adolescentes define a la hipoalfalipoproteinemia como C-HDL < 40 mg/dL (Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents, 2011).

La hipoalfalipoproteinemia es una dislipidemia común en la población infantil, adolescente y adulta en México (Flores-Dorantes y cols., 2010; Posadas- Sánchez y cols., 2007; Aguilar-Salinas y cols., 2001); particularmente se ha reportado que está presente en más del 50% de la población adulta mayor a 20 años (46.2% para los hombres y 28.7% para las mujeres; C-HDL < 35 mg/dL) siendo ésta una de las prevalencias más altas a nivel mundial (Aguilar-Salinas y cols., 2001). En la Encuesta Nacional de Salud y Evaluación de la Nutrición de Estados Unidos del período 2009-2010, se reportó que los adultos mayores de 20 años presentaban una prevalencia de niveles bajos de C-HDL (< 40 mg/dL para ambos géneros) de 31.4% en los hombres y de 11.9% en las mujeres (Carroll y cols., 2012). En un estudio transversal realizado del 2008 al 2010 en individuos españoles mayores de 18 años se observó que el 25.5% de los hombres presentaron niveles bajos de C-HDL (< 40 mg/dL) y en el caso de las mujeres fue un 26.4% (C-HDL < 50 mg/dL) (Guallar-Castillón y cols., 2012). Se ha reportado que en algunas poblaciones asiáticas así como en la mexicana, se presentan altas prevalencias de niveles bajos de C-HDL: en un estudio realizado en población turca adulta joven (30-39 años), la prevalencia de hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres) fue de 35.1% en hombres y 13.7 en mujeres

(Soysal y cols., 2005); en un estudio de población de Pakistán y de Bangladesh de 25 a 74 años se reportó una prevalencia de niveles bajos de C-HDL (≤ 35 mg/dL) en los hombres de 30% y 52%, respectivamente, y de 14% y 21% en las mujeres (Bhopal y cols., 1999). En un estudio reciente se reportó que en población de la India de 18 a 75 años, la prevalencia de la hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres) fue de 34.1% en hombres y 35.1% en mujeres (Gupta y cols., 2012). Finalmente, se ha reportado que en varios países latinoamericanos también se presentan altas prevalencias de niveles bajos de C-HDL (< 40 mg/dL para ambos géneros); ejemplo de ello es Venezuela, donde la prevalencia es de 52.2%, Colombia con 45.6% y Perú con un 56.9% (Vinuela y cols., 2010).

Diversos estudios epidemiológicos, farmacológicos y en modelos animales han mostrado que las concentraciones anormales de lípidos y lipoproteínas en plasma favorecen el desarrollo y la evolución de la aterosclerosis (Grundy y cols., 1999) y particularmente existe evidencia de que las concentraciones de C-HDL tienen una fuerte correlación inversa con el riesgo de enfermedad arterial coronaria (Lewington y cols., 2007; von Eckardstein y cols. 2001); se ha reportado que un incremento de 1 mg/dL en los niveles de C-HDL se asocia a una disminución de un 2 a un 3% en el riesgo de enfermedad arterial coronaria en hombres y mujeres, respectivamente (Linsel-Nitschke y Tall, 2005; Toth, 2005).

2. Funciones y metabolismo de las HDL.

Las HDL son un grupo heterogéneo de partículas constituidas por un núcleo con colesterol esterificado y triglicéridos, rodeado de una capa anfipática de colesterol libre, fosfolípidos y apolipoproteínas (Klos y cols., 2007). Las apolipoproteínas más abundantes en las HDL son ApoA1 y ApoA2; ApoA1 está presente en la mayoría de las partículas de HDL y representa aproximadamente el 70% de su contenido proteico (Joy y Hegele, 2008).

Las HDL tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, contribuyen al mejoramiento de la función endotelial y tienen una participación esencial en el transporte reverso del colesterol (Ansell y cols., 2005; Tabet y Rye, 2009).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales incluyen al anión superóxido O_2^- , al anión hidroxilo (H_2O_2) y al peroxinitrito ($ONOO^-$), son subproductos del metabolismo del O_2 altamente reactivos que tienen un papel importante en la etiología de las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (Collin y cols., 2007; Bonomini y cols., 2008). Normalmente la tasa de producción de ROS se mantiene balanceada por la tasa de eliminación; sin embargo, un desequilibrio entre la producción oxidante y la capacidad antioxidante, un fenómeno conocido como estrés oxidativo, está asociado con el daño vascular observado en la aterosclerosis (Heitzer y cols., 2001). Se han realizado diversos estudios que sugieren que las HDL tienen propiedades antioxidantes, las cuales puede proteger contra el daño oxidativo en la aterosclerosis. Este efecto benéfico de las HDL ha sido atribuido a las enzimas paraoxonasa 1 (PON1) y a la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH), conocida también como fosfolipasa A_2 asociada a las lipoproteínas (Lp-PLA₂), presentes en la superficie de las HDL (Forte y cols., 1999; Ng y cols., 2005; Moren y cols., 2008). Las HDL pueden aceptar e inactivar fosfolípidos oxidados provenientes de las membranas celulares así como de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), mediante la participación de las enzimas PON1 y PAF-AH (Klimov y cols., 2001). La enzima PON1 es una enzima dependiente de calcio asociada a las HDL que cataliza la hidrólisis de los peróxidos de lípidos y previene su acumulación en las LDL; esto involucra la interacción de un grupo sulfhidrilo libre en la PON1 con los fosfolípidos oxidados, los ésteres de colesterol oxidados y la lisofosfatidilcolina en las LDL oxidadas (Aviram y cols., 2005). La enzima PAF-AH, una esterasa de serina independiente de calcio, protege contra la oxidación de las LDL mediante la hidrólisis de los fosfolípidos oxidados con cadenas cortas de acilo (Karabina y cols., 1997).

Las HDL inhiben la inflamación asociada al desarrollo de la placa aterosclerótica. Bajo condiciones normales, el endotelio es resistente a la adhesión leucocitaria. Sin embargo, los estímulos proinflamatorios, tales como una dieta alta en grasas saturadas, la hiperglucemia, la hipercolesterolemia, la obesidad, la resistencia a la insulina e hipertensión, activan el endotelio incrementando los niveles de citocinas circulantes, tales como IL-1 (Interleukin-1) y TNF- α (Tumour necrosis factor- α) (Han y cols., 2002; Okopien y cols., 2005). Esto conduce a una sobreexpresión endotelial de moléculas de adhesión como ICAM-1 (Intercellular adhesión molecule-1), VCAM-1 (Vascular cell adhesión molecule-1), selectina-P y selectina-E y facilita la captura y adhesión de los leucocitos, incluyendo monocitos, a la superficie endotelial (Ley y cols., 2007). Se ha reportado en diversos estudios realizados *in vitro* e *in vivo* que las HDL inhiben la expresión endotelial de estas moléculas de adhesión y previenen el reclutamiento de monocitos a la pared arterial (Cockerill y cols., 1995; Calabresi y cols., 1997; Clay y cols., 2001; Nicholls y cols., 2005).

Se ha reportado que la agregación plaquetaria está inversamente correlacionada con los niveles de HDL en humanos, sugiriendo así que las HDL tienen funciones antitrombóticas (Mineo y Shaul, 2012). La inhibición de la agregación plaquetaria ha sido observada con infusiones de ratas que presentan ApoA1 Milano, una forma mutante de ApoA1 que ocurre naturalmente como resultado de una sustitución de una arginina en la posición 173 por una cisteína, y con la administración de HDL reconstituidas (rHDL) a humanos; estos resultados han demostrado que las HDL inhiben la agregación plaquetaria *in vivo* (Pajkrt y cols., 1997; Li y cols., 1999). Existe evidencia de una gran variedad de mecanismos por los cuales las HDL protegen contra la trombosis arterial y venosa, incluyendo la activación de la síntesis de prostaciclina; sus propiedades antitrombóticas también están relacionadas con la disminución de la expresión de factores tisulares y selectinas, con la finalidad de inhibir la generación de trombina a través de la ruta de la proteína C y así, directa e indirectamente, reducir la activación plaquetaria (Mineo y cols., 2006).

La producción endotelial de ROS, especialmente de O_2^- y su rápida reacción con el óxido nítrico (NO), para generar $ONOO^-$, un potente oxidante y mediador del daño vascular, es un mecanismo clave en el desarrollo de la disfunción vascular en la aterosclerosis (Drew y cols., 2004). Se ha sugerido que algunos de los efectos cardioprotectores de las HDL sobre las paredes vasculares son mediados por el incremento de la actividad de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) y la producción subsecuente de óxido nítrico (Drew y cols., 2004; Mineo y Shaul, 2012); esto puede prevenir la progresión de las lesiones ateroscleróticas mediante la inhibición de la vasoconstricción, la proliferación de células de músculo liso vascular y la adhesión de monocitos al endotelio (Channon y cols., 2000).

El transporte reverso del colesterol (TRC) es uno de los principales mecanismos por el cual las HDL protegen contra la aterosclerosis. El TRC es el proceso por el cual el colesterol que se encuentra en las células periféricas, incluyendo los macrófagos que se encuentran en la pared arterial, es transportado hacia el hígado para ser eliminado por vía biliar (Figura 1) (Taskinen, 2003; Lewis y Rader, 2005). Este proceso inicia con la interacción de la proteína transmembranal ABCA1 (ATP-Binding Cassette Transporter A1) y la apolipoproteína A1 (ApoA1), una molécula aceptora del colesterol, promoviendo el eflujo de colesterol y fosfolípidos hacia las HDL nacientes. El colesterol es esterificado por la enzima lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), la cual transforma al colesterol en una molécula más hidrofóbica; los ésteres de colesterol abandonan la superficie de la lipoproteína para situarse en el interior de la partícula, aumentando su tamaño y formando partículas de HDL maduras. En los macrófagos, el colesterol libre es esterificado y transportado también a través de la proteína transmembranal ABCG1 (ATP-binding cassette transporter G1), directamente hacia las HDL maduras (Figura 1). El colesterol esterificado puede ser intercambiado por triglicéridos presentes en lipoproteínas que contienen apolipoproteína B-100, principalmente las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL). Este intercambio es facilitado por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP). Las partículas de HDL pueden unirse al receptor basurero clase BI (SR-BI), el cual reconoce a las HDL maduras. Estas

partículas son captadas por el hígado para su posterior excreción (Taskinen, 2003).

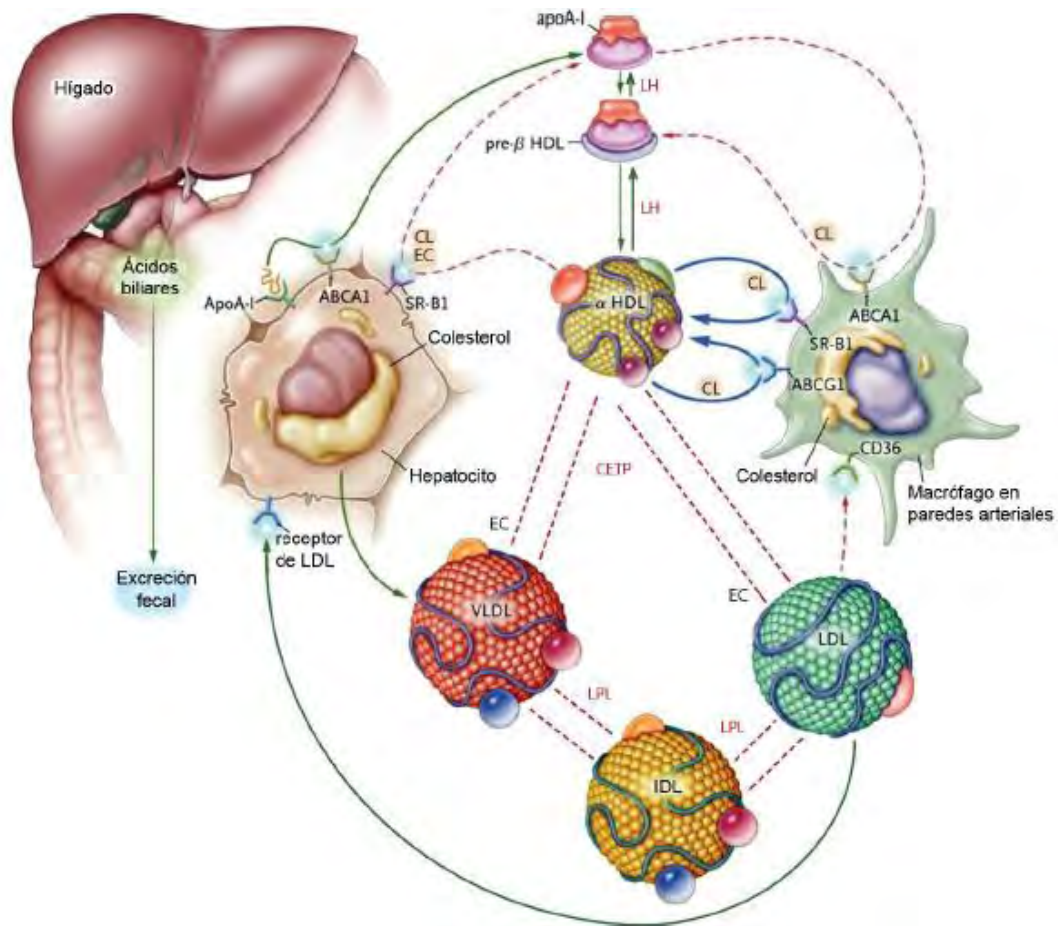


Figura 1. Transporte reverso del colesterol. Apo A-I es secretada del hepatocito como una proteína con poca cantidad de lípidos e interactúa con ABCA1 en macrófagos removiendo colesterol libre intracelular hasta tomar forma esférica de HDL madura. La partícula de HDL madura participa en el transporte reverso del colesterol interactuando con el receptor tipo basurero SR-B1 (Scavenger receptor class B member 1) en el hígado y potencialmente regenerando HDL discoidales bajas en lípidos. A su vez interactúa con el receptor SR-B1 presente en macrófagos de donde toma colesterol libre. CETP transfiere ésteres de colesterol de HDL maduras a VLDL y LDL. CL, colesterol libre; EC, ésteres de colesterol. (Modificado de Taskinen, 2003).

El catabolismo de las HDL puede ser dividido en dos partes: el catabolismo del colesterol asociado a las HDL (C-HDL) y el catabolismo de la apolipoproteína A1 (ApoA1). El órgano con mayor captación de C-HDL es el hígado; esta captación, como se mencionó anteriormente es mediada por el receptor SR-B1; este receptor promueve la captación hepática de C-HDL, tanto esterificado como no esterificado, sin intervenir

en la degradación de las apolipoproteínas de las HDL, un proceso conocido como captación selectiva (Rader, 2006). Los estudios realizados en hepatocitos polarizados sugieren que SR-BI participa en la internalización de las partículas HDL completas, con la subsecuente remoción del colesterol y la resecretión de partículas HDL más pequeñas con el colesterol reducido (Silver y cols., 2001). En ratones se ha observado que la expresión hepática de SR-BI es un regulador importante del TRC, ya que la sobreexpresión de este receptor incrementa el TRC y su deficiencia lo reduce (Zhang y cols., 2005). Esto es consistente con la evidencia de que la sobreexpresión de SR-BI reduce la aterosclerosis a pesar de la reducción en los niveles de C-HDL (Kozarsky y cols., 2000). Estos datos en conjunto demuestran que el eflujo del C-HDL es más importante que su concentración en estado estacionario con respecto a la aterosclerosis (Rader, 2006).

Estudios cinéticos realizados en humanos han demostrado que la tasa de recambio de ApoA1 es mucho más variable que su tasa de producción y que es un valor determinante en la concentración plasmática de ApoA1 y de C-HDL (Lewis y Rader, 2005). Se ha establecido en diversos estudios en modelos animales que una parte sustancial (aproximadamente un tercio) de ApoA1 es catabolizada por los riñones y el resto es catabolizada por el hígado (Rader y cols., 2006; Joy y Hegele, 2008). La ApoA1 pobre en lípidos puede ser filtrada en el glomérulo y catabolizada por las células epiteliales del túbulo renal proximal. Cubilina es una proteína extracelular sintetizada en estas células y localizada en la superficie apical, anclada mediante otra proteína conocida como amnionless (Moestrup y Nielsen, 2005); cubilina se une a las HDL y a ApoA1 con alta afinidad (Kozyraki y cols., 1999; Hammad y cols., 2000); e interactúa con un correceptor llamado megalina, para mediar la captación y degradación de ApoA1 (Hammad y cols., 2000). La HDL madura es muy grande para ser filtrada y por lo tanto es remodelada por diversos factores, generando una partícula de HDL más pequeña y una ApoA1 pobre en lípidos. La remodelación de la HDL consiste en la eliminación de colesterol esterificado, así como la hidrólisis de los fosfolípidos y triglicéridos; los dos procesos más importantes que implican la eliminación del colesterol esterificado de las

HDL son la transferencia a otras lipoproteínas vía CETP y la captación selectiva a través de SR-BI; ambos procesos influyen en el recambio de ApoA1 (Rader, 2006). En diversos estudios se ha demostrado que la función renal alterada está asociada a concentraciones anormales de C-HDL y ApoA1 en plasma (Cho y cols., 2008; Holzer y cols., 2011).

Las HDL pueden ser clasificadas por su tamaño (en orden decreciente) en HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b, HDL3c (Williams y cols., 1990). Estas subclases de HDL difieren en sus propiedades fisicoquímicas y se ha sugerido que tienen diferentes características antiaterogénicas (Kontush y cols., 2003); las HDL pequeñas son mejores aceptoras de colesterol, presentan una mayor actividad antioxidante y tienen una mayor capacidad para inhibir la expresión de moléculas de adhesión (Kontush y cols., 2003; Pérez-Méndez y cols., 2007a). Se ha reportado que la estructura de las HDL parece ser determinante en su metabolismo intravascular y en la remoción del compartimento plasmático; las HDL pequeñas son catabolizadas más rápido que las HDL más grandes en ratones (Lee y cols., 2004); además diversos estudios han sugerido que existe una relación entre la estructura de las HDL y el recambio de ApoA1 (Carreón-Torres y cols., 2005; Pérez-Méndez y cols., 2007b; Carreón-Torres y cols., 2009). En un estudio reciente realizado en conejos, se reportó que una reducción del 75% de la masa renal por nefrectomía estuvo asociada al enriquecimiento de las subclases de HDL con ésteres de colesterol y que las anomalías estructurales no se relacionaron con una disminución en el recambio de ApoA1, sugiriendo que el riñón contribuye a la remodelación de la HDL, además de ser un sitio catabólico para las lipoproteínas (Toledo-Ibelle y cols., 2012). En otro estudio reciente se reportó que la presencia de proteinuria está asociada a un cambio en la distribución del tamaño de las HDL, dirigido hacia la abundancia de partículas grandes y subclases de HDL pobres en colesterol; estos resultados apoyan la idea de una pérdida selectiva de HDL pequeñas por el riñón en pacientes con proteinuria (Soto-Miranda y cols., 2012). En conjunto, estudios demuestran el papel trascendental que tiene el riñón en el catabolismo de las HDL.

3. Relación de las HDL con diversos trastornos metabólicos.

La importancia del estudio de las HDL radica en gran parte en la asociación que se ha reportado entre la presencia de niveles bajos de C-HDL con diversos trastornos metabólicos que presentan anomalías en el transporte y/o el metabolismo de lípidos; ejemplos de estos trastornos son la obesidad (Robins, 2001), la resistencia a la insulina (Karhapää y cols., 1994), la diabetes (von Eckardstein y cols. 2001) y el síndrome metabólico (Lewis y Rader, 2005).

El Programa Nacional de Educación en Colesterol del Panel de Tratamiento en Adultos de los Estados Unidos (**National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III report (ATP III)**) identificó al síndrome metabólico como un factor de riesgo múltiple para la enfermedad cardiovascular. El síndrome metabólico se diagnostica mediante la evaluación de cinco criterios y la presencia de al menos 3 de ellos: cintura >102 cm en hombres o >88 cm en mujeres; **TG ≥ 150 mg/dL** o tratamiento hipolipemiante; C-HDL <40mg/dL en hombres o <50 mg/dL en mujeres; presión arterial sistémica **$\geq 130/85$ mmHg** o tratamiento antihipertensivo y glucemia en **ayunas ≥ 100 mg/dL** o tratamiento médico para la diabetes mellitus (Grundy y cols., 2004). Diversas organizaciones han establecido criterios para el diagnóstico de este síndrome: la Organización Mundial de la Salud (OMS), el Programa Nacional del Colesterol (National Cholesterol Program: NCEP) y la Fundación Internacional de la Diabetes (International Diabetes Foundation: IDF); la evaluación de la presencia de niveles bajos de C-HDL ha sido un criterio constante para el diagnóstico de este síndrome (Bauduceau y cols., 2007).

La detección del síndrome metabólico es importante porque permite la identificación de pacientes con riesgo de desarrollar aterosclerosis, diabetes tipo 2 y/o comorbilidades asociadas y a aquellos sujetos con un mayor riesgo de muerte por estas causas (Grundy y cols., 2004).

