



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PARTICIPACIÓN DE POLIMORFISMOS COMUNES IDENTIFICADOS A TRAVÉS
DE GWAS EN LA MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE C-HDL EN POBLACIÓN
MEXICANA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
QFB MÓNICA MUÑOZ VEGA

TUTOR PRINCIPAL
DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
FACULTAD DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ANGEL ZARAIN HERZBERG
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D. F. Enero, 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.

Este trabajo fue realizado en en la Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud de la Facultad de Química, UNAM y del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por el aprendizaje y por compartir su experiencia durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Marcela Lizano Soberón y al Dr. Ángel Zaráin Herzberg por su crítica constructiva y su asesoría como miembros de mi comité tutor.

A la Dra. Leonor Jacobo Albavera por su asesoría, colaboración y apoyo a lo largo de estos dos años de trabajo.

A todos los compañeros de la Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud por su apoyo en la captación de muestras así como en la última fase de trabajo experimental.

A los miembros del jurado: Dr. Antonio Velázquez Arellano, Dr. Felipe Cruz García, Dra. Patricia Canto Cetina, Dr. José Pedraza Chaverri y Dr. Armando Tovar Palacio por la asesoría y revisión de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

DEDICATORIAS

A mis padres, Esteban y Ángeles, por enseñarme que la honestidad, el esfuerzo y la dedicación son siempre el mejor camino para andar en la vida y la base para todo éxito. A ellos debo lo que hoy soy como persona y profesionalista.

A Juan Esteban, por escucharme y darme consejos para no dejarme vencer ante la adversidad.

A Luis Ángel, por acompañarme en gran parte de mi carrera profesional, por creer en mí más de lo que yo creo en mí misma.

A todos mis amigos, que en las diferentes etapas de la vida me han acompañado. Gracias por su paciencia, por los buenos momentos, por el apoyo incondicional: Claudia, Belém, José Manuel, Nidia, René, Sergio, Alberto, Norma y Nadia.

A la UNAM, mi alma mater, por la oportunidad que me da todos los días de aprender algo nuevo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN	11
<i>Generalidades</i>	11
<i>Metabolismo y funciones de las HDL</i>	12
a) Propiedades antioxidantes de las HDL	12
b) Propiedades antiinflamatorias de las HDL	13
c) Propiedades antitrombóticas de las HDL	15
d) Papel de las HDL en el transporte reverso del colesterol	16
<i>Subfracciones de las HDL</i>	18
<i>Hipoalfalipoproteinemia en México y sus asociaciones con patologías metabólicas</i>	19
<i>Heredabilidad</i>	20
<i>Estrategias para identificación de determinantes genéticas asociadas a niveles de C-HDL</i>	21
a) Estudios de genes candidato	21
b) Análisis de locus para rasgos cuantitativos (QTLs)	22
c) Estudios de asociación del genoma completo (GWAS)	23
<i>Antecedentes directos</i>	27
a) Gen <i>CETP</i>	27
b) Gen <i>LIPC</i>	30
c) Gen <i>LPL</i>	30

d) Gen <i>LIPG</i>	31
e) Gen <i>APOA5</i>	32
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	35
<i>Objetivo general</i>	35
<i>Objetivos particulares</i>	35
METODOLOGÍA	36
<i>Grupos de población mexicana</i>	36
Niños mestizos	36
Adultos mestizos	36
Adultos indígenas	37
<i>Selección de SNPs</i>	37
<i>Determinación de parámetros bioquímicos</i>	38
a) <i>Medición de subfracciones de C-HDL en población infantil</i>	39
b) <i>Extracción de DNA genómico</i>	40
c) <i>Genotipificación de las variantes seleccionadas</i>	40
<i>Genotipificación de 40 marcadores informativos de ancestría: primer grupo de adultos mestizos</i>	40
<i>Análisis estadístico</i>	41
RESULTADOS	43
<i>Asociación de variantes seleccionadas con los niveles de C-HDL</i>	43
<i>Asociación con la hipoalfalipoproteinemia</i>	46
<i>Asociación con los niveles de Subfracciones de C-HDL</i>	49
<i>Efecto Combinado de los 4 Alelos de Riesgo</i>	49
<i>Asociación de las variantes seleccionadas con otros lípidos Sanguíneos</i>	51
<i>Efecto de la ancestría en las asociación con los niveles de lípidos sanguíneos</i>	52
DISCUSIÓN	54
<i>Parámetros bioquímicos</i>	54