4. Factores que modulan los niveles de C-HDL.

La regulación de los niveles plasmáticos de C-HDL es un proceso complejo en el que participan tanto factores genéticos como ambientales (Lusis y cols., 2004; Heller y cols., 1993).

4.1 Factores ambientales.

Se ha reportado que cerca del 40% de la variación interindividual en los niveles del C-HDL se debe a factores ambientales o metabólicos (Jeffs y cols., 2006). Dentro de los factores que se ha demostrado que disminuyen los niveles de C-HDL están una dieta alta en carbohidratos y/o grasas saturadas, el tabaquismo y un estilo de vida sedentario, así como la presencia de niveles altos de triglicéridos y de resistencia a la insulina (Tall, 1990; Jeffs y cols., 2006). En contraparte, se ha reportado en diversos estudios realizados en distintas poblaciones sometidas a ciertos programas de entrenamiento, que la actividad física promueve un aumento significativo en los niveles de C-HDL (Pil-Byung y cols., 2011; Sheikholeslami Vatani y cols., 2011), así como el consumo moderado de alcohol (De Oliveira y cols., 2000). Se ha reportado que la combinación de una dieta baja en grasas saturadas y el aumento en el ejercicio, eleva los niveles de C-HDL un 5-14% (Varady y Jones, 2005).

4.2 Factores genéticos.

Estudios realizados en gemelos monocigóticos y en familias reportan que de un 50 a un 70% de la variación en los niveles de C-HDL está determinada genéticamente (Qasim y Rader, 2006; Goode y cols., 2007). Dada la importancia del componente genético en la modulación de los niveles de C-HDL, se han diseñado diversas estrategias para la identificación de los genes participantes en el metabolismo de las HDL. A continuación se describe brevemente cada una de ellas.

5. Estrategias para la identificación de genes que regulan los niveles de C-HDL.

5.1 Estudios de genes candidato.

Un gen candidato funcional es aquel que codifica para una proteína cuya función está involucrada con el rasgo a estudiar, por ejemplo, los niveles de C-HDL y por lo cual se considera que podría estar asociado a la modulación de este rasgo. Ejemplo de ello es el gen *ABCA1*, un transportador transmembranal muy importante en el transporte reverso del colesterol y diversos genes involucrados también en este proceso, como el gen de la *LCAT* (gen que codifica para la enzima lecitina-colesterol aciltransferasa), *CETP* (gen que codifica para la proteína transferidora de ésteres de colesterol) y *LPL* (gen que codifica para la enzima lipoprotein-lipasa). También existe el gen candidato posicional o regional, es decir, aquel gen que es seleccionado por evidencia previa de que se localiza en una región de ligamiento al rasgo estudiado (Weissglas-Volkov y Pajukanta, 2010). Generalmente lo que se hace una vez que se identificó al gen candidato (funcional o posicional) son estudios de asociación caso-control de variantes ubicadas en estos genes candidatos. Bajo esta estrategia, solo un pequeño número de genes cuentan con evidencia de réplica de su asociación para el C-HDL en varias poblaciones (Weissglas-Volkov y Pajukanta, 2010). Estos genes juntos explican menos del 10% de la variación en los niveles de C-HDL (Boes y cols., 2009), lo cual indica que aun existe una gran porción del componente genético de las HDLs por ser revelado.

5.2 Estudios de asociación del genoma completo (GWAS).

Los estudios de asociación del genoma completo tienen como objetivo identificar loci o genes no descritos previamente, asociados a una enfermedad o rasgo de interés. Se basan en el HapMap (Haplotype Map; mapa de haplotipos), el cual es un catálogo de variantes genéticas comunes que existen en los seres humanos; el HapMap describe a estas variantes, dónde se ubican en el DNA y cómo se distribuyen entre las personas

dentro de las poblaciones y entre las poblaciones en diferentes partes del mundo (International HapMap Consortium, 2003).

El estudio de asociación del genoma completo es definido como un análisis de asociación genética en el cual la densidad de marcadores genéticos y los patrones de desequilibrio de ligamiento son suficientes para capturar una gran proporción de variantes comunes en el genoma humano de la población en estudio; el número de muestras analizadas en estos estudios proveen el suficiente poder para detectar variantes de efecto modesto (Weissglas-Volkov y Pajukanta, 2010).

A la fecha se han realizado más de 10 GWAs para la identificación de variantes asociadas a los niveles de C-HDL. La mayoría de estos estudios se han desarrollado en población caucásica (Willer y cols, 2008; Kooner y cols, 2008; Kathiresan y cols., 2008; Chasman y cols., 2008; Kathiresan y cols., 2009). Esta estrategia aún cuando ha tenido éxito en la identificación de genes previamente asociados a la variación de los niveles de C-HDL, pocos son los genes nuevos que han podido ser identificados. Además, se estima que las variantes comunes encontradas mediante esta estrategia explican juntas cerca del 25% de la variación en los niveles de C-HDL (Dumitrescu y cols., 2011).

5.3 Secuenciación de genes en individuos con fenotipos extremos.

La secuenciación de genes en individuos con fenotipos extremos se basa en dos hipótesis: la existencia de variantes raras con efectos fenotípicos grandes y una mayor probabilidad de encontrar estas variantes en uno de los dos extremos de la distribución normal del rasgo estudiado. Esta estrategia permite identificar variantes posiblemente funcionales, a través de la secuenciación de las regiones del promotor proximal y regiones codificantes de genes candidatos en individuos con fenotipos extremos, es decir, en individuos con los niveles más bajos de C-HDL (menores al percentil 5-10) y en individuos con los niveles más altos de C-HDL (mayores al percentil 90-95) (Cohen y

cols., 2004; Frikke-Schmidt y cols., 2004).

Utilizando esta estrategia en población mexicana, Villarreal-Molina y colaboradores (2007) identificaron una variante con cambio de aminoácido en el gen ABCA1, particularmente en el grupo de sujetos con hipoalfalipoproteinemia; este cambio no sinónimo de una arginina por una cisteína en la posición 230 (R230C) de la proteína ABCA1 se sabe actualmente que es exclusivo de poblaciones nativas americanas (Acuña-Alonso y cols., 2010). Cabe mencionar que esta variante no había sido previamente encontrada en los GWAS, debido a que estos estudios se realizan principalmente en poblaciones de origen europeo, lo cual descarta la posibilidad de encontrar variantes exclusivas de poblaciones con origen nativo americano como la población mexicana. Es por ello que se necesitan emplear distintas estrategias o la combinación de las mismas para identificar variantes y genes asociados a los niveles de C-HDL en la población mexicana.

5.4 Estudios de expresión génica.

La variación en los niveles plasmáticos del C-HDL entre los individuos, puede ser en parte, resultado de la expresión diferencial de los genes (Cookson y cols., 2009). Se conoce poco del papel que tiene la expresión génica cuantitativa en la modulación de los niveles de C-HDL, así como de las variantes genéticas que afectan dicha expresión.

Existe un número limitado de estudios en los que se evalúa la relación que existe entre la expresión génica en leucocitos y los niveles plasmáticos de lípidos (Ma y cols., 2007; Göring y cols., 2007; Inouye y cols., 2010; Zeller y cols., 2010); estos estudios se han realizado en adultos, quienes presentan un mayor tiempo de exposición a factores ambientales, los cuales pueden modificar considerablemente la expresión génica (Dumitrescu y col., 2011). En el estudio de Ma y cols., se mostraron distintos patrones de expresión génica asociados a niveles de C-HDL, C-LDL y triglicéridos en 32 individuos

adultos. Los genes cuya expresión correlacionó significativamente con los niveles de C-HDL formaban parte de vías que involucraban principalmente respuesta inmune y rutas del metabolismo de lípidos, ácidos grasos o esteroides (Ma y cols., 2007).

Los análisis de expresión génica han revelado nuevos genes de susceptibilidad para las HDL; tal es el caso de un estudio en el que se identificaron 60 genes asociados a la variación de los niveles de C-HDL a través del análisis del transcriptoma completo en linfocitos de población adulta México-americana (Göring y cols., 2007). En este estudio se identificó el gen *VWV1*, cuya expresión correlacionó positiva y significativamente con los niveles de C-HDL.

Los niveles de expresión génica pueden ser modificados por la presencia de polimorfismos ubicados dentro de elementos de regulación y por lo tanto pueden ser mapeados como locus de rasgos cuantitativos de expresión (eQTLs, Expression quantitative trait loci). Los análisis de eQTLs evalúan los efectos de las variantes en el DNA como una medida de la expresión génica en una célula o un tejido (Weissglas-Volkov y Pajukanta, 2010). De manera interesante, en estos estudios se han identificados genes asociados al C-HDL que no habían sido previamente asociados a este rasgo por GWAS.

En el estudio realizado por Göring y colaboradores (2007), como se mencionó anteriormente, se identificó al gen *VWV1*, cuya expresión correlacionó de manera significativa con los niveles de C-HDL. En este estudio además, se encontró una variante ubicada en el promotor de *VWV1*, la variante G-137T (rs4897612), la cual corresponde a un cambio de una guanina (G) por una timina (T) en la posición 137 río arriba del inicio de la transcripción del gen *VWV1*. A través de un ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) se observó que se formaban distintos complejos entre el DNA y los factores de transcripción dependiendo del alelo presente, es decir, la formación de estos complejos era alelo-específica; asimismo, en un análisis bioinformático se encontró que este cambio se ubicaba dentro de un elemento de respuesta para el factor

de transcripción Sp1 y que la presencia de la variante disminuía la afinidad de la región.

El gen *VNN1* codifica para Vanina 1, una proteína perteneciente a la familia vanina (Vascular Non-Inflammatory Molecule), la cual está constituida por tres proteínas que presentan una alta similitud en su secuencia. *VNN1* se ubica junto con *VNN2* y *VNN3* en una región de 80 kb en el cromosoma 6q23-6q24 (Galland y cols., 1998; Martin y cols., 2001) y consta de 7 exones. *VNN1* se expresa en bazo, timo, ganglios linfáticos, leucocitos de sangre periférica, uretra, riñón, hígado e intestino (Galland y cols., 1998; Jansen y cols., 2009). Vanina 1 tiene un peso molecular de 57 kD y consta de 513 aminoácidos.

Hasta el momento se desconoce el papel que tiene Vanina 1 en la regulación de los niveles de C-HDL, sin embargo, se sabe que esta proteína tiene actividad de panteteinasa, es decir, escinde la panteteína en ácido pantoténico (vitamina B5) y cisteamina, un potente antioxidante que previene la peroxidación de lípidos (Maras y cols., 1999; Kaskow y cols., 2012). Existe solo un estudio en ratones donde se reportó a *VNN1* asociado a la presencia de obesidad, formando parte de una red genética generada a partir de datos de expresión en hígado, en la cual fue considerado como un gen causal para esta enfermedad (Schadt y cols., 2005).

Aún cuando el gen *VNN1* parece ser importante en la modulación de los niveles de C-HDL, hasta el momento no existen estudios en otras poblaciones que permitan confirmar su impacto en la regulación de los niveles de C-HDL.

II.- JUSTIFICACIÓN

La población mexicana presenta una alta prevalencia de niveles bajos de C-HDL, condición conocida como hipoalfalipoproteinemia; esta dislipidemia está presente en nuestra población desde la infancia y es una característica frecuente en individuos con diabetes o síndrome metabólico, condiciones asociadas a un riesgo cardiovascular aumentado.

Los niveles plasmáticos de C-HDL son regulados por factores ambientales y factores genéticos, contribuyendo estos últimos entre un 50 a un 70%. A la fecha se han utilizado diversas estrategias para identificar genes que modulen los niveles de C-HDL; sin embargo, los genes identificados explican alrededor del 25% del componente genético de este rasgo.

Poco se sabe del papel que tiene la expresión génica global en la modulación de los niveles de C-HDL; los escasos estudios en esta área se han realizado en población adulta, quienes presentan una mayor variabilidad en la exposición a factores ambientales que pudieran afectar los niveles de expresión. El análisis de la expresión génica en grupos de niños con niveles extremos de C-HDL, podría ser útil para identificar genes con una contribución importante en la modulación de los niveles de esta lipoproteína.

En los estudios previos donde se ha analizado la relación entre la expresión génica global y los niveles de C-HDL, se han podido identificar genes que previamente no habían sido asociados a este rasgo mediante GWAS; un ejemplo de ello es el gen *VAV1*, cuya expresión mostró una correlación significativa con los niveles de C-HDL en población adulta México-americana. Aún cuando no existe evidencia directa del papel de Vanina 1 en la regulación de los niveles de C-HDL, se ha reportado que esta proteína codifica para una panteteinasa, que produce cisteamina, un potente antioxidante que previene la peroxidación de lípidos. Estos hallazgos en conjunto permiten considerar a

VWV1 como un gen candidato para la modulación de los niveles de C-HDL y otros rasgos metabólicos.

A la fecha no existen estudios de expresión génica global asociada al C-HDL en población infantil, por lo cual la evaluación de su participación en una muestra de población mexicana en esta etapa de la vida es de gran relevancia. Asimismo, la correlación de la expresión de *VWV1* con los niveles de C-HDL reportada en adultos México-americanos no ha sido replicada en otra población y por ello resulta importante analizar el papel de este gen en la modulación del C-HDL en una muestra de población infantil mexicana.

III- HIPOTESIS

La variación de la expresión génica se asocia a los niveles de C-HDL en la población infantil mexicana.

IV.- OBJETIVOS

1. Objetivo general.

Identificar genes asociados a la variación de los niveles de C-HDL a través del análisis de expresión génica en población infantil mexicana.

2. Objetivos particulares.

- Realizar un análisis de expresión génica global mediante microarreglos en dos grupos con niveles extremos de C-HDL; identificar los genes con expresión diferencial significativa y analizar por PCR en tiempo real los genes sobreexpresados y subexpresados con mayor significancia estadística en los microarreglos.
- Replicar en una muestra de población general el gen cuya expresión haya sido diferencial y más significativa en los microarreglos y por PCR en tiempo real, así como secuenciar el promotor de este gen e identificar variantes que se asocien a los niveles de expresión del mismo, a los niveles de C-HDL y a diversos parámetros bioquímicos.
- Determinar la asociación de la expresión del gen *VWV1* y de la variante G-137T con los niveles de C-HDL y diversos parámetros bioquímicos en una muestra de población infantil.

V.- METODOLOGÍA

1. Población de estudio: grupos con niveles extremos de C-HDL.

Se seleccionaron 18 niños a partir de una muestra de 1000 participantes de las Convivencias infantiles de Verano 2008 y 2009 organizadas para los hijos de los trabajadores de la Secretaría de Salud, para formar dos grupos de estudio con base en los valores de C-HDL: un grupo de 9 niños con niveles de C-HDL por debajo del percentil 10 (hipoalfalipoproteinemia, HipoA) y un segundo grupo de 9 niños con C-HDL por arriba del percentil 90 (hiperalfalipoproteinemia, HiperA). Los valores de los percentiles del C-HDL se determinaron por edad y género. Los niños de ambos grupos se parearon por edad, género e IMC. Los criterios de selección para estos grupos fueron: ser mexicano, edad de 6 a 10 años, glucosa en ayuno <110 mg/dL, triglicéridos <150 mg/dL y presentar un IMC normal (sin sobrepeso ni obesidad) de acuerdo a los criterios de la Encuesta Nacional de Salud del 2006 (ENSANUT, 2006). El tamaño de muestra calculado para un poder estadístico del 80% fue de 7 niños por cada grupo (Yang y cols, 2003).

2. Extracción de RNA para microarreglos.

La extracción de RNA se realizó a partir de los leucocitos utilizando el método de isotiocianato de guanidina y fenol-cloroformo. Para eliminar los residuos de DNA, se hizo un tratamiento con DNasa (Roche) e inhibidor de RNasa (Roche) y se llevó a cabo una reextracción con el método anteriormente mencionado. Se determinó la integridad del RNA utilizando RNA 6000 NanoChips y un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies), el cual, con base en las características de las señales producidas en un electroferograma de las subunidades 18S y 28S del RNA, calcula un valor de RIN (RNA integrity number); este parámetro debe tener un valor mayor o igual a 8 para considerar que la muestra tiene la calidad suficiente para ser sometida al análisis por microarreglos (Agilent application note, Agilent Technologies).

3. Análisis de la expresión génica mediante microarreglos.

3.1 Microarreglos.

Los perfiles de expresión de los 18 niños se obtuvieron utilizando microarreglos GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix). Este microarreglo contiene sondas para el estudio de aproximadamente 28,869 genes, con un promedio de 26 sondas de 25 oligonucleótidos de longitud para cada gen. El diseño de este chip está basado en las secuencias de genes contenidas en las siguientes bases de datos: Human Genome Sequence de la Universidad de Santa Cruz de California (UCSC), RefSeq NM, GenBank y Ensembl Genome (Gene Chip Package insert, Affymetrix). Este análisis se realizó en la plataforma de Affymetrix en la Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

A continuación se describe en breve la técnica empleada para los microarreglos. Se partió de una concentración inicial de aproximadamente 1 μg de RNA de cada muestra. Se prepararon controles poliadenilados (controles Poly-A); el RNA se convirtió en DNA complementario de una hebra (cDNA) y posteriormente se llevó a cabo la síntesis de la segunda hebra de cDNA. Se realizó una transcripción *in vitro* para generar RNA complementario (cRNA); se purificó y se cuantificó el cRNA producido. Se sintetizó nuevamente cDNA y se hidrolizó el cRNA restante con RNasa H. Se purificó el cDNA obtenido y se cuantificó; posteriormente se fragmentó el cDNA hasta obtener fragmentos de 40-70 pares de bases (pb). Se hizo el marcaje del cDNA y la hibridación de las muestras en los microarreglos durante 16 horas a 45°C en un horno de hibridación (Affymetrix Gene Chip hybridization oven). Después de la hibridación, se lavaron los microarreglos en la estación de fluidos (Affymetrix GeneChip Fluidics station FS 450) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los microarreglos se escanearon utilizando el sistema Affymetrix Gene Chip scanner 3000 7G.

3.2 Análisis estadístico de los microarreglos.

El análisis estadístico de los microarreglos se realizó con el programa Partek Genomics Suite (PartekGS), el cual proporciona los valores corregidos de expresión con base en la señal de fondo. Las diferencias entre la expresión de los genes del grupo de HiperA vs el grupo de HipoA se analizaron a través de un análisis de varianza (ANOVA), tomando como referencia al grupo de niños con C-HDL alto y considerando una corrección por el número de genes analizados. Una vez que se obtuvieron estas diferencias, se seleccionaron los genes basándose en un número de veces de cambio (Fold Change; FC) menor a -1.5 en el caso de los genes subexpresados y un FC mayor a 1.5 para los genes sobreexpresados; para ambos casos se consideraron significativos aquellos genes con valores de $P < 0.05$.

Para evaluar si los genes que tuvieron expresión diferencial en los dos grupos analizados, forman parte de alguna red de interacción biológica conocida, se utilizaron los programas Reactome (<http://www.reactome.org>) y las herramientas para el análisis de datos de expresión de la base de datos Panther (<http://www.pantherdb.org>).

4. Validación de los resultados de los microarreglos mediante PCR en tiempo real.

Se analizaron por PCR en tiempo real los genes que en los microarreglos se expresaron diferencialmente y con una mayor significancia entre los dos grupos, con la finalidad de validar el resultado por una segunda técnica. Los genes subexpresados analizados por PCR en tiempo real fueron: *ROCK1*, *KIRS2DS2* y *TUBB2A* y los genes sobreexpresados analizados fueron: *ALKBH1*, *CD200R1*, *HRH4* y *CUBN*. Se utilizaron los pares de oligonucleótidos (Sigma-Aldrich) y las sondas (Roche) descritos en la Tabla suplementaria 1 y un termociclador LightCycler 2.0 (Roche). Se utilizó como gen constitutivo el gen de la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (*HPRT*) empleando los oligonucleótidos tgatagatccattcctatgactgtaga (forward), caagacattctttccagttaaagttg

(reverse) (Instituto de Biotecnología, UNAM) y la sonda #22 (cat. no. 04688961001, Roche); también se utilizó como gen constitutivo el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) utilizando los oligonucleótidos gctctctgctctctctgttc (forward), acgaccaaattccgttgactc (reverse) (Sigma-Aldrich), y la sonda #60 (cat. no. 04688589001, Roche). Otro gen que se analizó por PCR en tiempo real fue el gen *VNN1*, cuya expresión había sido previamente correlacionada con los niveles de C-HDL en población México-americana. Para el análisis de este gen se empleó la sonda #80 (cat. no. 04689038001, Roche) y los siguientes oligonucleótidos: tcctgaggtgttgctgagtg (forward) y agcgtccgtcagttgacac (reverse) (Instituto de Biotecnología, UNAM). Todos los ensayos mostraron linealidad y se obtuvo un coeficiente de variación interensayo menor al 10%. La cuantificación relativa de la expresión fue calculada con el software del equipo (LightCycler Software 4.0). La comparación de la expresión de los genes seleccionados en el grupo de HipoA vs el grupo de HiperA se realizó utilizando la prueba de U de Mann-Whitney.