<i>Contribución de las variantes genéticas a la variación de los niveles de C-HDL</i>	54
<i>Polimorfismo rs3764261</i>	54
<i>Polimorfismo rs1800588</i>	56
<i>Polimorfismo rs328</i>	57
<i>Polimorfismo rs7241918</i>	58
<i>Polimorfismo rs964184</i>	58
<i>Resultados Globales</i>	60
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	64
REFERENCIAS	65
ANEXOS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Transporte reverso del colesterol.	17
Figura 2. Efecto combinado de los 4 alelos de riesgo.	50

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Polimorfismos asociados a los niveles de C-HDL en población europea con la mayor significancia estadística.	26
Tabla 2. Polimorfismos seleccionados.	38
Tabla 3. Tamaño de las subfracciones de C-HDL	39
Tabla 4. Resultados del análisis de asociación para C-HDL	45
Tabla 5. Asociación de los polimorfismos seleccionados con la hipoalfalipoproteinemia	48
Tabla 6. Análisis para la suma de alelos que disminuyen el C-HDL	50
Tabla 7. Análisis de asociación de las variantes estudiadas con los niveles de triglicéridos	52
Tabla 8. Efecto de la mezcla étnica en el análisis de asociación	53

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

	Páginas
Tabla 9. Características bioquímicas y antropométricas de los grupos de población mexicana estudiados	77
Tabla 10. Comparación de frecuencias alélicas de los grupos de población mexicana analizados y poblaciones de referencia del HAPMAP	78
Tabla 11. Subfracciones de HDL de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs3764261 del gen <i>CETP</i> .	79
Tabla 12. Subfracciones de HDL de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs1800588 del gen <i>LIPC</i> .	80
Tabla 13. Subfracciones de HDL de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs328 del gen <i>LPL</i> .	80
Tabla 14. Subfracciones de HDL de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs7241918 del gen <i>LIPG</i> .	81
Tabla 15. Subfracciones de HDL de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs9641184 del gen <i>APOA5</i> .	81

RESUMEN

Los niveles bajos de colesterol-HDL (C-HDL) representan la dislipidemia más prevalente en la población infantil y adulta mestiza mexicana, así como en distintos grupos indígenas. Hasta la fecha, no existen estudios que evalúen la contribución de las variantes genéticas comunes en la modulación de los niveles de C-HDL en distintos grupos de población mexicana.

Estudios de asociación del genoma completo (GWAs por sus siglas en inglés), principalmente en poblaciones de origen europeo, han identificado al menos 30 genes asociados a la variación de los niveles plasmáticos de C-HDL, siendo las variantes localizadas en los genes que participan en el transporte reverso del colesterol como: *CETP*, *LIPC*, *LPL*, *LIPG* y *APOA5*, las que han mostrado asociaciones más significativas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación de polimorfismos comunes de los genes *CETP* (rs3764261), *LIPC* (rs1800588), *LPL* (rs328), *LIPG* (rs7241918) y *APOA5* (rs964194) en la modulación de los niveles de C-HDL en grupos de población infantil y adulta mestiza así como en población indígena mexicana.

Se incluyó la participación de 3 879 sujetos: 1200 niños mestizos con edades de 6 a 12 años, 2276 adultos mestizos con edades de 18 a 62 años, ambos grupos conformados por individuos no relacionados residentes de la ciudad de México y 403 adultos indígenas (237 nahuas y 166 totonacas) con edades de 18-70 años, residentes de las zonas rurales de los estados de Puebla, Morelos y Veracruz. Se genotipificaron cinco variantes posiblemente funcionales de los genes *CETP* (rs3764261), *LIPC* (rs1800588), *LPL* (rs328), *LIPG* (rs7241918) y *APOA5* (rs964194) además de 40 marcadores informativos de ancestría en 1293 sujetos de población adulta mestiza.

Cuatro de las cinco variantes ubicadas en los genes *CETP*, *LIPC*, *LPL* y *APOA5* mostraron asociación con los niveles de C-HDL en al menos uno de los grupos de estudio ($P < 0.01$). De manera interesante, las variantes localizadas en los genes *CETP* (rs3764261) y *APOA5* (rs964194) presentaron asociación con los niveles de C-HDL en los tres grupos de población mexicana analizados (*CETP* rs3764261, $P = 4.94 \times 10^{-9}$, $P = 3.25 \times 10^{-5}$ y $P = 5.30 \times 10^{-5}$; *APOA5* rs964194, $P = 0.001$, $P = 3.35 \times 10^{-5}$ y $P = 0.005$ para niños mestizos, adultos mestizos y adultos indígenas respectivamente). El ajuste por mezcla étnica no modificó la asociación observada con los niveles de C-HDL. Además la variante rs964194 de *APOA5* se asoció significativamente a niveles elevados de triglicéridos en niños y adultos mestizos,

pero no en el grupo de adultos indígenas ($P=7.51 \times 10^{-10}$, $P=1.176 \times 10^{-7}$ y $P=0.419$ para niños mestizos, adultos mestizos y adultos indígenas respectivamente).

El alelo de riesgo de *APOA5* asociado a niveles bajos de C-HDL y niveles elevados de triglicéridos presentó una frecuencia significativamente más alta en la población indígena (51%) y mestiza (37%), comparada con la población europea (12%), lo que sugiere que contribuye de manera importante en la alta prevalencia de dislipidemias en la población mexicana.

Este estudio confirma la participación de 4 variantes en los genes *CETP*, *LIPC*, *LPL* y *APOA5* en la modulación de los niveles de C-HDL en la población mexicana. Estas variantes genéticas contribuyen de manera importante en la modulación de los niveles de C-HDL desde la infancia y en condiciones ambientales distintas (poblaciones urbanas y rurales). Además, en conjunto explican hasta un 20% de la variación de los niveles de C-HDL en la población infantil, adulta e indígena de México.

ABREVIATURAS

nm	Nanómetros
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
PON1	Paraoxonasa-1
PAF-AH	Acetil hidrolasa de factor de agregación plaquetaria
VCAM-1	molécula de adhesión de células vasculares uno (VCAM-1)
SRB1	Receptor basurero tipo B1
PDZK1	Proteína adaptadora del receptor basurero tipo B1
PI3	Fosfoinositol-3
CD11b	Cúmulo de diferenciación 11b
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
LPS	Lipopolisacárido
ABCA1	Casette de unión a adenosin trinucleótido fosfato
STAT-3	transductor de señal y activador de la transcripción 3
eNOS	Sintasa endotelial de óxido nítrico
NO	Óxido nítrico
PGI1-2	Prostaciclina 1-2
TRC	Trasporte reverso del colesterol
LCAT	Lecitin colesterol acil transferasa
CL	Colesterol Libre
EC	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos
LPL	Lipasa lipoproteíca
LH	Lipasa hepática
LE	Lipasa endotelial
APOA5	Apolipoproteína A5
QTLs	Locus para rasgos cuantitativos/ Quantitative trait loci
GWAS	Análisis de Asociación del Genoma Completo/ Genome Wide Association Studies
HAPMAP	Mapa de haplotipos/ Proyecto HAPMAP
mg/dL	Miligramos por decilitro
CT	Colesterol total
C-HDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
C-LDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad
TG	Triglicéridos
HA	Hipoalfalipoproteinemia

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Los lípidos representan la reserva energética por excelencia de los organismos vivos, componentes estructurales de las membranas celulares ya que modulan su fluidez por lo que están involucrados en la activación de múltiples vías de señalización; precursores de importantes moléculas biológicas como las hormonas esteroideas, de las moléculas inflamatorias como los leucotrienos y otros derivados de ácido araquidónico y son componentes estructurales del tejido nervioso permitiendo una alta velocidad de conducción de los impulsos eléctricos.