5. Análisis de expresión de los genes *VNN1* y *CUBN* en población infantil.

5.1 Población de estudio.

Se analizaron 224 niños mexicanos mestizos (provenientes principalmente de la mezcla de población europea (española) y poblaciones nativas americanas), 107 niños y 117 niñas de 6 a 8 años de edad, captados durante la Convivencia Infantil de Verano 2008 para los hijos de los trabajadores de la Secretaría de Salud. Se tomó una muestra de sangre periférica, después de un periodo de ayuno de mínimo 8 horas. Se aplicó un cuestionario para conocer los antecedentes heredofamiliares y se midió el peso, la altura, la circunferencia de cintura y de cadera en todos los participantes. El índice de masa corporal (IMC) fue calculado dividiendo el peso en kilogramos entre el cuadrado de la altura en metros (Kg/m^2). El z-score del IMC se determinó de acuerdo a los criterios del Centro para el Control de Enfermedades y su Prevención (CDC, por sus

siglas en inglés) (Kuczmarski y cols., 2002). El porcentaje de grasa fue medido usando el método de impedancia bioeléctrica (Quantum X, bioelectrical impedance analyzer, RJL Systems). Ninguno de los participantes tenía evidencia de diabetes, enfermedades renales, tiroideas o hepáticas. El padre o tutor de cada participante firmó un consentimiento informado y el proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Biomédica en humanos del INCMNSZ.

Para el análisis del gen *CUBN* se estudiaron adicionalmente 243 niños, teniendo una muestra de población total de 467 niños mexicanos mestizos (225 niños y 242 niñas) de 6 a 13 años.

5.1.1 Determinación de parámetros bioquímicos y antropométricos.

Se determinaron los niveles de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), C-HDL y ApoA1 en el departamento de Endocrinología y Metabolismo de Lípidos del INCMNSZ, con métodos estandarizados y disponibles comercialmente como se describe en Villarreal-Molina y cols., 2007. Las características bioquímicas y antropométricas de la población total y estratificada por género para el análisis del gen *VWV1* se encuentran en la Tabla 4 y para el análisis del gen *CUBN* se encuentran en la Tabla 7. La hipoalfalipoproteinemia fue definida como C-HDL < 40 mg/dL, con base en los criterios establecidos por el Panel de Expertos en Instrucciones para la Salud Cardiovascular y Reducción del Riesgo en Niños y Adolescentes (Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents, 2011).

5.2 Extracción de RNA.

Se centrifugaron las muestras de sangre periférica durante 20 min a 2,200 rpm a temperatura ambiente. Se obtuvieron dos fases y se tomó la capa correspondiente a los leucocitos; se agregaron 750 μ L de TRIzol (Invitrogen, Life Technologies) y se

almacenaron a -70°C . Posteriormente, se extrajo el RNA total a partir de los leucocitos, utilizando el método de isotiocianato de guanidina y fenol-cloroformo. Para eliminar los residuos de DNA, se hizo un tratamiento con DNasa (Roche) e inhibidor de RNasa (Roche) y se hizo una reextracción con el método anteriormente mencionado. Se cuantificó el RNA obtenido utilizando un equipo NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 y se observó la integridad del RNA (bandas correspondientes a las subunidades 18S y 28S) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% previamente teñido con bromuro de etidio [$0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$], en amortiguador TAE 1X (Tris base, acetato, EDTA).

5.3 Análisis de la expresión del gen *VWV1*.

Para realizar el análisis de expresión, se sintetizó el cDNA a partir de $1\ \mu\text{g}$ de RNA total, mediante el kit TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems), utilizando hexámeros al azar y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador LightCycler 2.0 (Roche), empleando sondas TaqMan incluidas en la librería (Universal ProbeLibrary; Roche) y oligonucleótidos específicos diseñados para humano con el software proporcionado en la página del fabricante (https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_030000). Para el análisis de expresión del gen *VWV1* se empleó la sonda #80 (cat. no. 04689038001, Roche) y los siguientes oligonucleótidos: *tctgaggtgttgctgagtg* (forward) y *agcgtccgtcagttgacac* (reverse) (Instituto de Biotecnología, UNAM). Se utilizó como gen constitutivo el gen de la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (*HPRT*) empleando los oligonucleótidos *tgatagatccattcctatgactgtaga* (forward), *caagacattcttccagttaaagttg* (reverse) (Instituto de Biotecnología, UNAM) y la sonda #22 (cat. no. 04688961001, Roche); también se **utilizó como gen constitutivo el gen de la β -actina (*ACTB*)**, el cual se analizó mediante el ensayo Universal ProbeLibrary Human *ACTB* Gene (cat. no. 05046165001, Roche). Todos los ensayos mostraron linealidad y se obtuvo un coeficiente de variación interensayo menor al 10%. La cuantificación relativa de la expresión fue calculada con

el software del equipo (LightCycler Software 4.0).

Debido a que el estudio de Göring y colaboradores en donde se reportó previamente la correlación de los niveles de expresión del gen *VWV1* con los niveles de C-HDL se realizó en linfocitos y a que el presente estudio se hizo en leucocitos, se decidió evaluar si había cambios significativos en la expresión del gen *VWV1* debido al tipo celular analizado. Para esto, la expresión del gen *VWV1* se analizó también en linfocitos, en un número reducido de muestras (n=8). La extracción de los linfocitos se realizó con Lymphoprep (Axis-Shield) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se obtuvo el RNA de estas muestras y se sintetizó el cDNA mediante las técnicas previamente descritas. El análisis de la expresión del gen *VWV1* en estas muestras se realizó siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente para el análisis en leucocitos.

5.4 Extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó a partir de leucocitos de sangre total utilizando el kit QIAmp 96 DNA Blood kit (Qiagen), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se cuantificó el DNA utilizando un equipo NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 y se prepararon diluciones de 10 ng/mL para su uso posterior en los ensayos de genotipificación.

5.5 Genotipificación de la variante G-137T del promotor de *VWV1*.

Se genotipificó la variante G-137T (rs4897612) empleando el ensayo de sondas TaqMan con número de identificación C_29857881_10 (Applied Biosystems) y un termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). Se analizaron 30 muestras por secuenciación directa; no se observaron genotipos discordantes entre ambas técnicas.

Se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg para esta variante, utilizando la siguiente página: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>, no encontrando desviación del equilibrio en la población total ni en los niños y niñas por separado.

5.6 Genotipificación de 10 marcadores de ancestría.

Debido a que la población mexicana es mestiza, resultado de la mezcla principalmente de población europea (española) y poblaciones nativas americanas, se consideró necesario evaluar si la ancestría era un posible factor confusor en las asociaciones encontradas. Para ello, se genotipificaron 10 marcadores de ancestría informativos (AIMs, por sus siglas en inglés): rs3340, rs1881826, rs2341823, rs4130405, rs1980888, rs1487214, rs726391, rs724729, rs292932 y rs1877751, que distinguen principalmente entre la ancestría de la población nativa americana y la población europea (Bonilla y cols., 2004; Martínez-Marignac y cols., 2007; Martínez-Fierro y cols., 2009). La diferencia entre la frecuencia del alelo menor de cada uno de estos marcadores en las dos poblaciones parentales (δ) fue mayor a 0.29.

La genotipificación de estos marcadores se realizó utilizando sondas TaqMan (Applied Biosystems) y un termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). No se observaron genotipos discordantes en 48 muestras duplicadas. Ninguno de los marcadores de ancestría analizados presentó desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg.

5.7 Análisis de la expresión del gen *CUBN*.

El análisis de expresión del gen *CUBN* se realizó utilizando los oligonucleótidos y las sondas descritas en la Tabla suplementaria 1. Se utilizó como gen constitutivo el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) utilizando los oligonucleótidos

gctctctgctcctcctgttc (forward), acgaccaaatccgttgactc (reverse) (Sigma-Aldrich), y la sonda #60 (cat. no. 04688589001, Roche). Todos los ensayos mostraron linealidad y se obtuvo un coeficiente de variación interensayo menor al 10%. La cuantificación relativa de la expresión fue calculada con el software del equipo (LightCycler Software 4.0).

5.8 Secuenciación de la región promotora del gen *CUBN*.

Se secuenció aproximadamente 1 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *CUBN* en los 18 niños analizados por microarreglos. Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados para cubrir la región con productos de PCR de un promedio de 350 pb por fragmento, utilizando el programa FastPCR 6.2 (Tabla suplementaria 2). Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y se usaron como templado de las reacciones de secuenciación utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) en un secuenciador automatizado ABI 3100 de acuerdo al protocolo del fabricante (Applied Biosystems).

5.8.1 Genotipificación de la variante T-405A del promotor de *CUBN*.

Se genotipificó la variante T-405A (rs75701468) con sondas TaqMan fabricadas bajo diseño (Applied Biosystems) y un termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). Se analizaron 38 muestras por secuenciación directa; no se observaron genotipos discordantes entre ambas técnicas. Se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg para esta variante, utilizando la siguiente página: <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>, no encontrando desviación del equilibrio en la población total ni en los niños y niñas por separado.

5.9 Análisis estadístico.

Considerando que se ha reportado que la expresión génica, los niveles de C-HDL y el efecto de algunos polimorfismos sobre los rasgos metabólicos presentan diferencias con base en el género (Ellegren y cols., 2007; Weiss y cols., 2006; Feitosa y cols., 2009; López-Simón y cols., 2009), todos los análisis se realizaron en la muestra completa y estratificados por género. Se analizaron las diferencias entre los parámetros bioquímicos y antropométricos de los niños y las niñas, utilizando una prueba de t de Student.

Los niveles de triglicéridos, los niveles de expresión del gen *VNN1* y del gen *CUBN* fueron transformados a logaritmo debido a que no presentaban una distribución normal. Las correlaciones entre la expresión del gen *VNN1* y del gen *CUBN* y los parámetros metabólicos de acuerdo al género fueron analizadas utilizando una prueba de correlación de Pearson. El análisis de las correlaciones de la expresión de *VNN1* y de *CUBN* con los parámetros metabólicos ajustado por ancestría se realizó mediante una correlación parcial.

Las diferencias entre los parámetros antropométricos y bioquímicos de acuerdo al genotipo de la variante G-137T y de la variante T-405A fueron analizadas mediante regresiones lineales ajustando por el z-score del IMC cuando se requería. La asociación del genotipo de la variante G-137T y de la variante T-405A con los parámetros bioquímicos fue analizada utilizando el modelo aditivo, el modelo dominante y el modelo recesivo, siendo este último el modelo con valores de *P* de asociación más significativos. La comparación de la expresión del gen *VNN1* entre los distintos genotipos de la variante G-137T y la comparación de la expresión de gen *CUBN* entre los distintos genotipos de la variante A-405T se realizó mediante una prueba de U de Mann-Whitney. La asociación de la variante T-405A con la hipoalfalipoproteinemia se analizó utilizando un análisis de regresión logística. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 15.0 (SPSS, Chicago IL); se consideró como significativo un valor de $P < 0.05$.

La estimación de la ancestría genética fue calculada a partir de los genotipos de los 10 marcadores informativos de ancestría, mediante el programa ADMIXMAP (Hoggart y cols, 2003). Considerando que la población mexicana es mestiza, es decir, es una mezcla principalmente de población nativa americana y población europea, el modelo que se utilizó en este programa incluyó dos poblaciones parentales.

Todos los análisis fueron ajustados por mezcla étnica y por el z-score del IMC cuando se consideró necesario. Se realizó también un análisis por múltiples comparaciones; primero se determinó la correlación promedio por pares para todas las variables (6 variables, correlación=0.38 para el gen *VNN1*; 6 variables, correlación=0.35 para el gen *CUBN*) y utilizando estas correlaciones se calculó la corrección por Bonferroni empleando un programa disponible en internet (Simple Interactive Statistical Analyses Software; <http://www.quantitativeskills.com/sisa/>). Los valores de *P* menores a 0.017 fueron considerados significativos para el análisis del gen *VNN1* y los valores de *P* menores a 0.016 fueron considerados significativos para el análisis del gen *CUBN*. Se estimó el poder estadístico para detectar la asociación de la variante G-137T con los niveles de C-HDL utilizando el programa QUANTO (<http://hydra.usc.edu/GxE/>), el cual fue de 82.8%, asumiendo un modelo recesivo con una frecuencia del alelo menor (T) de 0.35, un valor de beta para el C-HDL de -6.19 (Error estándar=2.20) y un tamaño de muestra de 224 individuos. El cálculo del poder estadístico también se realizó por género, obteniendo que para los niños fue de 53.5% y para las niñas de 54.1%. El poder estadístico para detectar la asociación de la variante T-405A con los niveles de C-HDL fue de 20.7%, asumiendo un modelo recesivo con una frecuencia del alelo menor (A) de 0.304, un valor de beta para el C-HDL de -2.26 (Error estándar=2.00) y un tamaño de muestra de 462 individuos; para los niños fue de 12.3% y para las niñas de 13.0%.

VI.- RESULTADOS

6.1 Estudio de la expresión génica mediante microarreglos.

- Características de los grupos con niveles extremos de C-HDL.

Las características antropométricas y bioquímicas de los niños que integran ambos grupos se encuentran en la Tabla 1. Se observa que no existen diferencias significativas entre las medias de los parámetros antropométricos y bioquímicos del grupo con C-HDL bajo y las del grupo con C-HDL alto, a excepción de los niveles de C-HDL, los cuales son significativamente más altos en el grupo HiperA, y el colesterol total (CT), el cual también es más alto en este grupo.

Tabla 1. Parámetros antropométricos y bioquímicos de los niños analizados por microarreglos

Características	Grupo con C-HDL bajo (HipoA) n=9	Grupo con C-HDL alto (HiperA) n=9	<i>P</i> ^a
Edad, años	8.1 ± 1.3	8.1 ± 1.3	0.963
Género H/M	5/4	5/4	-
z-score del IMC	-0.5 ± 0.6	-0.8 ± 1.5	0.555
% de grasa	22.6 ± 6.2	19.7 ± 8.3	0.412
Glucosa en ayuno, mg/dL	87.8 ± 4.5	89.4 ± 7.0	0.558
C-HDL, mg/dL	29.8 ± 5.4	76.4 ± 6.4	1.5x10 ⁻¹¹
TG, mg/dL	80.4 ± 34.8	70.6 ± 21.7	0.480
CT, mg/dL	139.7 ± 25.8	204.4 ± 43.7	0.001
C-LDL, mg/dL	93.8 ± 22.6	113.9 ± 36.1	0.176

Datos representados por medias ± DE. IMC: índice de masa corporal; C-HDL: colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; CT: colesterol total; C-LDL: colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad. ^aValores de *P* calculados con prueba de t de Student.

El análisis de microarreglos en los grupos HipoA e HiperA identificó 41 genes subexpresados significativamente, de los cuales 14 tenían funciones conocidas (Tabla suplementaria 3). De igual manera, se identificaron 37 genes sobreexpresados significativamente, 18 con función conocida (Tabla suplementaria 4). En la Figura 2 se

muestran los patrones de expresión obtenidos en los sujetos con C-HDL bajo y C-HDL alto.

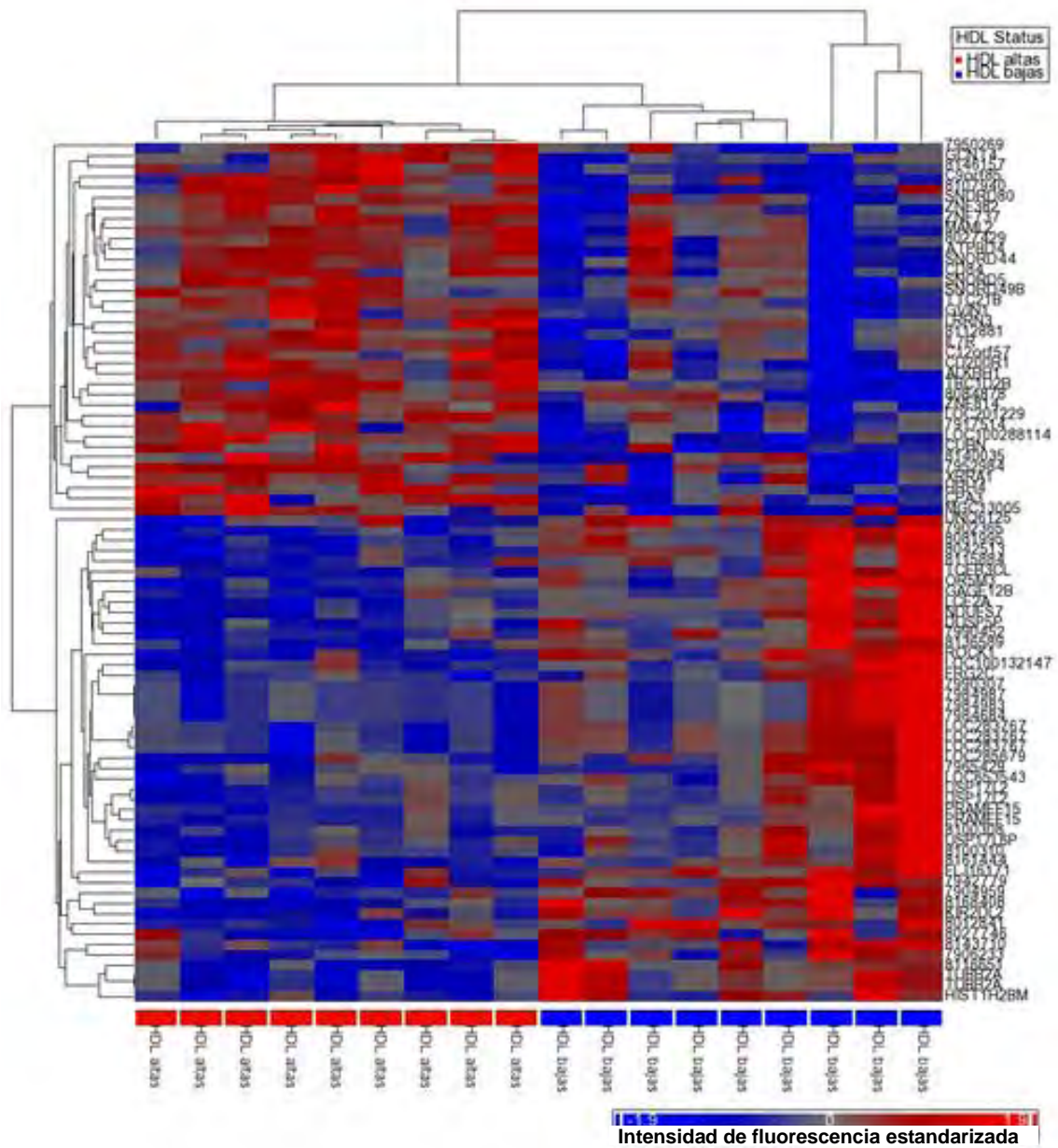


Figura 2. Mapa de calor mostrando la correlación entre los niveles de expresión de los genes y la clasificación de las muestras con base en los niveles de C-HDL: HDL altas (HipoA) en rojo vs HDL bajas (HipoA) en azul. Las filas representan genes identificados por los nombres ubicados a la derecha de la figura; las columnas representan las muestras de los individuos analizados. Los niveles de expresión presentan una intensidad de fluorescencia estandarizada: desde 0 a -1.9 (en azul) indica subexpresión y de 0 a 1.9 (en rojo) representa sobreexpresión del gen. Este mapa de calor contiene también dos dendogramas (estructuras tipo árbol), mostrados en la parte superior y a la izquierda del mapa de calor. Los dendogramas proporcionan información cualitativa acerca de la similitud entre los genes y entre las muestras de individuos analizados. Este análisis se realizó con el software Partek Genomics Suite (PartekGS).

Los genes subexpresados y sobreexpresados con valores de P más significativos en los microarreglos se muestran en la Tabla 2. Se observa que estos genes tienen funciones diversas, como daño vascular, respuesta inmune, estructural, reparación de ácidos nucleicos y catabolismo de las HDL (Montefusco y cols., 2010; Saulquin y cols., 2003; Cherwinski y cols., 2005; Bhatt y cols., 2010; Westbye y cols., 2008; Kozyraki y cols., 1999; Hammad y cols., 1999).

De manera interesante, el gen *VWV7*, cuya expresión había sido asociada previamente a los niveles de C-HDL en población México-americana (Göring y cols., 2007), no presentó una expresión diferencial significativa entre los grupos con niveles extremos de C-HDL analizados en los microarreglos ($P=0.452$).

- Análisis de redes de interacción biológica.

Los valores de FC de los genes que tuvieron expresión diferencial y significativa en los dos grupos de niveles de C-HDL (Tablas suplementarias 3 y 4) fueron analizados en el programa Reactome y en las herramientas de análisis de la base de datos Panther. Los resultados obtenidos en ambos programas señalan que las proteínas codificadas por estos 32 genes no forman parte de una red de interacción biológica conocida.