Dentro de este grupo de moléculas destacan los triglicéridos y el colesterol, precursores estructurales de casi todas las moléculas lipídicas. La síntesis y homeostasis de los lípidos se encuentran altamente reguladas, además, el aporte dietario de estas moléculas juega un papel fundamental para la fisiología de los seres vivos. Lo anterior implica un sofisticado sistema de transporte hacia los tejidos, en el cual las lipoproteínas juegan un papel clave debido a su carácter hidrofóbico que contrasta con el medio acuoso celular (Yokoyama 2006).

Las lipoproteínas son un grupo de complejos moleculares circulantes en el plasma que constituyen los principales vehículos del transporte de colesterol y triglicéridos cuya síntesis ocurre principalmente en el hígado y el intestino delgado. Por sus características fisicoquímicas, las lipoproteínas se definen como microemulsiones con un diámetro que oscila entre los 7 y los 600 nm. Su estructura se encuentra conformada por un núcleo de lípidos neutros, principalmente triglicéridos, ésteres de colesterol, que se encuentran estabilizados por una superficie monomolecular de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas formando así una región anfipática.

Las lipoproteínas son clasificadas según su densidad, a mayor densidad mayor contenido relativo de proteínas. De acuerdo con lo anterior, podemos enumerarlas en orden ascendente de densidad de la siguiente manera: los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de densidad

intermedia (IDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Jonas and Phillips,2008) . Estas últimas son el tema principal del presente trabajo.

Metabolismo y funciones de las HDL

Las HDL son un grupo de agregados moleculares que, como se mencionó anteriormente, constituyen la fracción lipoproteica más densa del plasma (7.21-12.93 nm). Su composición proteica es muy diversa; sin embargo, las moléculas más abundantes son la apolipoproteína AI y la apolipoproteína AII. La primera de ellas constituye hasta un 70% de la fracción proteica mientras que la segunda representa alrededor de un 15%. El porcentaje restante está compuesto principalmente por enzimas y otras apolipoproteínas menos abundantes. Estudios proteómicos estiman que hasta 100 proteínas diferentes pueden formar parte de la estructura de las HDL. Sin embargo, las menos abundantes sólo se encuentran en un pequeño grupo de partículas lo que incrementa la heterogeneidad de estas lipoproteínas (Florentin, Liberopoulos et al. 2008, Rye, Bursill et al. 2009).

Diversos estudios epidemiológicos, en modelos animales e in vitro han mostrado evidencia de que las HDL tienen funciones antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas y tienen un papel fundamental en el proceso de transporte reverso del colesterol (Florentin, Liberopoulos et al. 2008, Boes, Coassin et al. 2009).

a) Propiedades antioxidantes de las HDL

La actividad antioxidante de las HDL esta mediada principalmente por la inhibición de la oxidación de las LDL (Navab, Ananthramaiah et al. 2004), ello tiene como consecuencia una disminución de la captura de estas moléculas oxidadas por parte del sistema monocito-macrófago (Nicholls, Dusting et al. 2005). La acumulación de las LDL oxidadas es considerada el mayor factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis. Este fenómeno es promovido por la acumulación de

radicales libres, los cuales provocan importantes modificaciones tanto estructurales como funcionales en estas moléculas. Dichas modificaciones ocasionan un desbalance en la depuración de las LDL debido a que su estado oxidado impide el reconocimiento por parte de sus receptores hepáticos, lo cual incrementa la concentración de estas lipoproteínas modificadas en circulación (Steinbrecher, Zhang et al. 1990). Las LDL oxidadas son captadas de manera preferencial por los macrófagos y las células musculares localizadas en la pared vascular, lo cual desencadena cambios en procesos clave como la proliferación, migración e inflamación (Stocker and Keaney 2004).