Tabla 2. Genes con valores de *P* más significativos en el análisis de microarreglos

	ID de Affymetrix	Cromosoma	Símbolo del gen	Gen	Función	FC	<i>P</i>*
<i>Genes subexpresados</i>	8019804	18	<i>ROCK1P1</i>	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 pseudogene 1	Daño Vascular	-2.02	0.000154
	8031344	19	<i>KIR2DS2</i>	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 2	Respuesta Inmune	-1.70	0.000226
	8116649	6	<i>TUBB2A</i> <i>TUBB2B</i>	Tubulin, beta 2A Tubulin, beta 2B	Estructural; formación de microtúbulos	-1.65	0.000833
<i>Genes sobreexpresados</i>	7980454	14	<i>ALKBH1</i>	AlkB, alkylation repair homolog 1 (E. coli)	Reparación Ácidos Nucléicos	1.52	0.000100
	8089568	3	<i>CD200R1</i>	CD200 receptor 1	Respuesta Inmune	1.51	0.000706
	8020684	18	<i>HRH4</i>	Histamine receptor H4	Respuesta Inmune	1.60	0.000756
	7932326	10	<i>CUBN</i>	Cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	Receptor de múltiples ligandos (HDL)	1.51	0.001165

FC: Fold Change (número de veces de cambio); * Valor de *P* calculado con prueba de ANOVA.

- Validación de los resultados de los microarreglos mediante PCR en tiempo real.

Se analizaron por PCR en tiempo real los genes expresados diferencialmente y con mayor significancia en los grupos de niños con niveles extremos de C-HDL (Tabla 3). Se observa que de los 7 genes analizados, solo *HRH4* y *CUBN*, ambos en el grupo de genes sobreexpresados, replicaron el resultado obtenido en los microarreglos, es decir, se expresaron más en el grupo de HipoA ($P=0.039$ y $P=0.009$, respectivamente).

Tabla 3. Análisis por PCR en tiempo real de los genes con mayor significancia en los microarreglos

	Expresión gen- <i>GAPDH</i>	C-HDL bajo, HipoA (n=7)	C-HDL alto, HiperA (n=9)	<i>P</i> *
<i>Genes subexpresados</i>	<i>ROCK1</i>	0.0980 ± 0.0066	0.0964 ± 0.0221	0.970
	<i>KIRS2DS2</i>	0.0237 ± 0.0165	0.0272 ± 0.0140	0.874
	<i>TUBB2A</i>	0.0608 ± 0.0414	0.0479 ± 0.0415	0.491
<i>Genes sobreexpresados</i>	<i>ALKBH1</i>	0.0036 ± 0.0015	0.0039 ± 0.0008	0.186
	<i>CD200R1</i>	0.0355 ± 0.0137	0.0336 ± 0.0096	0.874
	<i>HRH4</i>	0.0007 ± 0.0005	0.0012 ± 0.0004	0.039
	<i>CUBN</i>	0.0039 ± 0.0027	0.0068 ± 0.0022	0.009

Los datos son medias ± DE. *Valor de *P* calculado con prueba de U de Mann-Whitney.

El gen *VNN1* también se analizó por PCR en tiempo real; al igual que en los microarreglos, no se observaron diferencias significativas entre la expresión de este gen en el grupo con niveles bajos de C-HDL vs el grupo con niveles altos ($P=0.617$). Aún cuando este gen no se asoció a los niveles de C-HDL bajo la estrategia de estudiar grupos con niveles extremos de este parámetro, considerando que fue el gen que presentó la correlación con los niveles de C-HDL más significativa en población general México-americana (Göring y cols., 2007), se decidió analizar su participación en la modulación de los niveles de C-HDL en población infantil, una población cuya exposición a factores ambientales que pueden afectar la expresión, ha sido menor en comparación con los adultos (Brown y cols., 2003; Dumitrescu y col., 2011).

6.2 Análisis de la expresión del gen *VNN1*.

Las características bioquímicas y antropométricas de la población analizada se encuentran en la Tabla 4. El 20% de los niños presentó hipoalfalipoproteinemia. El porcentaje de grasa fue significativamente mayor en las niñas ($P=0.041$); sin embargo, no se observaron diferencias significativas por género en el z-score del IMC o en los

parámetros lipídicos.

Tabla 4. Parámetros bioquímicos y antropométricos de acuerdo al género de la población de estudio del gen *VWV1*

Característica	Población total (224)	Niños (107)	Niñas (117)	<i>P</i> ^a
Edad, años	7.73 ± 0.97	7.84 ± 0.97	7.63 ± 0.96	0.194
z-score del IMC	0.99 ± 0.98	1.0 ± 1.0	0.98 ± 0.97	0.846
% de grasa	30.03 ± 10.52	28.37 ± 11.60	31.52 ± 9.25	0.041
TG, mg/dL	98.03 ± 59.09	90.95 ± 50.38	104.50 ± 65.62	0.087
CT, mg/dL	175.83 ± 31.39	173.36 ± 29.90	178.09 ± 32.66	0.261
C-HDL, mg/dL	48.58 ± 10.56	49.15 ± 10.36	48.06 ± 10.75	0.442
ApoA1, mg/dL	168.52 ± 21.74	171.08 ± 20.57	166.40 ± 22.53	0.120
HA (%)	19.6	16.8	22.2	0.310 ^b

Los datos son medias ± DE ó n (%). IMC, índice de masa corporal; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; C-HDL, colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad; HA, hipoalfalipoproteinemia. ^aValor de *P* calculado con prueba de *t*; ^b Valor de *P* calculado con prueba de χ^2 .

Los niveles de expresión del gen *VWV1* no correlacionaron con los niveles de C-HDL de manera significativa en la población total estudiada; sin embargo, mostraron una correlación negativa y significativa con el z-score del IMC y con los niveles de TG ($P=0.032$ y $P=0.026$, respectivamente) (Tabla 5).

Tabla 5. Correlación de los niveles de expresión de *VWV7* en leucocitos con los fenotipos metabólicos.

Fenotipos metabólicos	Población total (n=224)			Niños (n=107)			Niñas (n=117)		
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>P^a</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>P^a</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>P^a</i>
z-score del IMC	-0.144	0.032	0.034	-0.062	0.528	0.518	-0.225	0.015	0.015*
% de grasa	-0.118	0.080	0.085	-0.068	0.490	0.525	-0.145	0.118	0.119
TG, mg/dL	-0.149	0.026	0.028	-0.062	0.525	0.576	-0.208	0.025	0.023
CT, mg/dL	-0.056	0.402	0.396	-0.047	0.631	0.643	-0.051	0.586	0.586
C-HDL, mg/dL	0.086	0.198	0.211	-0.071	0.465	0.448	0.220	0.017	0.017
ApoA1, mg/dL	0.042	0.546	0.566	-0.106	0.308	0.308	0.129	0.170	0.175

IMC, índice de masa corporal; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; C-HDL, colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad I. ^aValores de *P* ajustados por ancestría. *Valores de *P* significativos después de la corrección por Bonferroni.

Al hacer el análisis estratificado por género, sólo en las niñas se observó una correlación positiva de los niveles de expresión de *VWV7* con los niveles de C-HDL (*P*=0.017) y correlaciones negativas y significativas con el z-score del IMC y con los niveles de TG (*P*=0.015 y *P*=0.025, respectivamente).

Considerando que la población mexicana es mestiza, resultado de la mezcla principalmente entre población europea y nativa americana, se decidió evaluar la ancestría de los niños estudiados mediante la genotipificación de 10 marcadores e incluirla en los análisis como un posible factor confusor. El análisis de estos marcadores con el programa ADMIXMAP estimó las proporciones medias de mestizaje: el 65% del componente étnico de los niños corresponde a la población nativa americana y el 35% a la población europea. Todas las correlaciones de los niveles de expresión del gen *VWV7* con los distintos parámetros metabólicos analizados, permanecieron significativas después del ajuste por ancestría. Al realizar una corrección por Bonferroni, solo la correlación de los niveles de expresión de *VWV7* con el z-score del IMC obtenida en las

niñas permaneció significativa ($P=0.015$) (Tabla 5).

Se realizó el análisis de expresión del gen *VWV1* en los leucocitos y en los linfocitos de un pequeño grupo de niños ($n=8$). Al comparar los resultados de expresión de *VWV1* utilizando dos genes constitutivos (*HPRT* y β -actina) en leucocitos vs en linfocitos, no hubo diferencias significativas ($P=0.170$ y $P=0.448$, respectivamente). Al analizar la correlación de la expresión del gen *VWV1* con los parámetros metabólicos, pudimos observar que para ambos tipos celulares se obtuvieron resultados similares: una tendencia de correlación negativa para los triglicéridos ($p=0.125$ en leucocitos y $p=0.103$ en linfocitos). Esto nos muestra que los resultados obtenidos en leucocitos y linfocitos son similares.

- Variante G-137T y su asociación a los niveles de expresión del gen *VNN1* y a distintos parámetros metabólicos.

La frecuencia del alelo T de la variante G-137T fue de 35% en la población total. El genotipo TT se asoció de manera significativa con niveles de expresión de *VWV1* más bajos comparando con los portadores del alelo G en una o dos copias ($P=2.9 \times 10^{-5}$ después de ajustar por ancestría) (Figura 3). Se realizaron análisis de regresión lineal múltiple para evaluar cuales variables podían predecir los niveles de expresión del gen *VWV1*, encontrando que sólo el genotipo TT contribuyó de manera independiente a la explicación del 4.8% de la variación de los niveles de expresión del gen *VWV1* ($P=0.004$).

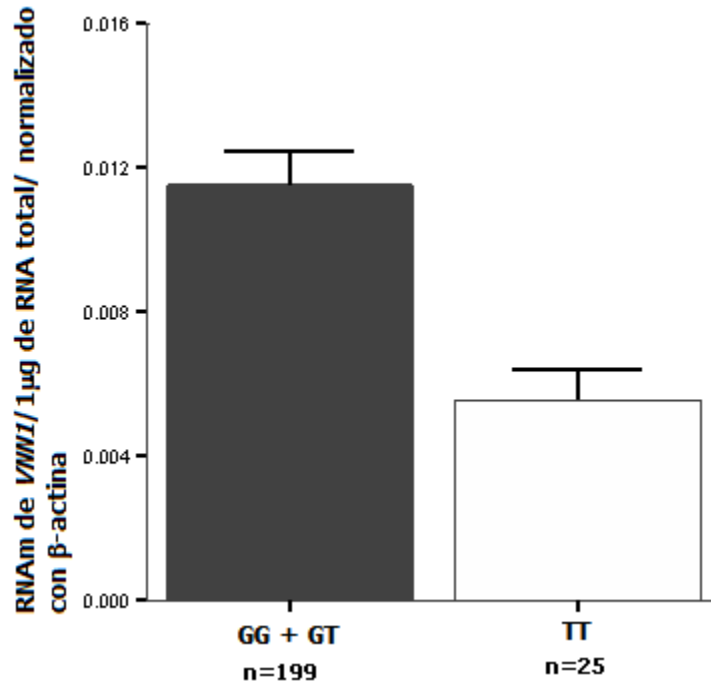


Figura 3. Efecto de la variante G-137T sobre los niveles de expresión del gen *VMI* en niños mexicanos prepúberes. Las barras representan las medias \pm el error estándar.

El genotipo TT además se asoció con niveles más bajos de C-HDL y de ApoA1 ($P=0.005$ y $P=0.044$, respectivamente) y con un mayor z-score del IMC, un mayor porcentaje de grasa y niveles más altos de TG y CT en la población total ($P<0.05$, Tabla 6). Después de ajustar por el z-score del IMC y por la ancestría, sólo las asociaciones con el CT y el C-HDL permanecieron significativas en la muestra total ($P=0.034$ y $P=0.028$, respectivamente). En el análisis con estratificación por género, se observó una asociación significativa del genotipo TT con niveles más bajos de C-HDL exclusivamente en las niñas ($P=0.010$); esta asociación permaneció significativa después de la corrección por múltiples comparaciones (Tabla 6).

Tabla 6. Asociación de la variante G-137T con los parámetros metabólicos

Parámetros	Población total (n=224)			Niños (n=107)			Niñas (n=117)		
	Efecto (EE)	<i>P</i>	<i>P</i> ^a	Efecto (EE)	<i>P</i>	<i>P</i> ^a	Efecto (EE)	<i>P</i>	<i>P</i> ^a
z-score del IMC	0.48 (0.21)	0.024	0.024	0.69 (0.36)	0.061	0.063	0.38 (0.26)	0.146	0.156
% de grasa	5.66 (2.25)	0.012	0.012*	6.45 (4.24)	0.131	0.123	4.56 (2.46)	0.067	0.072
TG, mg/dL	25.76 (12.45)	0.040	0.194	-1.65 (17.63)	0.926	0.371	39.53 (17.34)	0.024	0.079
CT, mg/dL	16.35 (6.58)	0.014	0.034	10.64 (10.41)	0.309	0.423	18.93 (8.64)	0.031	0.057
C-HDL, mg/dL	-6.19 (2.20)	0.005	0.028	-2.10 (3.62)	0.562	0.994	-8.47 (2.80)	0.003	0.010*
ApoA1 mg/dL	-9.66 (4.77)	0.044	0.093	-5.95 (8.72)	0.497	0.969	-12.44 (5.98)	0.040	0.093

Los valores del efecto representan el efecto de dos copias del alelo T (modelo recesivo), error estándar (SE). Frecuencias genotípicas: todos los niños (GG, 41.1%; GT, 47.7%; TT, 11.2%); niños (GG, 42.1%; GT, 49.5%; TT, 8.4%); niñas (GG, 40.2%; GT, 46.1%; TT, 13.7%). IMC, índice de masa corporal; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; C-HDL, colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad. ^aValores de *P* ajustados por ancestría en todas las pruebas y ajuste por z-score del IMC cuando era apropiado. *Valores de *P* significativos después de la corrección por Bonferroni.

6.3 Análisis de expresión del gen *CUBN* en una muestra de población infantil.

Para evaluar el impacto del gen *CUBN*, un gen candidato asociado previamente con el metabolismo de las HDL (Kozyraki y cols., 1999; Hammad y cols., 1999; Chen y cols., 2009; Peloso y cols., 2010), y que en el presente estudio mostró expresión diferencial y significativa en los grupos con niveles extremos de C-HDL tanto en el análisis por microarreglos como por PCR en tiempo real, se analizó inicialmente la muestra de población infantil (de 6 a 8 años) utilizada para el estudio de expresión del gen *VNN1*. En esta muestra, la expresión del gen *CUBN* correlacionó positiva y significativamente con los niveles de C-HDL ($r=0.201$; $P=0.004$). Al hacer el análisis ajustado por ancestría, esta correlación permaneció significativa ($P=0.005$). Dados los antecedentes de la relevancia de este gen en el metabolismo de las HDL y el hallazgo en este estudio de la correlación de su expresión con los niveles de este rasgo, se decidió evaluar la participación de este gen en la modulación de los niveles de C-HDL en una muestra mayor de población infantil, con un rango de edad más amplio (6 a 13 años), teniendo así una muestra de población constituida por 467 niños.

Las características bioquímicas y antropométricas de la población analizada se encuentran en la Tabla 7. El 28% de los niños presentó hipoalfalipoproteinemia. El porcentaje de grasa fue significativamente mayor en las niñas ($P=0.008$); sin embargo, no se observaron diferencias significativas por género en el z-score del IMC o en los parámetros lipídicos.

Tabla 7. Parámetros bioquímicos y antropométricos de acuerdo al género de la población de estudio del gen *CUBN*

Característica	Población total (467)	Niños (225)	Niñas (242)	<i>P</i> ^a
Edad, años	9.56 ± 2.05	9.59 ± 1.96	9.53 ± 2.13	0.745
z-score del IMC	0.91 ± 1.03	0.95 ± 1.10	0.86 ± 0.97	0.336
% de grasa	31.31 ± 11.11	29.86 ± 12.37	32.65 ± 9.64	0.008
TG, mg/dL	110.07 ± 64.71	106.06 ± 57.56	113.80 ± 70.62	0.197
CT, mg/dL	173.32 ± 32.78	173.00 ± 32.44	173.62 ± 33.16	0.841
C-HDL, mg/dL	47.73 ± 12.36	47.78 ± 12.43	47.69 ± 12.32	0.942
ApoA1, mg/dL	165.97 ± 26.31	168.49 ± 25.38	163.73 ± 26.97	0.056
HA (%)	27.6	28.9	26.4	0.555 ^b

Los datos son medias ± DE ó n (%). IMC, índice de masa corporal; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; C-HDL, colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad; HA, hipoalfalipoproteinemia. ^aValor de *P* calculado con prueba de *t*; ^b Valor de *P* calculado con prueba de χ^2 .

Los niveles de expresión del gen *CUBN* correlacionaron positivamente y de manera significativa con los niveles de C-HDL y de ApoA1 en la población total estudiada ($P=9.2 \times 10^{-5}$ y $P=3.9 \times 10^{-5}$, respectivamente); además mostraron una correlación negativa y significativa con los niveles de TG ($P=0.016$); sin embargo, esta correlación no permaneció significativa después de la corrección por múltiples comparaciones (Tabla 8).

Al hacer el análisis estratificado por género, solo en las niñas se observaron las correlaciones positivas y significativas de los niveles de expresión de *CUBN* con los niveles de C-HDL y los niveles de ApoA1 ($P=4.8 \times 10^{-5}$ y $P=1.7 \times 10^{-5}$, respectivamente). Estas asociaciones permanecieron significativas después de la corrección por múltiples comparaciones (Tabla 8).

Tabla 8. Correlación de los niveles de expresión de *CUBN* en leucocitos con los fenotipos metabólicos.

Fenotipos metabólicos	Población total (n=463)		Niños (n=222)		Niñas (n=241)	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
z-score del IMC	-0.058	0.211	-0.047	0.486	-0.078	0.228
% de grasa	-0.037	0.430	0.008	0.901	-0.071	0.272
TG, mg/dL	-0.111	0.016	-0.119	0.074	-0.096	0.135
CT, mg/dL	0.085	0.067	0.065	0.332	0.105	0.103
C-HDL, mg/dL	0.180	9.2x10 ⁻⁵ *	0.098	0.143	0.258	4.8x10 ⁻⁵ *
ApoA1, mg/dL	0.194	3.9x10 ⁻⁵ *	0.086	0.217	0.251	1.7x10 ⁻⁵ *

IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, Modelo de homeostasis para evaluar resistencia a la insulina; hs-CRP, proteína C-reactiva total de alta sensibilidad; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; C-HDL, colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad I. *Valores de *P* significativos después de la corrección por Bonferroni.

- Secuenciación de la región promotora del gen *CUBN*.

Se secuenciaron 1000 pb de la región promotora del gen *CUBN* en los 18 niños analizados por microarreglos, con el objetivo de buscar variantes posiblemente funcionales que se asociaran a los niveles de expresión del gen *CUBN*.

Se identificó un cambio de una T por una A en la posición -405 (T-405A; rs75701468); la Figura 4 muestra este cambio en un individuo heterocigoto. Esta variante se asoció de manera significativa a menores niveles de expresión de *CUBN* en los niños analizados por microarreglos con un valor de *P*=0.027 utilizando como gen constitutivo a β -actina y un valor de *P*=0.061 normalizando con *GAPDH*.

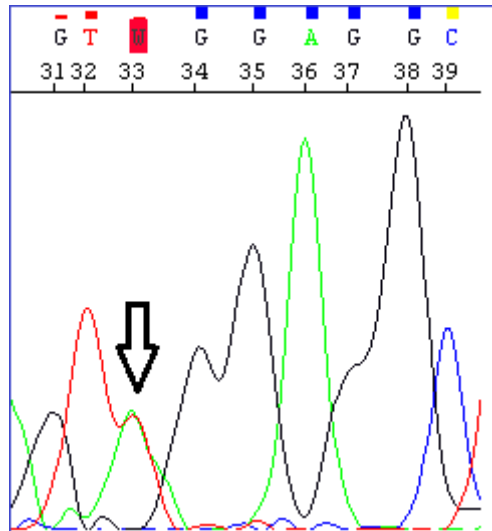


Figura 4. Electroferograma de un individuo heterocigoto para la variante T-405A. La flecha indica la presencia de 2 nucleótidos diferentes en la posición 405 río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *CUBN*. La curva roja indica la presencia de timina (T) en un alelo, y la curva verde superpuesta indica la presencia de adenina (A) en el otro alelo.

- Variante T-405A y su asociación a los niveles de expresión del gen *CUBN* y a distintos parámetros metabólicos.

La frecuencia del alelo A de la variante T-405A fue de 30.4% en la población total. El genotipo AA se asoció de manera significativa con niveles de expresión de *CUBN* más bajos comparando con los portadores del alelo T en una o dos copias ($P=2.5 \times 10^{-6}$) (Figura 5). Se realizaron análisis de regresión lineal múltiple para evaluar cuales variables podían predecir los niveles de expresión del gen *CUBN*, encontrando que sólo el genotipo AA contribuyó de manera independiente a la explicación del 4% de la variación de los niveles de expresión del gen *CUBN* ($P=0.001$).

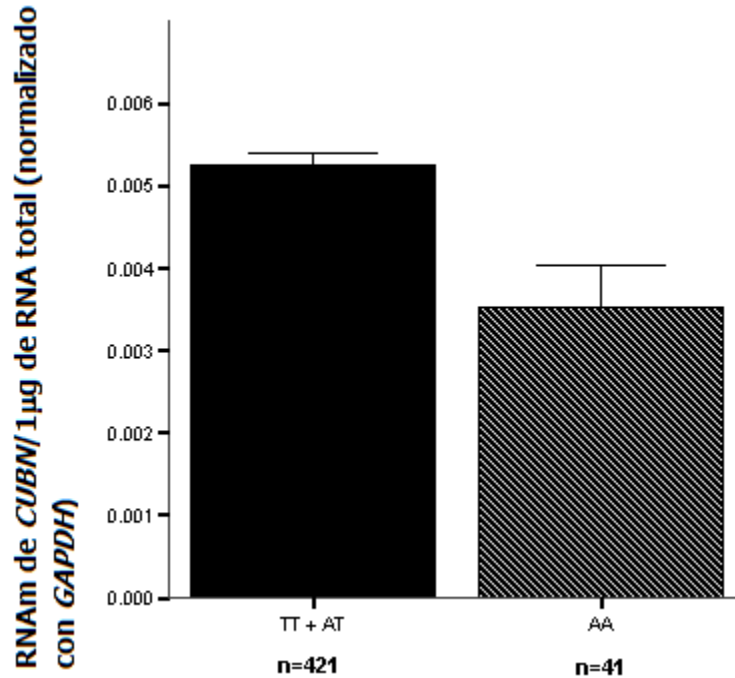


Figura 5. Efecto de la variante T-405A sobre los niveles de expresión del gen *CUBN* en niños mexicanos. Las barras representan las medias \pm el error estándar.

El genotipo AA no se asoció significativamente con los niveles de C-HDL en la población total, ni en los grupos estratificados por género (Tabla 9). Se encontró que tener el alelo AA está asociado a un riesgo de desarrollar hipoalfalipoproteinemia, con una razón de momios (RM) de 2.24 (IC 1.17-4.31) y un valor de $P=0.016$ en la población total. El análisis estratificado por género mostró que en los niños, la RM fue de 3.17 (IC 1.22-8.21; $P=0.018$) y en las niñas esta asociación no fue significativa ($P=0.290$).

Tabla 9. Asociación de la variante T-405A con los parámetros metabólicos

Parámetros	Población total (n=462)			Niños (n=223)			Niñas (n=239)		
	Efecto (EE)	<i>P</i>	<i>P</i> ^a	Efecto (EE)	<i>P</i>	<i>P</i> ^a	Efecto (EE)	<i>P</i>	<i>P</i> ^a
z-score del IMC	0.20 (0.17)	0.254	-	0.22 (0.27)	0.420	-	0.18 (0.22)	0.405	-
% de grasa	3.25 (1.83)	0.077	-	5.22 (3.01)	0.084	-	1.44 (2.17)	0.506	-
TG, mg/dL	10.48 (10.60)	0.323	0.561	24.86 (13.70)	0.071	0.132	-2.39 (15.88)	0.881	0.658
CT, mg/dL	1.11 (5.37)	0.836	0.789	-1.68 (7.81)	0.830	0.952	3.53 (7.42)	0.634	0.684
C-HDL, mg/dL	-2.26 (2.00)	0.261	0.529	-3.86 (2.97)	0.196	0.398	-0.84 (2.71)	0.756	0.935
ApoA1, mg/dL	-5.12 (4.41)	0.246	0.491	-5.18 (6.44)	0.422	0.873	-4.72 (6.03)	0.435	0.518

Los valores del efecto representan el efecto de dos copias del alelo A (modelo recesivo), error estándar (SE). Frecuencias genotípicas: todos los niños (TT, 48.0%; TA, 43.1%; AA, 8.9%); niños (TT, 44.9%; TA, 46.6%; AA, 8.5%); niñas (TT, 51.0%; TA, 39.8%; AA, 9.2%). IMC, índice de masa corporal; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; C-HDL, colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad. ^aValores de *P* ajustados por z-score del IMC cuando era apropiado.

VII.- DISCUSIÓN

La hipoalfalipoproteinemia es la dislipidemia más común en la población mexicana, tanto en los adolescentes como en los adultos (Posadas-Sánchez y cols., 2007; Aguilar-Salinas y cols., 2001). De igual manera, en la población de niños prepúberes estudiada también se observó la presencia de esta dislipidemia (20%), demostrando así que los niveles bajos de C-HDL están presentes desde la infancia en esta población. Esto concuerda con lo reportado por diversos estudios en los que se afirma que el establecimiento de las enfermedades metabólicas ocurre en la actualidad a edades más tempranas (Saland y cols., 2007; Nathan y cols., 2008); por ello, estos datos sugieren que desde la niñez se observa la presencia de diversos factores precursores del desarrollo de enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis, incluyendo los niveles bajos de C-HDL (Raitakari y cols., 2003; Magnussen y cols., 2009).

A la fecha existen pocos estudios en los que se ha mostrado que la variación en la expresión génica es probablemente un mecanismo importante en la regulación de los niveles de C-HDL (Göring y cols., 2007; Ma y cols., 2007; Zeller y cols., 2010; Inouye y cols., 2010). Es importante mencionar que estos estudios se han realizado en población adulta, la cual ha tenido un mayor tiempo de exposición a factores ambientales que pueden modificar sus patrones de expresión (Brown y cols., 2003; Dumitrescu y col., 2011). Es por esto que en el presente estudio, con el objetivo de identificar nuevos genes cuya expresión pudiera estar asociada a los niveles de C-HDL, se realizó un análisis de expresión génica en población infantil y además, se empleó la estrategia de estudiar grupos con fenotipos extremos; no existen estudios previos que conjunten estas dos estrategias.

El número de genes cuya expresión fue diferencial y estadísticamente significativa entre los dos grupos fue reducido (32 genes: 14 subexpresados y 18 sobreexpresados), comparado con el reportado en los estudios previamente

mencionados (Göring y cols., 2007; Ma y cols., 2007; Zeller y cols., 2010; Inouye y cols., 2010). Esto podría explicarse al menos en parte por el diseño del estudio, es decir, el análisis de grupos de niños con niveles extremos de C-HDL, pareados por edad, género e IMC y con valores de glucosa y triglicéridos normales, produjo que las escasas diferencias a nivel de expresión obtenidas en el microarreglo se debieran mayoritariamente al contraste en los niveles de C-HDL entre ambos grupos ($P=1.5 \times 10^{-11}$), excluyendo así diferencias de expresión causadas por posibles factores confusores como presencia de obesidad, diabetes e hipertrigliceridemia. Otro factor a considerar es que los grupos con niveles extremos de C-HDL estaban conformados por niños de 6 a 10 años, con un menor tiempo de exposición a factores ambientales y hormonales que los adultos, lo cual podría reducir también las diferencias de expresión observadas. Asimismo, en un estudio realizado en pares de gemelos monocigóticos de 3 y 50 años se reportó que los patrones de modificaciones epigenéticas divergen a medida que aumenta la edad, ya que los gemelos de 3 años eran prácticamente indistinguibles a nivel epigenético, mientras que en los pares de gemelos de 50 años se presentaban diferencias notables en la distribución genómica de la metilación y en la acetilación de histonas, afectando sus perfiles de expresión génica (Fraga y cols., 2005). Por lo tanto, el número reducido de genes con diferencias de expresión que se encontraron en el presente estudio, podría deberse también a que en la etapa infantil, no existen cambios importantes a nivel epigenético que modifiquen sustancialmente los perfiles de expresión.

Los genes que presentaron expresión diferencial y significativa en los microarreglos (Tablas Suplementarias 3 y 4) tienen funciones diversas: daño vascular (*ROCK1*, Montefusco y cols., 2010), respuesta inmune (*KIR2DS2*, Saulquin y cols., 2003; *CD200R1*, Cherwinski y cols., 2005), inflamación (*HRH4*, Bhatt y cols., 2010), reparación del DNA (*ALKBH1*, Westbye y cols., 2008) y particularmente *CUBN* es el único gen previamente vinculado al metabolismo del C-HDL (Kozyraki y cols., 1999; Hammad y cols., 1999). Es de llamar la atención que ninguno de los genes identificados en este estudio con expresión diferencial en los grupos con niveles extremos de C-HDL

analizados, había sido asociado a este rasgo en estudios previos (Göring y cols., 2007; Ma y cols., 2007; Zeller y cols., 2010; Inouye y cols., 2010). Sin embargo, existen diferencias importantes entre esos estudios y el presente estudio; en primer lugar está la edad de los participantes, en los estudios previos se analizó población adulta, con un intervalo de edad de 25 a 74 años y el presente estudio se limitó a niños de 6 a 10 años; además, en dichos estudios se analizó población general y en el presente estudio se emplearon grupos con niveles de C-HDL extremos y finalmente, la población analizada en los estudios previos era México-americana, canadiense, alemana y finlandesa, respectivamente, mientras que en el presente estudio eran niños de población mexicana. Es importante señalar que se ha reportado que existe variación en la expresión génica debida a la ancestría genética (Storey y cols., 2007; Mao y cols., 2011), por lo cual esto podría explicar en parte, las diferencias con respecto a los genes identificados en los distintos estudios.

La validación de los resultados obtenidos en el microarreglo por PCR en tiempo real mostró que sólo dos de los siete genes con expresión diferencial más significativa, replicaron el resultado observado en el microarreglo (*HRH4* y *CUBN*). Se ha reportado que alrededor de un 10% de la totalidad de los genes que se expresan significativamente en un microarreglo pueden ser falsos positivos (Lee y cols., 2000), por lo cual es probable que los genes que no replicaron por PCR en tiempo real se ubiquen dentro de este porcentaje de falsos positivos. De igual forma se ha establecido que lo ideal es hacer el análisis por triplicado para reducir la probabilidad de resultados falsos positivos y falsos negativos (Lee y cols., 2000); sin embargo, la técnica de microarreglos es bastante costosa y resultaría difícil hacer el análisis bajo estas condiciones (Rosa y cols., 2006).

El análisis in silico de interacción biológica con los programas Reactome y Pantherdb, mostró resultados similares con ambos programas, ya que coincidieron en que los genes cuya expresión fue diferencial y estadísticamente significativa en los microarreglos no forman parte de alguna red de interacción biológica específica,

sugiriendo así que la regulación de la transcripción de estos genes no se lleva a cabo mediante elementos en *trans* (Rockman y Kruglyak, 2006; Cheung y cols., 2010); por lo tanto, probablemente son elementos en *cis* los que regulan su transcripción.

Es de llamar la atención que no se observó a *VWV1* dentro de la lista de genes expresados diferencialmente y de manera significativa en los microarreglos; esto puede deberse a que *VWV1* fue evidenciado en un estudio de transcriptoma completo en 1240 adultos de población general (Göring y cols., 2007), mientras que este estudio se realizó en niños con niveles extremos de C-HDL, eliminando así la parte central de la curva de distribución normal con respecto a los niveles de C-HDL. Es probable también que la ausencia de *VWV1* en la lista de genes con expresión diferencial significativa en los microarreglos, pudiera indicar que, más allá de la estrategia utilizada, probablemente la contribución de la expresión de *VWV1* a la modulación de los niveles de C-HDL sea menor.

Göring y colaboradores (2007) reportaron una correlación significativa de la expresión de *VWV1* con los niveles de C-HDL ($r=0.28$; $P= 4 \times 10^{-9}$); en este estudio encontramos que los niveles de expresión del gen *VWV1* en leucocitos correlacionaron positivamente con los niveles de C-HDL en niños prepúberes mexicanos, lo cual fue significativo solo en las niñas ($r=0.22$, $P=0.017$). Existe evidencia experimental previa de que Vanina 1 es un regulador central de la biosíntesis de lípidos, controlando el flujo a través de las rutas biosintéticas de colesterol y/o de los ácidos grasos (Kaskow y cols., 2012). Recientemente, en un modelo de ratón se observó que el silenciamiento de *VWV1* disminuyó significativamente el eflujo de colesterol mediado por ApoA1 y en contraste, la sobreexpresión de este gen promovió este proceso; estos datos en conjunto sugieren que *VWV1* puede afectar la homeostasis de las HDL a través del eflujo de colesterol (Bozaoglu y cols., 2012). La correlación positiva de la expresión de *VWV1* y los niveles de C-HDL en el humano reportada por Göring en adultos y en el presente estudio en niños es consistente con estos hallazgos en ratón; sin embargo, es necesario realizar análisis funcionales en el humano para dilucidar si éste es el mecanismo por el

cual *VNN1* se asocia al C-HDL.

De manera interesante, la expresión del gen *VNN1* presentó una correlación negativa con los niveles de triglicéridos y el z-score del IMC en la población total; estas correlaciones nuevamente fueron significativas sólo en las niñas. Existe solo un estudio en ratones donde se reportó a *VNN1* asociado a la presencia de obesidad, formando parte de una red genética generada a partir de datos de expresión en hígado, en la cual fue considerado como un gen causal para esta enfermedad (Schadt y cols., 2005). En otro estudio reciente se reportó que la sobreexpresión de *VNN1* en un modelo de hígado graso en ratón precede la acumulación de lípidos y es mediada diferencialmente por varios tipos de ácidos grasos libres, postulando así a *VNN1* como un gen nuevo involucrado en la patogénesis del hígado graso no alcohólico (Motomura y cols., 2012), una enfermedad asociada a la obesidad. Hasta la fecha, el presente estudio es el único en el que se han analizado los efectos de la expresión de *VNN1* sobre diversos parámetros metabólicos en niños, por lo que se requieren más estudios para confirmar estos hallazgos y para caracterizar las diferencias observadas por género.

Con respecto a la variante G-137T, la frecuencia del alelo T en la población infantil mexicana estudiada fue de 35%; esta frecuencia es similar al 33% reportado para México-americanos en el HapMap y es menor a la reportada para poblaciones europeas, la cual es de 67% (International HapMap Consortium, 2003). Es importante mencionar que este polimorfismo no había sido asociado a los niveles de C-HDL en los GWAS, posiblemente debido a que esos estudios en su mayoría son realizados en poblaciones caucásicas (Willer y cols., 2008; Kooner y cols., 2008; Kathiresan y cols., 2008). Además, es probable que la contribución de este polimorfismo en la modulación de los niveles de C-HDL sea pequeña y por ello no había sido identificado en ese tipo de análisis, donde se identifican principalmente variantes con una contribución mayor. Aunado a esto, es importante considerar que los niveles de C-HDL son un rasgo complejo que no solo se modula por factores genéticos y epigenéticos, también los factores ambientales juegan un papel importante en su regulación (Jeffs y cols., 2006).

En algunos estudios se ha reportado que la ancestría genética tiene un efecto sobre la expresión génica global y sobre las asociaciones de algunas variantes genéticas con diversas enfermedades (Storey y cols., 2007; Yang y cols., 2012); además, se sabe que el C-HDL presenta variación en sus niveles entre las distintas poblaciones (Aguilar-Salinas y cols., 2001; Bruckert 2006). Considerando que la población mexicana es producto de la mezcla principalmente entre población europea (española) y poblaciones nativas americanas (Lisker y cols., 1990; Martínez-Marignac y cols., 2007; Martínez-Fierro y cols., 2009) y tomando en cuenta también que la frecuencia del alelo de riesgo (T) de la variante G-137T es más frecuente en la población europea, se estimó el componente de población europea y nativo americana en los niños analizados. Los resultados de estimación de componente nativo americano (65%) y componente de población europea (35%) obtenidos en este estudio, fueron consistentes con lo reportado en un estudio previo realizado en población de la Ciudad de México (Martínez-Marignac y cols., 2007). Es importante mencionar que todas las asociaciones reportadas en este estudio permanecieron significativas después de ajustar por ancestría, sugiriendo que la estratificación poblacional no fue un factor confusor importante en los análisis realizados.

El genotipo TT de la variante G-137T se asoció significativamente con niveles más bajos de RNAm de *VWV7*, comparando con los portadores del alelo G en una o dos copias; esto es congruente con lo reportado por Göring y colaboradores en adultos México-americanos. Aún cuando en este mismo estudio se evidenció experimentalmente y a nivel bioinformático que esta variante en promotor tiene efectos funcionales importantes sobre la afinidad de unión a factores de transcripción, específicamente a Sp1 (Göring y cols., 2007), el genotipo TT en nuestro estudio solo contribuyó de manera independiente a la explicación de 4.8% de la variación en la expresión del gen *VWV7*. Este resultado es consistente con el rango previamente reportado (3.1 a >80%) del efecto que pueden tener los SNPs (Polimorfismos de un solo nucleótido) sobre la variabilidad en la expresión génica (Zeller y cols., 2010). Sin embargo, aún faltan por determinar los otros factores genéticos y los ambientales que explican la mayor parte de

la variabilidad en la expresión del gen *VWV1*.

De manera interesante, el genotipo TT se asoció con los niveles de TG y de CT, sólo en las niñas; sin embargo, estas asociaciones no permanecieron significativas después de ajustar por el z-score del IMC, lo que sugiere que pudieran ser mediadas por un efecto sobre la grasa corporal. Asimismo, esta variante se asoció significativamente a un mayor z-score del IMC y a un mayor porcentaje de grasa en la población total. No existe evidencia experimental previa del papel que tiene *VWV1* sobre la función del adipocito en el humano; no obstante, *VWV1* fue identificado como un gen relacionado con la obesidad en ratones (Schadt y cols., 2005) y se sabe que induce lipólisis en el tejido adiposo de la rata (Bocos y Herrera, 1998). En diversos estudios se ha reportado la correlación de la actividad de panteteinasa de Vanina 1 con el estrés oxidativo y la inflamación (Martin y cols., 2004; Berruyer y cols., 2006; Mahr y cols., 2006; Di Leandro y cols., 2008; Jansen y cols., 2009); sin embargo, no existen estudios en modelos animales o en humanos, en los cuales se evalúe la implicación del gen *VWV1* ni de la proteína Vanina 1 en el desarrollo de obesidad.

Debido a que las variantes en el gen *VWV1* no habían sido previamente asociadas con la obesidad en los GWAS (Thorleifsson y cols., 2009; Speliotes y cols., 2010) y considerando que el número de muestras analizadas en este estudio es reducido, las asociaciones encontradas deben ser interpretadas con cautela. Se requieren estudios adicionales que incluyan un mayor tamaño de muestra para confirmar y entender aún más el papel de *VWV1* en el desarrollo de la obesidad en el humano.

Las diferencias observadas al estratificar por género son importantes, particularmente tomando en cuenta que se trata de niños prepúberes. Las niñas prepúberes estudiadas presentaron un porcentaje de grasa significativamente mayor que los niños, lo cual podría explicar al menos en parte las diferencias observadas en las asociaciones genéticas y en las correlaciones estratificadas por género. Se han reportado previamente diferencias de género en el efecto de los polimorfismos sobre los

parámetros lipídicos en niños prepúberes (López-Simón y cols., 2009), las cuales han sido explicadas por la variación en los niveles del sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), una prohormona producida por las glándulas suprarrenales (Garcés y cols., 2003). Sin embargo, debido a que en este estudio no se midieron los niveles de DHEA-S, no podemos afirmar si este factor hormonal modula el efecto de los niveles de expresión de *VWV1* y la variante G-137T sobre los niveles de C-HDL.

Una vez que se evaluó *VWV1*, un gen cuya expresión había sido previamente asociada a los niveles de C-HDL en un estudio previo, se analizaron los genes que habían presentado las diferencias de expresión más significativas en los microarreglos y cuyo resultado había sido validado por PCR en tiempo real. De los dos genes que replicaron por esta segunda técnica, *CUBN* obtuvo el valor de *P* más significativo ($P=0.009$); considerando además que es un gen que se sabe que está involucrado en el metabolismo de las HDL, particularmente en su catabolismo, ya que es un receptor de ApoA1 en riñón (Kozyraki y cols., 1999; Moestrup y cols. 2000), se analizó su expresión en una muestra de población infantil mexicana. Se obtuvo una correlación positiva y significativa de la expresión de *CUBN* con los niveles de C-HDL ($r=0.180$; $P=9.2 \times 10^{-5}$) y también con los niveles de ApoA1, la apolipoproteína más abundante dentro de la estructura de las HDL ($r=0.194$; $P=3.9 \times 10^{-5}$). Se sabe que a nivel estadístico, un valor de $r < 0.3$ corresponde a una correlación débil (Choudhury, 2009); sin embargo, en los estudios similares a este trabajo, en donde se analiza la expresión de un gen y su posible correlación con diversos parámetros metabólicos, los valores de *r* generalmente son menores a 0.3 (Morrison y cols., 2011; Chang y cols., 2010), por lo tanto, las correlaciones obtenidas, aún cuando son bajas, son relevantes y significativas.

Los niveles de RNAm de un gen pueden ser modificados por polimorfismos ubicados en los elementos que regulan su expresión (Cookson y cols, 2009). Aunado a esto, los genes expresados diferencialmente en el microarreglo no se agruparon dentro de una red biológica conocida, por lo cual era probable que su regulación se debiera a elementos en *cis*. Por esto se realizó la secuenciación de 1 kb del promotor del gen

CUBN, con el objetivo de buscar variantes asociadas a los niveles de expresión de este gen. Se identificó así la variante T-405A, la cual se asoció de manera significativa a niveles bajos de expresión del gen *CUBN* ($P=2.5 \times 10^{-6}$). Es importante mencionar que no existen estudios previos de esta variante, y que solamente se encuentran reportadas sus frecuencias para europeos y africanos en el HapMap, donde se observa que para ambas poblaciones es altamente frecuente.