A través de diversos estudios se ha demostrado que tanto la apolipoproteína AI, como la apolipoproteína AII, las proteínas más abundantes en la estructura de las HDL, reducen los hidroperóxidos lipídicos presentes en las LDL oxidadas, a través de la oxidación de puentes disulfuro presentes en su estructura y en consecuencia reduciendo la lipotoxicidad (Garner, Waldeck et al. 1998, Ribas, Sanchez-Quesada et al. 2004). Otro mecanismo por el cual las HDL llevan a cabo funciones antioxidantes es mediado por las enzimas presentes en su estructura, y la paraoxonasa-1 (PON1) es su principal enzima antioxidante. La PON1 ha sido asociada con una disminución significativa del riesgo de padecer aterosclerosis tanto en individuos con dislipidemias como en diabéticos (Mackness, Harty et al. 1991, Mackness, Durrington et al. 2002). La actividad de la PON1 consiste en hidrolizar ácidos grasos oxidados dando como resultado la disminución de estos compuestos en las partículas de LDL (Precourt, Amre et al. 2011).

Otra enzima importante para los efectos antioxidantes de las HDL es la acetil hidrolasa del factor de activación plaquetaria (PAF-AH), cuya función consiste en hidrolizar al factor de activación plaquetaria (PAF) de manera dependiente de calcio (Yost, Weyrich et al. 2010). Un aumento en la presencia de esta enzima en las partículas de las HDL se ha asociado a un incremento en la cantidad de lípidos proterogénicos.(Cao, Stafforini et al. 1998, Memon, Fuller et al. 1999)

b) Propiedades antiinflamatorias de las HDL

Las HDL presentan propiedades antiinflamatorias en las células del endotelio vascular y los leucocitos. Esto se debe a que inhiben la expresión de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión de células vasculares uno (VCAM-1) todo ello vía el receptor basurero B1 (SR-B1), su proteína adaptadora PDZK1, la cinasa de fosfoinositol-3 (PI3) y la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) (Cockerill, Rye et al. 1995, Kimura, Tomura et al. 2006). Si bien, el proceso anterior es un efecto indirecto, las HDL cumplen con funciones antiinflamatorias de manera directa, ya que disminuyen la activación de monocitos-macrófago y de neutrófilos (Murphy, Woollard et al. 2008, Murphy, Woollard et al. 2011). Ello ocurre como consecuencia de la reducción en la disponibilidad de lípidos importantes en la señalización de las células de la respuesta inmune como el acetato de miristato forbol, el cual induce la expresión de la integrina CD11b y es acarreado por las HDL (Murphy, Woollard et al. 2008). Además, reduce la producción de citocinas mediante la disminución de la unión de receptores de linfocitos T a los monocitos (Carpintero, Gruaz et al. 2010).

Algunos estudios recientes señalan que las HDL modulan la respuesta inmune adaptativa ya que modifican la cantidad de colesterol presente en las balsas lipídicas de las células que expresan el complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) como los linfocitos T, los linfocitos B y los macrófagos (Anderson, Hiltbold et al. 2000, Norata, Pirillo et al. 2012). Las balsas lipídicas son microdominios membranales compuestos principalmente por colesterol y esfingolípidos y existe evidencia de que la expresión tanto de MHC-II así como un amplio número de moléculas de la respuesta inmune dependen de su presencia en la membrana para ser expresadas de manera adecuada. Es decir, a menor cantidad de colesterol debido a mayores concentraciones de HDL plasmático, menor colesterol disponible para conformar las balsas lipídicas y menor MHC-II expresado (Wang, Yuan et al. 2012). Todo lo anterior representa la necesidad de una mayor cantidad de antígeno para activar la respuesta de los linfocitos disminuye la activación de esta estirpe celular.