Al analizar la variante T-405A con respecto a los niveles de C-HDL, no se encontró asociación significativa en la población total ni en el análisis estratificado por género. Al realizar el cálculo del poder estadístico para esta variante con respecto a su asociación con los niveles de C-HDL, se obtuvo un valor de aproximadamente 21%, lo cual está alejado del 80% considerado como mínimo para la realización de este tipo de análisis; por lo tanto, es necesario incrementar el tamaño de la muestra para confirmar que no existe asociación de esta variante con los niveles de C-HDL. Existe también la posibilidad de que sean otras las variantes en el gen *CUBN* las que sí estén asociadas a los niveles de C-HDL.

Finalmente, el abordaje de este estudio permitió la identificación de genes asociados, mediante su expresión, a los niveles de C-HDL en una muestra de población infantil mexicana, demostrando así la importancia de implementar diversas estrategias, como el análisis de individuos con fenotipos extremos y el análisis de expresión génica, para dilucidar el componente genético que modula los niveles de C-HDL en esta población.

VIII.- CONCLUSIONES

- El análisis de los patrones de expresión génica en niños con niveles extremos de C-HDL permitió la identificación de genes, como *CUBN* y *HRH4*, asociados a los niveles de C-HDL.
- La expresión del gen *CUBN* correlacionó positivamente y de manera significativa con los niveles de C-HDL en una muestra de población infantil mexicana; se identificó una variante (T-405A) en el promotor de *CUBN* que se asoció significativamente a los niveles de expresión de este gen.
- Los niveles de expresión del gen *VNN1* y la variante G-137T se asociaron a los niveles de C-HDL, en niñas prepúberes mexicanas. Sin embargo, se requieren estudios adicionales con un tamaño de muestra mayor para confirmar estos hallazgos.
- La utilización de dos estrategias y metodologías complementarias permitió la identificación de *CUBN* y *VNN1*, dos genes asociados mediante su expresión a la variación de los niveles de C-HDL; el estudio a nivel funcional de estos genes contribuirá considerablemente al conocimiento del metabolismo del C-HDL.

IX.- PERSPECTIVAS

- Evaluar a nivel funcional la participación del gen *CUBN* en la regulación de los niveles de C-HDL, particularmente en células humanas de riñón, considerando que este gen codifica para un receptor de ApoA1.
- Estudiar la posible participación de *VNN1* y la variante G137T en el riesgo cardiovascular y en el desarrollo de hígado graso en humanos. Analizar la posible asociación del gen *VNN1* con factores ambientales que modulan los niveles de C-HDL, como la dieta y el ejercicio.
- Establecer el posible mecanismo de asociación del gen *VNN1* y la modulación de los niveles de C-HDL a través del estudio del eflujo de colesterol en macrófagos humanos.
- Estos estudios en conjunto proporcionarán información útil para la integración de los genes *CUBN* y *VNN1* dentro de las rutas del metabolismo del C-HDL.

X.- REFERENCIAS

1. Acuña-Alonzo V, Flores-Dorantes T, Kruit JK, Villarreal-Molina T, Arellano-Campos O, et al. A functional ABCA1 gene variant is associated with low HDL-cholesterol levels and shows evidence of positive selection in Native Americans. *Hum Mol Genet* 2010; 19(14):2877-85.
2. **Agilent Application Note: "Quantitation comparison of total RNA using the Agilent 2100 bioanalyzer, ribogreen analysis, and UV spectrometry", Publication Number 5988-7650EN, 2002.**
3. Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Gómez Pérez FJ, et al. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001;42(8):1298-307.
4. Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1792-8.
5. Aviram M, Kaplan M, Rosenblat M, Fuhrman B. Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handb Exp Pharmacol* 2005;170:263-300.
6. Bauduceau B, Vachey E, Mayaudon H, Burnat P, Dupuy O, et al. Should we have more definitions of metabolic syndrome or simply take waist measurement? *Diabetes Metab* 2007;33(5):333-9.
7. Berruyer C, Pouyet L, Millet V, Martin FM, LeGoffic A, et al. Vanin-1 licenses inflammatory mediator production by gut epithelial cells and controls colitis by antagonizing peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity. *J Exp Med* 2006;203(13):2817-27.
8. Bhatt HG, Agrawal YK, Raval HG, Manna K, Desai PR. Histamine H4 receptor: a novel therapeutic target for immune and allergic responses. *Mini Rev Med Chem* 2010;10(14):1293-308.
9. Bhopal R, Unwin N, White M, Yallop J, Walker L, et al. Heterogeneity of coronary heart disease risk factors in Indian, Pakistani, Bangladeshi, and European origin populations: cross sectional study. *BMJ* 1999;319(7204):215-20.
10. Bocos C, Herrera E. Pantethine stimulates lipolysis in adipose tissue and inhibits cholesterol and fatty acid synthesis in liver and intestinal mucosa in the normolipidemic rat. *Environ Toxicol Pharmacol* 1998;6:59-66.

11. Boes E, Coassin S, Kollerits B, Heid IM, Kronenberg F. Genetic-epidemiological evidence on genes associated with HDL cholesterol levels: a systematic in-depth review. *Exp Gerontol* 2009;44(3):136-60.
12. Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, et al. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet* 2004;68:139-53.
13. Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol* 2008;23(3):381-90.
14. Bozauglu K, Curran J, Hoang A, Low H, Dyer T, et al. Vanin 1, A Novel Gene Involved in Cholesterol Homeostasis. HDL Satellite Symposium 2012; **"High-density lipoproteins: biology and therapeutics"**. Australia, 30 March-1 April 2012.
15. Brown WM, Beck SR, Lange EM, Davis CC, Kay CM, et al. Framingham Heart Study. Age-stratified heritability estimation in the Framingham Heart Study families. *BMC Genet* 2003;4(Suppl 1):S32.
16. Bruckert E. Epidemiology of low HDL-cholesterol: results of studies and surveys. *Eur Heart J Suppl* 2006;8(suppl F):F17-F22.
17. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, De Palma A, Saresella M, et al. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238(1):61-5.
18. Carreón-Torres E, Juárez-Meavepeña M, Cardoso-Saldaña G, Gómez CH, Franco M, et al. Pioglitazone increases the fractional catabolic and production rates of high-density lipoproteins apo AI in the New Zealand White Rabbit. *Atherosclerosis* 2005;181(2):233-40.
19. Carreón-Torres E, Rendón-Sauer K, Monter-Garrido M, Toledo-Ibelle P, Gamboa R, et al. Rosiglitazone modifies HDL structure and increases HDL-apo AI synthesis and catabolic rates. *Clin Chim Acta* 2009;401(1-2):37-41.
20. Carroll MD, Kit BK, Lacher DA. Total and high-density lipoprotein cholesterol in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2009-2010. *NCHS Data Brief* 2012;92:1-8.
21. Chang YC, Chang LY, Chang TJ, Jiang YD, Lee KC, et al. The associations of LPIN1 gene expression in adipose tissue with metabolic phenotypes in the Chinese population. *Obesity* 2010;18(1):7-12.
22. Channon KM, Qian H, George SE. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and

vascular injury: insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(8):1873-81.

23. Chasman DI, Paré G, Zee RY, Parker AN, Cook NR, et al. Genetic loci associated with plasma concentration of low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, apolipoprotein A1, and Apolipoprotein B among 6382 white women in genome-wide analysis with replication. *Circ Cardiovasc Genet* 2008;1(1):21-30.
24. Chen SN, Cilingiroglu M, Todd J, Lombardi R, Willerson JT, et al. Candidate genetic analysis of plasma high-density lipoprotein-cholesterol and severity of coronary atherosclerosis. *BMC Med Genet* 2009;10:111.
25. Cherwinski HM, Murphy CA, Joyce BL, Bigler ME, Song YS, et al. The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and human mast cell function. *J Immunol* 2005;174(3):1348-56.
26. Cheung VG, Nayak RR, Wang IX, Elwyn S, Cousins SM, et al. Polymorphic cis- and trans-regulation of human gene expression. *PLoS Biol* 2010;8(9):e1000480.
27. Cho KH, Park SH, Park JE, Kim YO, Choi I, et al. The function, composition, and particle size of high-density lipoprotein were severely impaired in an oliguric phase of hemorrhagic fever with renal syndrome patients. *Clin Biochem*. 2008;41(1-2):56-64.
28. Choudhury A. Statistical Correlation. Created 2009; retrieved 2012 December 10 from: <http://explorable.com/statistical-correlation.html>
29. Clay MA, Pyle DH, Rye KA, Vadas MA, Gamble JR, et al. Time sequence of the inhibition of endothelial adhesion molecule expression by reconstituted high density lipoproteins. *Atherosclerosis* 2001;157(1):23-9.
30. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(11):1987-94.
31. Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, et al. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004;305(5685):869-72.
32. Collin B, Busseuil D, Zeller M, Perrin C, Barthez O, et al. Increased superoxide anion production is associated with early atherosclerosis and cardiovascular dysfunctions in a rabbit model. *Mol Cell Biochem* 2007;294(1-2):225-35.
33. Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet* 2009;10:184-94.

34. De Oliveira E Silva ER, Foster D, McGee Harper M, Seidman CE, Smith JD, et al. Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II. *Circulation* 2000;102(19):2347-52.
35. Di Leandro, B. Maras, M.E. Schininà, S. Dupré, I. Koutris, et al. Cystamine restores GSTA3 levels in vanin-1 null mice, *Free Radic Biol Med* 2008;44:1088–1096.
36. Drew BG, Fidge NH, Gallon-Beaumier G, Kemp BE, Kingwell BA. High-density lipoprotein and apolipoprotein AI increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101(18):6999-7004.
37. Dumitrescu L, Brown-Gentry K, Goodloe R, Glenn K, Yang W, et al. Evidence for age as a modifier of genetic associations for lipid levels. *Ann Hum Genet* 2011;75:589-97.
38. Ellegren H, Parsch J. The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat Rev Genet* 2007;8:689-98.
39. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics* 2011;128(Suppl 5):S213-56.
40. Feitosa MF, Myers RH, Pankow JS, Province MA, Borecki IB. LIPC variants in the promoter and intron 1 modify HDL-C levels in a sex-specific fashion. *Atherosclerosis* 2009;204:171-7.
41. Ferns G, Ketis V. HDL-cholesterol modulation and its impact on the management of cardiovascular risk. *Ann Clin Biochem* 2008;45(2):122-8.
42. Flores-Dorantes T, Arellano-Campos O, Posadas-Sánchez R, Villarreal-Molina T, Medina-Urrutia A, et al. Association of R230C ABCA1 gene variant with low HDL-C levels and abnormal HDL subclass distribution in Mexican school-aged children. *Clin Chim Acta* 2010;411(17-18):1214-7.
43. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(30):10604-9.
44. Forte TM, Oda MN, Knoff L, Frei B, Suh J, et al. Targeted disruption of the murine lecithin:cholesterol acyltransferase gene is associated with reductions in plasma paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities but not in apolipoprotein J concentration. *J Lipid Res* 1999;40(7):1276-83.

45. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest* 2004; 114:1343-53.
46. Galland F, Malergue F, Bazin H, Mattei MG, Aurrand-Lions M, et al. Two human genes related to murine vanin-1 are located on the long arm of human chromosome 6. *Genomics* 1998;53(2):203-13.
47. Göring HH, Curran JE, Johnson MP, Dyer TD, Charlesworth J, et al. Discovery of expression QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes. *Nat Genet* 2007;39:1208-16.
48. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V. 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* 1999;100(13):1481-92.
49. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109(3):433-8.
50. Guallar-Castillón P, Gil-Montero M, León-Muñoz LM, Graciani A, Bayán-Bravo A, et al. Magnitude and management of hypercholesterolemia in the adult population of Spain, 2008-2010: The ENRICA Study. *Rev Esp Cardiol* 2012;65(6):551-8.
51. Gupta R, Deedwania PC, Sharma K, Gupta A, Guptha S, et al. Association of educational, occupational and socioeconomic status with cardiovascular risk factors in Asian Indians: a cross-sectional study. *PLoS One* 2012;7(8):e44098.
52. Hammad SM, Stefansson S, Twal WO, Drake CJ, Fleming P, et al. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96(18):10158-63.
53. Hammad SM, Barth JL, Knaak C, Argraves WS. Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J Biol Chem* 2000;275(16):12003-8.
54. Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ, et al. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 2002;43(3):445-52.
55. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery

- disease. *Circulation* 2001;104(22):2673-8.
56. Heller DA, de Faire U, Pedersen NL, Dahlén G, McClearn GE. Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. *N Engl J Med* 1993; 328(16):1150-6.
 57. Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, Kittles RA, Clayton DG, et al. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum Genet* 2003;72:1492–504.
 58. Holzer M, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, El-Gamal D, Binder V, et al. Uremia alters HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(9):1631-41.
 59. Inouye M, Silander K, Hamalainen E, Salomaa V, Harald K, et al. An immune response network associated with blood lipid levels. *PLoS Genet* 2010; 6(9):e1001113.
 60. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426:789-96.
 61. Jansen PA, Kamsteeg M, Rodijk-Olthuis D, van Vlijmen-Willems IM, de Jongh GJ, et al. Expression of the vanin gene family in normal and inflamed human skin: induction by proinflammatory cytokines. *J Invest Dermatol* 2009;129(9):2167-74.
 62. Jeffs JA, Godsland IF, Johnston DG. Less than 50% of variation in HDL cholesterol between and within individuals, is explained by established predictors. *Atherosclerosis* 2006;184(1):178-87.
 63. Joy T, Hegele RA. Is raising HDL a futile strategy for atheroprotection? *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(2):143-55.
 64. Karabina SA, Elisaf M, Bairaktari E, Tzallas C, Siamopoulos KC, et al. Increased activity of platelet-activating factor acetylhydrolase in low-density lipoprotein subfractions induces enhanced lysophosphatidylcholine production during oxidation in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest*;27(7):595-602.
 65. Karhapää P, Malkki M, Laakso M. Isolated low HDL cholesterol. An insulin-resistant state. *Diabetes* 1994;43(3):411-7.
 66. Kaskow BJ, Proffitt JM, Blangero J, Moses EK, Abraham LJ. Diverse biological activities of the vascular non-inflammatory molecules - the Vanin pantetheinases. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:653-8.

67. Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burtt NP, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet* 2008;40:189-97.
68. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009;41(1):56-65.
69. Klimov AN, Kozhevnikova KA, Kuzmin AA, Kuznetsov AS, Belova EV. On the ability of high density lipoproteins to remove phospholipid peroxidation products from erythrocyte membranes. *Biochemistry* 2001;66(3):300-4.
70. Klos KL, Kullo IJ. Genetic determinants of HDL: monogenic disorders and contributions to variation. *Curr Opin Cardiol* 2007;22:344–351.
71. Kooner JS, Chambers JC, Aguilar-Salinas CA, Hinds DA, Hyde CL, et al. Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides. *Nat Genet* 2008; 40:149-51.
72. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(10):1881-8.
73. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(3):721-7.
74. Kozyraki R; Fyfe J; Kristiansen M; Gerdes C; Jacobsen C, *et al.* The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nature Med* 1999;656-661.
75. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, et al. 2000 CDC growth charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 2002; 246:1–190.
76. Lee JY, Lanningham-Foster L, Boudyguina EY, Smith TL, Young ER, et al. Prebeta high density lipoprotein has two metabolic fates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J Lipid Res* 2004;45(4):716-28.
77. Lee ML, Kuo FC, Whitmore GA, Sklar J. Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(18):9834-9.
78. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7(9):678-89.

79. Li D, Weng S, Yang B, Zander DS, Saldeen T, et al. Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(2):378-83.
80. Linsel-Nitschke P, Tall AR. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:193–205.
81. Lisker R, Ramirez E, Briceno RP, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990;62:791-801.
82. López-Simón L, de Oya M, Lasunción MA, Riestra P, Benavente M, et al. Genetic determinants of plasma HDL-cholesterol levels in prepubertal children. *Clin Chim Acta* 2009;403:203-6.
83. Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, et al. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet* 2007;370:1829–1839.
84. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005;96:1221–1232.
85. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part II: clinical implications. *Circulation* 2004;110:2066-71.
86. Ma J, Dempsey AA, Stamatiou D, Marshall KW, Liew CC. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects. *Atherosclerosis* 2007;191:63-72.
87. Magnussen CG, Venn A, Thomson R, Juonala M, Srinivasan SR, et al. The association of pediatric low- and high-density lipoprotein cholesterol dyslipidemia classifications and change in dyslipidemia status with carotid intima-media thickness in adulthood: evidence from the cardiovascular risk in Young Finns study, the Bogalusa Heart study, and the CDAH (Childhood Determinants of Adult Health) study. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(10):860-9.
88. Mao J, Ai J, Zhou X, Shenwu M, Ong M Jr, et al. Transcriptomic profiles of peripheral white blood cells in type II diabetes and racial differences in expression profiles. *BMC Genomics* 2011;12 Suppl 5:S12.
89. Maras B, Barra D, Duprè S, Pitari G. Is pantetheinase the actual identity of mouse and human vanin-1 proteins? *FEBS Lett* 1999;461(3):149-52.
90. Mahr S, Burmester GR, Hilke D, Göbel U, Grützkau A, et al. Cis- and trans-acting gene regulation is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet* 2006;78(5):793-

803.

91. Martin F, Malergue F, Pitari G, Philippe JM, Philips S, et al. Vanin genes are clustered (human 6q22-24 and mouse 10A2B1) and encode isoforms of pantetheinase ectoenzymes. *Immunogenetics* 2001;53(4):296-306.
92. Martin F, Penet MF, Malergue F, Lepidi H, Dessein A, et al. Vanin-1(-/-) mice show decreased NSAID- and Schistosoma-induced intestinal inflammation associated with higher glutathione stores. *J Clin Invest* 2004;113(4):591-7.
93. Martinez-Fierro ML, Beuten J, Leach RJ, Parra EJ, Cruz-López, et al. Ancestry informative markers and admixture proportions in northeastern Mexico. *J Hum Genet* 2009;54(9):504-9.
94. Martinez-Marignac VL, Valladares A, Cameron E, Chan A, Perera A, et al. Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors. *Hum Genet* 2007;120:807-19.
95. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006;98(11):1352-64.
96. Mineo C, Shaul PW. Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. *Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. Circ Res* 2012;111(8):1079-90.
97. Moestrup SK, Kozyraki R. Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Curr Opin Lipidol* 2000;11(2):133-40.
98. Moestrup SK, Nielsen LB. The role of the kidney in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2005;16(3):301-6.
99. Montefusco MC, Merlo K, Bryan CD, Surks HK, Reis SE, et al. Little ROCK is a ROCK1 pseudogene expressed in human smooth muscle cells. *BMC Genet* 2010;11:22.
100. Moren X, Deakin S, Liu ML, Taskinen MR, James RW. HDL subfraction distribution of paraoxonase-1 and its relevance to enzyme activity and resistance to oxidative stress. *J Lipid Res* 2008;49(6):1246-53.
101. Morrison JA, Glueck CJ, Daniels S, Wang P, Stroop D. Paradoxically high adiponectin in obese 16-year-old girls protects against appearance of the metabolic syndrome and its components seven years later. *J Pediatr* 2011;158(2):208-14.e1

102. Motomura W, Yoshizaki T, Takahashi N, Kumei S, Mizukami Y, et al. Analysis of vanin-1 upregulation and lipid accumulation in hepatocytes in response to a high-fat diet and free fatty acids. *J Clin Biochem Nutr* 2012;51(3):163-169.
103. Nathan BM, Moran A. Metabolic complications of obesity in childhood and adolescence: more than just diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:21-9.
104. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, et al. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005;38(2):153-63.
105. Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, Bao S, Drummond GR, et al. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation* 2005;111(12):1543-50.
106. **Okopień B**, Krysiak R, Kowalski J, Madej A, Belowski D, et al. Monocyte release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in primary type IIa and IIb dyslipidemic patients treated with statins or fibrates. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;46(3):377-86.
107. Pajkrt D, Lerch PG, van der Poll T, Levi M, Illi M, et al. Differential effects of reconstituted high-density lipoprotein on coagulation, fibrinolysis and platelet activation during human endotoxemia. *Thromb Haemost* 1997;77(2):303-7.
108. Peloso GM, Demissie S, Collins D, Mirel DB, Gabriel SB, et al. Common genetic variation in multiple metabolic pathways influences susceptibility to low HDL-cholesterol and coronary heart disease. *J Lipid Res* 2010 ;51(12):3524-32.
109. Pérez-Méndez O, Torres-Tamayo M, Posadas-Romero C, Vidaure Garcés V, Carreón-Torres E, et al. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007a;376(1-2):17-22.
110. Pérez-Méndez O, Alvarez-Salcedo P, Carreón Torres E, Luc G, Arce Fonseca M, et al. Palmitic acid in HDL is associated to low apo A-I fractional catabolic rates in vivo. *Clin Chim Acta* 2007b;378(1-2):53-8.
111. Pil-Byung C, Shin-Hwan Y, Il-Gyu K, Gwang-Suk H, Jae-Hyun Y, et al. Effects of exercise program on appetite-regulating hormones, inflammatory mediators, lipid profiles, and body composition in healthy men. *J Sports Med Phys Fitness* 2011;51(4):654-63.

112. Posadas-Sánchez R, Posadas-Romero C, Zamora-González J, Mendoza-Pérez E, Cardoso-Saldaña G, et al. Lipid and lipoprotein profiles and prevalence of dyslipidemia in Mexican adolescents. *Metabolism* 2007;56:1666–72.
113. Qasim A, Rader DJ. Human genetics of variation in high-density lipoprotein cholesterol. *Curr Atheroscler Rep* 2006;8:198-205.
114. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implication for novel therapies. *J Clin Invest* 2006;116(12):3090-100.
115. Raitakari OT, Juonala M, Kähönen M, Taittonen L, Laitinen T, et al. Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *JAMA* 2003;290(17):2277-83.
116. Robins SJ. Targeting low high-density lipoprotein cholesterol for therapy: lessons from the Veterans Affairs High-density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol* 2001;88(12A):19N-23N.
117. Rockman MV, Kruglyak L. Genetics of global gene expression. *Nat Rev Genet* 2006;7(11):862-72.
118. Rosa GJ, de Leon N, Rosa AJ. Review of microarray experimental design strategies for genetical genomics studies. *Physiol Genomics* 2006;28(1):15-23.
119. Saland JM. Update on the metabolic syndrome in children. *Curr Opin Pediatr* 2007;19:183-91.
120. Saulquin X, Gastinel LN, Vivier E. Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j). *J Exp Med* 2003;197(7):933-8.
121. Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, et al. An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nature Genet* 2005;37:710-7.
122. Sheikholeslami Vatani D, Ahmadi S, Ahmadi Dehrashid K, Gharibi F. Changes in cardiovascular risk factors and inflammatory markers of young, healthy, men after six weeks of moderate or high intensity resistance training. *J Sports Med Phys Fitness* 2011;51(4):695-700.
123. Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall AR. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem* 2001;276(27):25287-93.

124. Soto-Miranda E, Carreón-Torres E, Lorenzo K, Bazán-Salinas B, García-Sánchez C, et al. Shift of high-density lipoprotein size distribution toward large particles in patients with proteinuria. *Clin Chim Acta* 2012;414:241-245.
125. Soysal A, Demiral Y, Soysal D, Ucku R, Koseoglu M, et al. The prevalence of metabolic syndrome among young adults in Izmir, Turkey. *Anadolu Kardiyol Derg* 2005;5:196–201.
126. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 2010;42:937-48.
127. Storey JD, Madeoy J, Strout JL, Wurfel M, Ronald J, et al. Gene-expression variation within and among human populations. *Am J Hum Genet* 2007;80:502-9.
128. Tabet F, Rye KA. High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress. *Clin Sci* 2009;116(2):87-98.
129. Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 1990;86(2):379-84.
130. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003;46(6):733-49.
131. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, et al. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* 2009;41:18-24.
132. Toledo-Ibelles P, Franco M, Carreón-Torres E, Luc G, Tailleux A, et al. Normal HDL-apo AI turnover and cholesterol enrichment of HDL subclasses in New Zealand rabbits with partial nephrectomy. *Metabolism* 2012. pii: S0026-0495(12)00356-3. doi: 10.1016/j.metabol.2012.09.010.
133. Toth PP. The "good cholesterol": high-density lipoprotein. *Circulation* 2005;111(5):e89-91.
134. Varady KA, Jones PJ. Combination diet and exercise interventions for the treatment of dyslipidemia: an effective preliminary strategy to lower cholesterol levels? *J Nutr* 2005;135(8):1829–1835.
135. Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, et al. 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* 2007;56:1881-7.

136. Vinueza R, Boissonnet CP, Acevedo M, Uriza F, Benitez FJ, et al. Dyslipidemia in seven Latin American cities: CARMELA study. *Prev Med* 2010;50(3):106-11.
137. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(1):13-27.
138. Weiss LA, Pan L, Abney M, Ober C. The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in humans. *Nat Genet* 2006;38:218-22.
139. Weissglas-Volkov D, Pajukanta P. Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *J Lipid Res* 2010;51(8):2032-57.
140. Westbye MP, Feyzi E, Aas PA, Vågbø CB, Talstad VA, et al. Human AlkB homolog 1 is a mitochondrial protein that demethylates 3-methylcytosine in DNA and RNA. *J Biol Chem* 2008;283(36):25046-56.
141. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV, Vranizan KM, Wood PD. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. *J Lipid Res* 1990;31(6):1131-9.
142. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet* 2008;40:161-69.
143. Yang HC, Wang PL, Lin CW, Chen CH, Chen CH. Integrative analysis of single nucleotide polymorphisms and gene expression efficiently distinguishes samples from closely related ethnic populations. *BMC Genomics* 2012;13:346.
144. Yang MC, Yang JJ, McIndoe RA, She JX. Microarray experimental design: power and sample size considerations. *Physiol Genomics* 2003;16(1):24-8.
145. Zeller T, Wild P, Szymczak S, Rotival M, Schillert A, et al. Genetics and beyond--the transcriptome of human monocytes and disease susceptibility. *PLoS One* 2010;5(5):e10693.
146. Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, et al. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 2005;115(10):2870-4.

XI.- ANEXOS

Tabla suplementaria 1. Oligonucleótidos y sondas empleados para el análisis de los genes con la expresión diferencial más significativa en los microarreglos.

	Gen	Oligonucleótidos	Secuencia 5' → 3'	Sonda	No. de catálogo de la sonda
Genes subexpresados	<i>ROCK1</i>	ROCK1-F	acatttgactggaaataaagaaagg	88	04689135001
		ROCK1-R	gctccagttgcagggttaga		
	<i>KIRS2DS2</i>	KIRS2DS2-F	ggtcaaaatccctttcacca	35	04687680001
		KIRS2DS2-R	tggccattacagcagcatt		
	<i>TUBB2A</i>	TUBB2A-F	aaatattgtacctcgggccatc	50	04688112001
		TUBB2A-R	gttattcccggctccactct		
Genes sobreexpresados	<i>ALKBH1</i>	ALKBH1-F	ccaaaccttgctgtcattc	2	04684982001
		ALKBH1-R	cctcatcccttgaagacca		
	<i>CD200R1</i>	CD200R1-F	gggattcatttggttggtgaa	46	04688066001
		CD200R1-R	tcaacaactggagtagattctgtttt		
	<i>HRH4</i>	HRH4-F	cctgtcagctcaaagtctgtg	49	04688104001
		HRH4-R	tggccattcactaagaagg		
	<i>CUBN</i>	CUBN-F	ccatggcatctgtgaggatt	78	0468901100
		CUBN-R	acagacgcagctgtactgg		

Tabla suplementaria 2: Oligonucleótidos empleados en la secuenciación del promotor del gen *CUBN*.

Fragmento	Oligonucleótidos	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del producto de PCR (pb)
1	CUBN-F1	tgctcatggaaagtctgagtgca	432
	CUBN-R1	tgatacctaaaagcatgggca	
2	CUBN-F2	cttcattctgggagttgct	389
	CUBN-R2	ccttgcagaggagttccacc	
3	CUBN-F3	ctccaacttctttgcatgtgga	440
	CUBN-R3	aagagtgaggccactccaacc	

Tabla suplementaria 3. Genes subexpresados con un FC < -1.50 y $P < 0.05$

Affymetrix ID	Cromosoma	Símbolo del gen	Gen	Función del gen	FC	P^*
8019804	18	<i>ROCK1P1</i>	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 pseudogene 1	Daño Vascular	-2.02	0.000154
8031344	19	<i>KIR2DS2</i>	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail 2	Respuesta Inmune	-1.70	0.000226
8116649	6	<i>TUBB2A</i> <i>TUBB2B</i>	Tubulin, beta 2A Tubulin, beta 2B	Estructural; formación de microtúbulos	-1.65	0.000833
7905507	1	<i>LCE2A</i>	Late cornified envelope 2A	Queratinización	-1.53	0.001732
8117594	6	<i>HIST1H2BM</i>	Histone cluster 1, H2bm	Estructura de nucleosoma	-1.56	0.003403
8023154	18	<i>TCEB3CL</i>	Transcription elongation factor B polypeptide 3C-like	Transcripción	-1.51	0.004278
7910381	1	<i>DUSP5P</i>	Dual specificity phosphatase 5 pseudogene	Defosforilación de MAPK	-1.60	0.007408
8032212	19	<i>NDUFS7</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7	Cadena respiratoria	-1.54	0.007680
7939988	11	<i>OR5M3</i>	Olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 3	Receptor olfatorio	-1.56	0.015020
8167573	X	<i>GAGE12B</i>	G antigen 12B	Respuesta inmune	-1.52	0.015840
8176570	4	<i>DUX4</i>	Double homeobox 4	Asociado a distrofia fascioescapulohumeral	-1.66	0.016872
8094134	4	<i>DUB4</i>	Deubiquitinating enzyme DUB4	Procesos de desubiquitinación	-3.11	0.028935
7912567	1	<i>PRAMEF15</i>	PRAME family member 15	Represión de la señalización de ácido retinoico; asociado a leucemia	-1.50	0.044925
8149243	8	<i>DUB3</i>	Deubiquitinating enzyme 3	Procesos de desubiquitinación	-1.78	0.045200

FC: Fold Change (número de veces de cambio); * Valor de P calculado con prueba de ANOVA.

Tabla suplementaria 4. Genes sobreexpresados con un FC > 1.50 y $P < 0.05$

Affymetrix ID	Cromosoma	Símbolo del gen	Gen	Función del gen	FC	P^*
7980454	14	<i>ALKBH1</i>	alkB, alkylation repair homolog 1 (E. coli)	Reparación Ac. Nucleicos	1.52	0.000100
8089568	3	<i>CD200R1</i>	CD200 receptor 1	Respuesta Inmune	1.51	0.000706
8020684	18	<i>HRH4</i>	histamine receptor H4	Respuesta Inmune	1.60	0.000756
7932326	10	<i>CUBN</i>	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	Receptor de múltiples ligandos (HDL)	1.51	0.001165
8028194	19	<i>ZNF382</i>	zinc finger protein 382	Proliferación, diferenciación celular y apoptosis	1.55	0.001386
8056426	2	<i>TTC21B</i>	tetratricopeptide repeat domain 21B	Citoesqueleto	1.52	0.001721
8083260	3	<i>CPA3</i>	carboxypeptidase A3 (mast cell)	Hidroliza las proteínas a polipéptidos y aminoácidos	1.51	0.002198
7985224	15	<i>TBC1D2B</i>	TBC1 domain family, member 2B; similar to TBC1 domain family, member 2B	Respuesta inmune	1.50	0.002661
8104901	5	<i>IL7R</i>	interleukin 7 receptor	Respuesta inmune	1.57	0.003437
7946275	11	<i>GVIN1</i>	GTPase, very large interferon inducible 1	Pseudogen posiblemente relacionado con respuesta inmune	1.52	0.004156
7987369	15	<i>ATPBD4</i>	ATP binding domain 4	Dominio de unión a ATP	1.53	0.005093
7921637	1	<i>CD84</i>	CD84 molecule	Respuesta inmune	1.56	0.005660
8039692	19	<i>ZNF552</i> <i>ZNF814</i> <i>ZNF587</i>	zinc finger protein 552 zinc finger protein 814 zinc finger protein 587	Proteínas de unión a DNA	1.81	0.006273
8112668	5	<i>GCNT4</i>	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4, core 2	Síntesis y ramificación de la mucina del tracto gastrointestinal	1.503	0.006502
7950447	11	<i>XRRA1</i> <i>RNF169</i>	X-ray radiation resistance associated 1 ring finger protein 169	Asociado a la resistencia a los efectos de los rayos X	1.64	0.009558

FC: Fold Change (número de veces de cambio); * Valor de P calculado con prueba de ANOVA.

Tabla suplementaria 4 (Continuación). Genes sobreexpresados con un FC > 1.50 y $P < 0.05$

Affymetrix ID	Cromosoma	Símbolo del gen	Gen	Función del gen	FC	<i>P</i>*
8135488	7	<i>LRRN3</i>	leucine rich repeat neuronal 3	Polimorfismos en este gen asociados a autismo; incrementa la activación de MAPK	1.71	0.011360
7951133	11	<i>MAML2</i>	mastermind-like 2 (Drosophila)	Desarrollo celular	1.64	0.015156
8035793	19	<i>ZNF737</i>	zinc finger protein 737	Proteína de unión a DNA	1.57	0.031441

FC: Fold Change (número de veces de cambio); * Valor de P calculado con prueba de ANOVA.

VNN1 Gene Expression Levels and the G-137T Polymorphism Are Associated with HDL-C Levels in Mexican Prepubertal Children

Leonor Jacobo-Albavera^{1,2}, Pablo I. Aguayo-de la Rosa^{1,2}, Teresa Villarreal-Molina³, Hugo Villamil-Ramírez^{1,2}, Paola León-Mimila^{1,2}, Sandra Romero-Hidalgo³, Blanca E. López-Contreras³, Fausto Sánchez-Muñoz⁴, Rafael Bojalil^{4,5}, Juan Antonio González-Barrios⁶, Carlos A. Aguilar-Salinas⁷, Samuel Canizales-Quinteros^{1,2*}

1 Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), Mexico City, Mexico, **2** Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico, **3** Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Mexico City, Mexico, **4** Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Mexico City, Mexico, **5** Departamento de Cuidado de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Xochimilco, Mexico City, Mexico, **6** Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional "Primer de Octubre", Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), Mexico City, Mexico, **7** Departamento de Endocrinología y Metabolismo, INCMNSZ, Mexico City, Mexico

VNN1 Gene Expression Levels and the G-137T Polymorphism Are Associated with HDL-C Levels in Mexican Prepubertal Children

Leonor Jacobo-Albavera^{1,2}, Pablo I. Aguayo-de la Rosa^{1,2}, Teresa Villarreal-Molina³, Hugo Villamil-Ramírez^{1,2}, Paola León-Mimila^{1,2}, Sandra Romero-Hidalgo³, Blanca E. López-Contreras³, Fausto Sánchez-Muñoz⁴, Rafael Bojalil^{4,5}, Juan Antonio González-Barríos⁶, Carlos A. Aguilar-Salinas⁷, Samuel Canizales-Quinteros^{1,2*}

1 Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), Mexico City, Mexico, **2** Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico, **3** Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Mexico City, Mexico, **4** Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Mexico City, Mexico, **5** Departamento de Cuidado de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Xochimilco, Mexico City, Mexico, **6** Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional “Primer de Octubre”, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), Mexico City, Mexico, **7** Departamento de Endocrinología y Metabolismo, INCMNSZ, Mexico City, Mexico

Abstract

Background: *VNN1* gene expression levels and the G-137T polymorphism have been associated with high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels in Mexican American adults. We aim to evaluate the contribution of *VNN1* gene expression and the G-137T variant to HDL-C levels and other metabolic traits in Mexican prepubertal children.

Methodology/Principal Findings: *VNN1* mRNA expression levels were quantified in peripheral blood leukocytes from 224 unrelated Mexican-Mestizo children aged 6–8 years (107 boys and 117 girls) and were genotyped for the G-137T variant (rs4897612). To account for population stratification, a panel of 10 ancestry informative markers was analyzed. After adjustment for admixture, the TT genotype was significantly associated with lower *VNN1* mRNA expression levels ($P = 2.9 \times 10^{-5}$), decreased HDL-C levels ($\beta = -6.19$, $P = 0.028$) and with higher body mass index (BMI) z-score ($\beta = 0.48$, $P = 0.024$) in the total sample. In addition, *VNN1* expression showed a positive correlation with HDL-C levels ($r = 0.220$; $P = 0.017$) and a negative correlation with BMI z-score ($r = -0.225$; $P = 0.015$) only in girls.

Conclusion/Significance: Our data suggest that *VNN1* gene expression and the G-137T variant are associated with HDL-C levels in Mexican children, particularly in prepubertal girls.

Citation: Jacobo-Albavera L, Aguayo-de la Rosa PI, Villarreal-Molina T, Villamil-Ramírez H, León-Mimila P, et al. (2012) *VNN1* Gene Expression Levels and the G-137T Polymorphism Are Associated with HDL-C Levels in Mexican Prepubertal Children. PLoS ONE 7(11): e49818. doi:10.1371/journal.pone.0049818

Editor: Amanda Ewart Toland, Ohio State University Medical Center, United States of America

Received: June 20, 2012; **Accepted:** October 16, 2012; **Published:** November 21, 2012

Copyright: © 2012 Jacobo-Albavera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by grant 85010 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, <http://www.conacyt.mx/Paginas/default.aspx>) and was partially supported by PAIP 4194-16. LJA is in the PhD Program from Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). LJA, HVR and PLM are recipients of the CONACyT scholarship number 195399, 244112 and 234714, respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: canis@servidor.unam.mx

Introduction

Low plasma levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) is the most common dyslipidemia in Mexican children and adults [1–3], which is modulated by both genetic and lifestyle factors [4,5]. Several genetic variants affecting HDL-C levels have been identified through candidate gene/genome-wide association studies (GWAS) and replicated in different populations [6–8]. However, relatively few genome-wide quantitative gene expression studies identifying expression quantitative trait loci (eQTLs) for HDL-C levels have been reported [9–12]. Interestingly, these studies have identified some genes associated with HDL-C levels not previously associated with this trait by GWAS. In this regard, Göring et al. [9] reported that Vanin 1 (*VNN1*) gene expression

levels showed the strongest correlation with HDL-C concentrations in lymphocytes of Mexican-American adults. Moreover, the authors also observed that the functional G-137T polymorphism (rs4897612) was associated with both *VNN1* expression levels and HDL-C concentrations in this population, even though the polymorphism had not been previously associated with HDL-C levels in GWAS performed mainly in Caucasians [6–8]. Although there is no direct evidence of the role of the *VNN1* protein in HDL-C levels regulation, it is known that *VNN1* codes for pantetheinase and produces cysteamine, a potent antioxidant that prevents lipid peroxidation [13,14] and has been associated with other metabolic traits such as obesity in animal models [15]. *VNN1* thus can be considered as a reasonable candidate gene to modulate HDL-C levels and perhaps other metabolic traits.

In addition to genetic variation, it is known that environmental factors may modify gene expression [16,17]. Because environmental exposure is likely to be not as relevant in children than in adults [18,19], we sought to replicate the *VNN1* expression association with the G-137T variant and HDL-C levels in a population sample of Mexican prepubertal children, and to assess whether *VNN1* expression is also associated with other metabolic traits.

Materials and Methods

Subjects

We analyzed 224 healthy unrelated school-aged Mexican-Mestizo children (107 boys and 117 girls) aged 6 to 8 years, recruited from a summer camp for children of employees of the Mexican Health Ministry (Convivencia Infantil 2008 and 2009, Secretaría de Salud). Weight, height and waist circumference were measured in all participants. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared. BMI z-scores were calculated using age and sex specific BMI reference data, as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention [20]. Fat mass percentage was measured using a bioelectric impedance method (Quantum \times impedance analyzer, RJL Systems, Detroit, MI). None of the participants had evidence of diabetes, thyroid, renal or liver disease. A parent of each child signed the consent form for participation. The project was approved by the Institutional Committee of Biomedical Research in Humans of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Biochemical Parameters

Blood samples were drawn from all participants after a 12-hour fast. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), HDL-C and ApoA1 plasma levels were measured at the INCMNSZ with commercially available standardized methods as described by Villarreal-Molina et al. [21]. Hypoalphalipoproteinemia (HA) was defined as HDL-C levels <40 mg/dL [22].

VNN1 mRNA Expression Analysis

Total RNA was extracted from leukocytes using TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). To avoid

DNA carryover, DNase treatment was performed with DNase I recombinant (Roche, Rotkreuz, Switzerland). To perform the expression analysis, 1000 ng of total RNA was reverse transcribed with TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) using random hexamers, according to the protocol recommended by the manufacturer. Real-time PCR was performed in a LightCycler 2.0 (Roche, Rotkreuz, Switzerland), using LNA TaqMan probes from the Universal Probe Library (Roche, Rotkreuz, Switzerland), in combination with intron-spanning specific primers as described previously [23]. The following primers and probes were used to assess *VNN1* gene expression in human leukocytes: tcttgaggtgttctgtagtg (forward), agcgtcgtcagttgacac (reverse), and probe #80 (cat. no. 04689038001). Hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*HPRT*) expression was measured as reference using *HPRT* primers tgatagatccattctatgactgtaga (forward), caagacattcttccagttaaagtg (reverse), and probe #22 (cat. no. 04688961001); β -actin (*ACTB*) was measured as reference using Universal ProbeLibrary Human *ACTB* Gene Assay (cat. no. 05046165001). All assays showed linearity and a coefficient of variation <10%. Relative quantification of gene expression was calculated with the LightCycler Software 4.0.

Single Nucleotide Polymorphisms Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Valencia, California). The *VNN1* G-137T variant was genotyped using the TaqMan assay C_29857881_10 (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System; Applied Biosystems, Foster City, CA). No discordant genotypes were observed in 30 duplicate samples analyzed by direct sequencing. *VNN1* G-137T genotype frequencies were tested for Hardy-Weinberg equilibrium, deviation was not observed in any group.