Por otra parte, la apolipoproteína AI disminuye la diferenciación de monocitos a células dendríticas (Kim, Lim et al. 2005). En los macrófagos esta apolipoproteína reduce la inducción de citocinas por lipopolisacárido (LPS), ello es llevado a cabo a través del transportador cassette de unión a adenosin trinucleótido fosfato (ABCA1) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 STAT3 (Tang, Liu et al. 2009).

c) Propiedades antitrombóticas de las HDL

Las HDL llevan a cabo funciones antitrombóticas principalmente a través de varios mecanismos. El primero de ellos es mediante su papel como agonista de la eNOS lo que provoca una mayor biodisponibilidad de óxido nítrico (NO). Estudios en ratones revelaron que el receptor SR-B1 es el mediador de la activación de la eNOS por parte de las HDL (Yuhanna, Zhu et al. 2001). El óxido nítrico es un potente vasodilatador y es producido por sus sintasas a partir de L-arginina obteniendo L-citrulina como subproducto (Shaul 2002).

Existe evidencia de que el NO inhibe la liberación de los llamados cuerpos Weibel-Palade. Estas estructuras son gránulos presentes en las células del endotelio vascular que contienen principalmente p-selectina y factor de von Willebrand, éste último fundamental para la respuesta hemostática (Matsushita, Morrell et al. 2003, Brill, Fuchs et al. 2011). Otro mecanismo por el cual las HDL llevan a cabo sus funciones antitrombóticas es mediante la enzima PAF-AH, la cual también participa en las funciones antioxidantes de las HDL. La PAF-AH disminuye la liberación de PAF hacia las plaquetas, lo cual evita su activación y su posterior agregación.

Las HDL también disminuyen la producción de tromboxano A₂, potente agregante plaquetario y vasoconstrictor derivado del ácido araquidónico (Oravec, Demuth et al. 1998). Además, aumentan la liberación de prostaciclina I-2 (PGI₁₋₂) en las células del endotelio vascular, la cual también presenta actividad vasodilatadora a

través de la apolipoproteína AI y la esfingosina-1-fostato presentes en las HDL (Fleisher, Tall et al. 1982, Kobayashi, Tahara et al. 2004).

d) Papel de las HDL en el transporte reverso del colesterol

El transporte reverso del colesterol (TRC) se define como el proceso mediante el cual el colesterol excedente de las células que forman los tejidos periféricos y órganos, incluyendo a los macrófagos en los vasos sanguíneos, es transportado al hígado para su remoción a través de su excreción como esteroides neutros o ácidos biliares en las heces (Taskinen 2003, Lewis and Rader 2005) .

Este proceso se inicia mediante la interacción de apolipoproteína AI, sintetizada en el hígado y el intestino, con el receptor ABCA1 lo cual promueve la lipidación de ésta con colesterol y fosfolípidos. A este primer complejo lipoproteico se le denomina HDL nacientes o HDL discoidales, las cuales son pobres en lípidos. Estas primeras HDL son modificadas mediante la acción de la enzima lectin colesterol acil tranferasa (LCAT) la cual, como su nombre lo indica, esterifica el colesterol libre (CL) dando lugar a moléculas más hidrófobas, los ésteres de colesterol (EC) se trasladan al núcleo de las partículas de HDL formando así las HDL esféricas o maduras, predominantes en el plasma.

Estas partículas maduras pueden ser remodeladas y modificadas por una serie de enzimas. La proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) promueve el intercambio de EC provenientes de las HDL por triglicéridos acarreados por las lipoproteínas ricas en apolipoproteína B-100 como las VLDL e IDL. De manera similar, la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) lleva a cabo la transferencia de fosfolípidos entre las VLDL y las HDL aumentando el contenido lipídico y el tamaño de las partículas. Además, un grupo de lipasas entre las cuales podemos mencionar a la lipasa lipoproteica (LPL), la lipasa hepática (LH) y la lipasa endotelial (LE) remodelan la superficie de las HDL hidrolizando triglicéridos localizados en su superficie de manera tejida y sustrato específico, reduciendo el tamaño de las partículas de HDL.