Because the Mexican population resulted from the admixture of mainly European (Spaniard) and Native American populations, it was necessary to assess whether any association could be confounded by population stratification. A panel of 10 ancestry informative markers (AIMs) distinguishing mainly Native American and European ancestry (δ for the minor allele >0.29), was screened in all participants (rs3340, rs1881826, rs2341823, rs4130405, rs1980888, rs1487214, rs726391, rs724729, rs292932 and rs1877751) [24,25]. Genotyping was performed using TaqMan assays (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System; Applied Biosystems, Foster City, CA). Genotyping call rates of each ancestry informative marker exceeded 95%, and no discordant genotypes were observed in 48 duplicate samples. No ancestry informative marker showed significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium.

Statistical Analysis

Because gene expression, HDL-C levels and the effect of some polymorphisms on metabolic traits are known to have gender differences [26–29], all analyses were performed on the entire sample and stratified by gender. Differences in anthropometric and biochemical parameters were analyzed using Student's t-test. Because *VNN1* gene expression and triglyceride levels were not normally distributed, they were log transformed for analysis. Correlations between *VNN1* gene expression and metabolic parameters were analyzed using Pearson's correlation and partial correlation was used to examine the correlations between gene expression and metabolic phenotypes adjusting for admixture. Differences in anthropometric and biochemical parameters according to G-137T genotype were tested by linear regression analysis. Associations were analyzed using additive (Table S1),

Table 1. Anthropometric and biochemical parameters according to gender.

Characteristic	Total subjects (224)	Boys (107)	Girls (117)	P ^a
Age, years	7.73 \pm 0.97	7.84 \pm 0.97	7.63 \pm 0.96	0.194
BMI z-score	0.99 \pm 0.98	1.0 \pm 1.0	0.98 \pm 0.97	0.846
FM, %	30.03 \pm 10.52	28.37 \pm 11.60	31.52 \pm 9.25	0.041
TG, mg/dL	98.03 \pm 59.09	90.95 \pm 50.38	104.50 \pm 65.62	0.087
TC, mg/dL	175.83 \pm 31.39	173.36 \pm 29.90	178.09 \pm 32.66	0.261
HDL-C, mg/dL	48.58 \pm 10.56	49.15 \pm 10.36	48.06 \pm 10.75	0.442
ApoA1, mg/dL	168.52 \pm 21.74	171.08 \pm 20.57	166.40 \pm 22.53	0.120
HA (%)	19.6	16.8	22.2	0.310 ^b

Data are means \pm s.d. or n (%). BMI, body mass index; FM, percent fat mass; TG, triglyceride; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; HA, hypoalphalipoproteinemia.

^aP-values were calculated by t-test;

^b χ^2 test.

doi:10.1371/journal.pone.0049818.t001

Table 2. Correlation of VNN1 mRNA levels in leukocytes with metabolic phenotypes.

Metabolic phenotypes	Whole Population (n = 224)			Boys (n = 107)			Girls (n = 117)		
	r	P	P ^a	r	P	P ^a	r	P	P ^a
BMI z-score	-0.144	0.032	0.034	-0.062	0.528	0.518	-0.225	0.015	0.015*
FM, %	-0.118	0.080	0.085	-0.068	0.490	0.525	-0.145	0.118	0.119
TG, mg/dL	-0.149	0.026	0.028	-0.062	0.525	0.576	-0.208	0.025	0.023
TC, mg/dL	-0.056	0.402	0.396	-0.047	0.631	0.643	-0.051	0.586	0.586
HDL-C, mg/dL	0.086	0.198	0.211	-0.071	0.465	0.448	0.220	0.017	0.017
ApoA1, mg/dL	0.042	0.546	0.566	-0.106	0.308	0.308	0.129	0.170	0.175

BMI, body mass index; FM, percent fat mass; TG, triglyceride; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol.

^aP-values adjusted for admixture.

*Significant after Bonferroni correction.

doi:10.1371/journal.pone.0049818.t002

dominant (Table S2) and recessive models for the T allele, being the recessive model the most significant. Comparison of VNN1 expression levels between G-137T genotypes was performed using Mann-Whitney U test. All statistical analyses were performed using SPSS version 15.0 (Chicago, IL) and a P-value of less than 0.05 was considered statistically significant. Genetic ancestry estimates were computed from genotypes for 10 AIMs using the program ADMIXMAP [30]. Because the Mexican-Mestizo population derived mainly from Native American and European populations, the model used included two primary parental populations. All analyses were adjusted for admixture and for BMI-z score when appropriate. To address multiple testing, we first determined the average pairwise correlation for all measurements (6 measurements, correlation = 0.38); with this correlation we calculated Bonferroni's correction using the freely available Simple Interactive Statistical Analyses Software (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/>) and a P-value below 0.017 was

considered significant. The study power to detect association of G-137T with HDL-C levels was estimated using QUANTO software (v1.2.4, <http://hydra.usc.edu/GxE/>) and reached 82.8%, assuming a recessive model with a minor allele (T) frequency of 0.35, beta for HDL-C levels of -6.19 (SE = 2.20) and sample size of 224 individuals. Statistical power stratified by gender was 53.5% for boys and 54.1% for girls.

Results

Anthropometric and Biochemical Characteristics

Table 1 describes the anthropometric characteristics and lipid profile of the children stratified by gender. Fat mass percentage was significantly higher in girls (P=0.041), but no significant gender differences in BMI-z score or lipid parameters were observed.

VNN1 Expression Analysis

VNN1 expression levels were not significantly correlated with HDL-C levels in the entire study population, but showed a significant negative correlation with BMI z-score and TG levels (P=0.032 and 0.026, respectively) (Table 2). On stratification according to gender, a significant positive correlation of VNN1 expression levels with HDL-C (P=0.017), and significant negative correlations with BMI z-score and TG levels were observed exclusively in girls (P=0.015 and P=0.025). All associations remained significant by further adjustment for admixture, but only the association with BMI-z score was significant after correction for multiple testing.

G137T Variant, VNN1 Expression Levels and Metabolic Parameters

The overall frequency of the T-137 allele was 35%. The TT genotype was significantly associated with lower VNN1 expression levels (P=2.9 × 10⁻⁵ after adjusting for admixture) (Figure 1). Multiple linear regression analyses to predict VNN1 expression levels revealed that only TT genotype contributed independently to explain 4.8% of the variance at VNN1 gene expression (P=0.004). In addition, the TT genotype was associated with lower HDL-C and ApoA1 levels (P=0.005 and 0.044, respectively), and with higher BMI z-score, percent fat mass, TG and TC levels in the whole sample (P<0.05, Table 3). After adjusting for BMI z-score and admixture, only associations with TC and HDL-C remained significant in the whole sample (P=0.034 and 0.028, respectively). On stratification according to gender, a significant

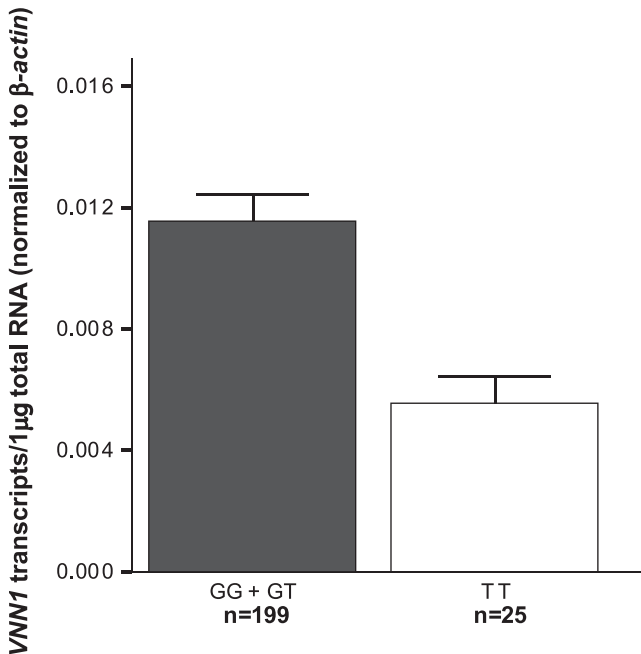


Figure 1. Effect of G-137T variant on VNN1 expression levels in Mexican prepubertal children. The results are presented as the global mean ± the standard error. doi:10.1371/journal.pone.0049818.g001

Table 3. Association of G-137T variant with metabolic parameters stratified by gender.

Parameters	All children (n = 224)			Boys (n = 107)			Girls (n = 117)		
	Effect (SE)	P	P ^a	Effect (SE)	P	P ^a	Effect (SE)	P	P ^a
BMI z-score	0.48 (0.21)	0.024	0.024	0.69 (0.36)	0.061	0.063	0.38 (0.26)	0.146	0.156
FM, %	5.66 (2.25)	0.012	0.012*	6.45 (4.24)	0.131	0.123	4.56 (2.46)	0.067	0.072
TG, mg/dL	25.76 (12.45)	0.040	0.194	-1.65 (17.63)	0.926	0.371	39.53 (17.34)	0.024	0.079
TC, mg/dL	16.35 (6.58)	0.014	0.034	10.64 (10.41)	0.309	0.423	18.93 (8.64)	0.031	0.057
HDL-C, mg/dL	-6.19 (2.20)	0.005	0.028	-2.10 (3.62)	0.562	0.994	-8.47 (2.80)	0.003	0.010*
ApoA1 mg/dL	-9.66 (4.77)	0.044	0.093	-5.95 (8.72)	0.497	0.969	-12.44 (5.98)	0.040	0.093

Effect values are presented as effect for two T copies (recessive model), standard error (SE). Genotype frequencies: all children (GG, 41.1%; GT, 47.7%; TT, 11.2%); boys (GG, 42.1%; GT, 49.5%; TT, 8.4%); girls (GG, 40.2%; GT, 46.1%; TT, 13.7%). BMI, body mass index; FM, percent fat mass; TG, triglyceride; TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol.

^aP-values adjusted for admixture in all tests and for BMI z-score when appropriate.

*Significant after Bonferroni correction.

doi:10.1371/journal.pone.0049818.t003

association of TT genotype with lower HDL-C levels was observed exclusively in girls ($P=0.010$).

Discussion

Several epidemiological studies report that the onset of metabolic disease is occurring at increasingly earlier ages [31,32]. In the Mexican population, low HDL-C levels is the most common dyslipidemia in both adults and adolescents [1–3], and was also found to be common in prepubertal children aged 6–8 years (20%), showing that low HDL-C levels are present since childhood in this population.

Several studies have shown that variation in gene expression is probably an important mechanism influencing HDL-C levels [9–11,33]. Göring et al. observed that *VNN1* expression levels showed the strongest correlation with HDL-C concentrations in lymphocytes of Mexican-American adults, ($r=0.28$, $P=4 \times 10^{-9}$). Similarly, we observed a positive correlation of *VNN1* expression levels in leukocytes with HDL-C levels in Mexican prepubertal children, which was significant only in girls ($r=0.22$, $P=0.017$). We also observed a negative correlation of *VNN1* expression levels with triglyceride levels and BMI z-score in the whole sample, again with gender-specific differences. Although the mechanism by which *VNN1* function may affect these metabolic traits is largely unknown, there is experimental evidence that Vanin 1 is a central regulator of lipid biosynthesis by controlling the flux through the fatty acid and/or cholesterol biosynthetic pathways [34]. Because to our knowledge this is the only study analyzing the effects of *VNN1* expression levels on metabolic traits in children, further studies are required to confirm this finding and to further characterize the gender differences observed.

The *VNN1* T-137 allele frequency in the Mexican children population (35%) was similar to the 33% frequency reported in Mexican-American population and lower than in European populations (67%) [35]. Several studies have reported an effect of genetic ancestry on both global gene expression and associations of gene variants with disease [36,37]. Because the Mexican population is the result of admixture, mainly of Spanish and Native American populations [25,38], we included ancestry as a confounding factor to test for associations. Although the panel of AIMs analyzed is small (10 AIMs), the mean admixture proportions of the population were estimated as 65% Native American and 35% European, in agreement with previous studies in the population of Mexico City using 69 AIMs [25]. All

associations reported in the present study remained significant after adjusting for admixture, suggesting that population stratification was not an important confounding factor in our analysis.

The TT genotype was significantly associated with lower *VNN1* expression and HDL-C levels, in accordance with the findings of Göring et al. in Mexican-American adults. Although experimental evidence strongly supports that this promoter polymorphism has functional consequences with respect to binding transcription factors [9], this genotype contributed independently to explain only 4.8% of the variance at *VNN1* gene expression. While this is consistent with the previously reported range of the effect of SNPs on gene expression variability [11], the genetic and environmental factors explaining most of *VNN1* gene expression variability remain to be determined.

Interestingly, associations of the TT genotype with higher TG and TC levels were observed in girls. However, these associations lost significance after adjusting for BMI z-score, suggesting they may be mediated by an effect on body fat. To our knowledge, there is no previous experimental evidence of the role of *VNN1* in human adipocyte function, however it was identified as an obesity-related gene in mice [15] and is known to induce lipolysis in rat adipose tissue [39]. Because *VNN1* gene variants have not been previously found to be associated with obesity in GWAS [40,41] and because the sample number analyzed here is reduced, these associations should be interpreted with caution. Additional studies are required to confirm and further understand the role of *VNN1* in human obesity.

The gender differences observed are noteworthy, particularly because it involved prepubertal children. Mexican prepubertal girls showed significantly higher fat mass percentage than boys, which could explain at least part of the gender differences observed for genetic associations and correlations. Gender differences in the effect of polymorphisms on lipid traits have been previously observed in prepubertal children [28], apparently explained by dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) level variation [42]. Because we did not measure DHEA-S levels, we cannot rule out whether this factor modulates the effect of *VNN1* gene expression levels and the G-137T variant on metabolic traits in this study.

In conclusion, our data suggest that *VNN1* gene expression levels and the G-137T variant are associated with lipid traits (particularly HDL-C levels) in Mexican prepubertal girls. However, these results should be interpreted with caution and further studies with larger samples sizes are required to confirm these findings.

Supporting Information

Table S1 Association of G-137T variant with metabolic parameters stratified by gender (additive model).

(DOC)

Table S2 Association of G-137T variant with metabolic parameters stratified by gender (dominant model).

(DOC)

References

- Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Gómez Pérez FJ, et al. (2001) High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 42: 1298–307.
- Posadas-Sánchez R, Posadas-Romero C, Zamora-González J, Mendoza-Pérez E, Cardoso-Saldaña G, et al. (2007) Lipid and lipoprotein profiles and prevalence of dyslipidemia in Mexican adolescents. *Metabolism* 56: 1666–72.
- Flores-Dorantes T, Arellano-Campos O, Posadas-Sánchez R, Villarreal-Molina T, Medina-Urrutia A, et al. (2010) Association of R230C ABCA1 gene variant with low HDL-C levels and abnormal HDL subclass distribution in Mexican school-aged children. *Clin Chim Acta* 411: 1214–7.
- Qasim A, Rader DJ (2006) Human genetics of variation in high-density lipoprotein cholesterol. *Curr Atheroscler Rep* 8: 198–205.
- Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC (2004) Genetic basis of atherosclerosis: part II: clinical implications. *Circulation* 110: 2066–71.
- Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, et al. (2008) Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet* 40: 161–69.
- Kooner JS, Chambers JC, Aguilar-Salinas CA, Hinds DA, Hyde CL, et al. (2008) Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides. *Nat Genet* 40: 149–51.
- Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, et al. (2008) Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet* 40: 189–97.
- Göring HH, Curran JE, Johnson MP, Dyer TD, Charlesworth J, et al. (2007) Discovery of expression QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes. *Nat Genet* 39: 1208–16.
- Ma J, Dempsey AA, Stamatou D, Marshall KW, Liew CC (2007) Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects. *Atherosclerosis* 191: 63–72.
- Zeller T, Wild P, Szymczak S, Rotival M, Schillert A, et al. (2010) Genetics and beyond—the transcriptome of human monocytes and disease susceptibility. *PLoS One* 5: e10693.
- Inouye M, Silander K, Hamalainen E, Salomaa V, Harald K, et al. (2010) An immune response network associated with blood lipid levels. *PLoS Genet* 6: e1001113.
- Yamazaki K, Kuromitsu J, Tanaka I (2002) Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 1114–22.
- Di Leandro L, Maras B, Schinina ME, Dupré S, Koutris I, et al. (2008) Cystamine restores GSTA3 levels in vanin-1 null mice. *Free Radic Biol Med* 44: 1088–96.
- Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, et al. (2005) An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nature Genet* 37: 710–7.
- Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, Goyenechea E, Larrarte E, et al. (2008) Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. *OMICS* 12: 251–61.
- Idaghdour Y, Storey JD, Jadallah SJ, Gibson G (2008) A genome-wide gene expression signature of environmental geography in leukocytes of Moroccan Amazighs. *PLoS Genet* 4: e1000052.
- Brown WM, Beck SR, Lange EM, Davis CC, Kay CM, et al. (2003) Framingham Heart Study. Age-stratified heritability estimation in the Framingham Heart Study families. *BMC Genet* 4 Suppl 1: S32.
- Dumitrescu L, Brown-Gentry K, Goodloe R, Glenn K, Yang W, et al. (2011) Evidence for age as a modifier of genetic associations for lipid levels. *Ann Hum Genet* 75: 589–97.
- Kuczumarski RJ, Ogdan CL, Guo SS, Grummer-Strawn LM, Flegal KM, et al. (2002) 2000 CDC growth charts for the United States: methods and development. *Vital Health Stat* 246: 1–190.
- Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Companan M, et al. (2007) 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* 56: 1881–7.
- Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents (2011) Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. *Pediatrics* 128 Suppl 5: S213–56.
- Mouritzen P, Noerholm M, Nielsen PS, Jacobsen N, Lomholt C, et al. (2005) ProbeLibrary: a new method for faster design and execution of quantitative real-time PCR. *Nat Methods* 2: 313–316.
- Bonilla C, Parra EJ, Pfaff CL, Dios S, Marshall JA, et al. (2004) Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Ann Hum Genet* 68: 139–53.
- Martínez-Marignac VL, Valladares A, Cameron E, Chan A, Perera A, et al. (2007) Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of type 2 diabetes genetic risk factors. *Hum Genet* 120: 807–19.
- Ellegren H, Parsch J (2007) The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat Rev Genet* 8: 689–98.
- Feitosa MF, Myers RH, Pankow JS, Province MA, Borecki IB (2009) LIPC variants in the promoter and intron 1 modify HDL-C levels in a sex-specific fashion. *Atherosclerosis* 204: 171–7.
- López-Simón L, de Oya M, Lasunción MA, Riestra P, Benavente M, et al. (2009) Genetic determinants of plasma HDL-cholesterol levels in prepubertal children. *Clin Chim Acta* 403: 203–6.
- Weiss LA, Pan L, Abney M, Ober C (2006) The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in humans. *Nat Genet* 38: 218–22.
- Hoggart CJ, Parra EJ, Shriver MD, Kittles RA, Clayton DG, et al. (2003) Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *Am J Hum Genet* 72: 1492–504.
- Saland JM (2007) Update on the metabolic syndrome in children. *Curr Opin Pediatr* 19: 183–91.
- Nathan BM, Moran A (2008) Metabolic complications of obesity in childhood and adolescence: more than just diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15: 21–9.
- Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M (2009) Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet* 10: 184–94.
- Kaskow BJ, Proffitt JM, Blangero J, Moses EK, Abraham LJ (2012) Diverse biological activities of the vascular non-inflammatory molecules - the Vanin pantetheinases. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 653–8.
- International HapMap Consortium. The International HapMap Project (2003) *Nature* 426: 789–96.
- Storey JD, Madeoy J, Strout JL, Wurfel M, Ronald J, et al. (2007) Gene-expression variation within and among human populations. *Am J Hum Genet* 80: 502–9.
- Yang HC, Wang PL, Lin CW, Chen CH, Chen CH (2012) Integrative analysis of single nucleotide polymorphisms and gene expression efficiently distinguishes samples from closely related ethnic populations. *BMC Genomics* 13: 346.
- Lisker R, Ramirez E, Briceno RP, Granados J, Babinsky V (1990) Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 62: 791–801.
- Bocos C, Herrera E (1998) Pantethine stimulates lipolysis in adipose tissue and inhibits cholesterol and fatty acid synthesis in liver and intestinal mucosa in the normolipidemic rat. *Environ Toxicol Pharmacol* 6: 59–66.
- Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, et al. (2009) Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* 41: 18–24.
- Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, et al. (2010) Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 42: 937–48.
- Garcés C, Benavente M, Cano B, Vitorro E, Ortega H, et al. (2003) Effects of dehydroepiandrosterone-sulfate on the ApoE genotype influence on plasma lipid levels in prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3997–4000.

Acknowledgments

We thank Salvador Ramírez-Jiménez and Luz E. Guillén-Pineda for their technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LJA SCQ. Performed the experiments: LJA PIAR HVR PLM. Analyzed the data: LJA PIAR SRH SCQ. Contributed reagents/materials/analysis tools: BELC FSM RB JAGB CAAS. Wrote the paper: LJA PIAR TVM SCQ.