Finalmente las HDL pueden ser depuradas de la circulación mediante la unión al receptor SR-B1 localizado en hígado el cual reconoce las HDL maduras y promueve la excreción de su contenido lipídico por vía biliar (Yokoyama 2006).

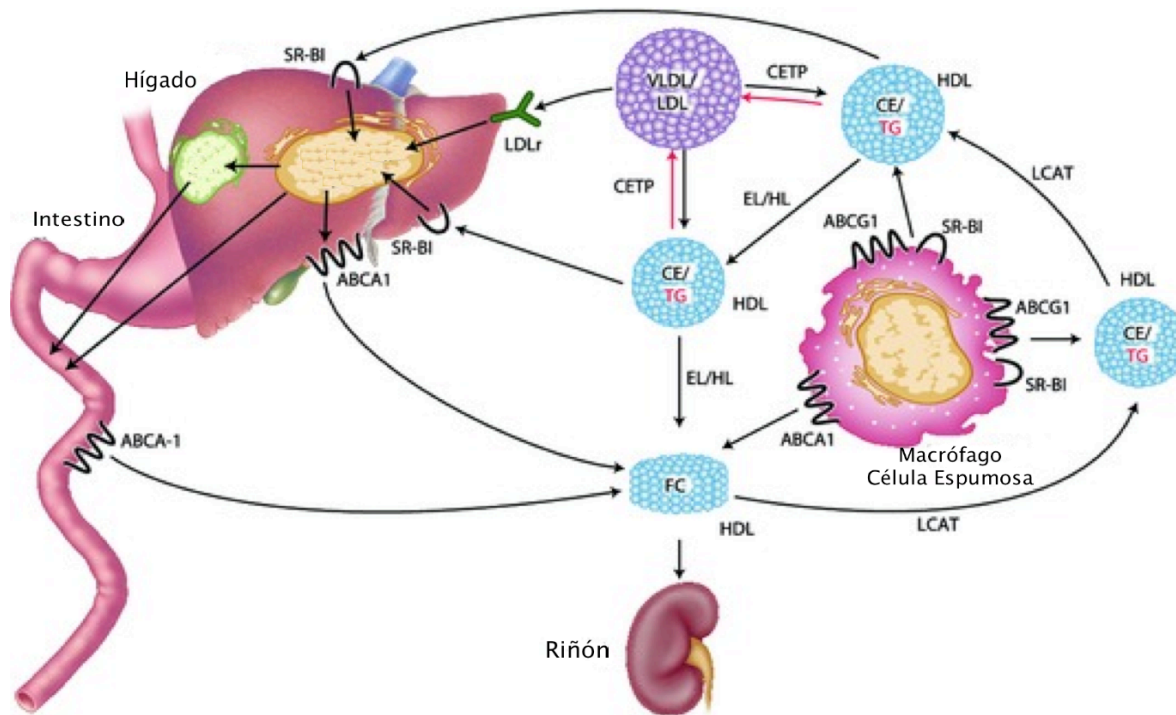


Figura 1. Transporte reverso de colesterol. Este proceso inicia con la interacción de ABCA1 y la apolipoproteína AI, lo cual promueve el eflujo de colesterol y fosfolípidos principalmente en el hígado y en los macrófagos. La enzima lecitina colesterol acil transferasa (LCAT) actúa sobre el colesterol libre y produce ésteres hidrofóbicos que se sitúan en el interior de las partículas formando así HDLs maduras. La proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP) realiza el intercambio de ésteres de colesterol por triglicéridos en lipoproteínas ricas en la apolipoproteína B (VLDL, IDL). Otras enzimas hidrolizan triglicéridos en la superficie de las HDL promoviendo su recambio y remodelación como la lipasa lipoproteica, la lipasa endotelial y la lipasa hepática (LPL, LE, LH, respectivamente). Por último las partículas de HDL pueden unirse al receptor SRB1 lo cual promueve su excreción por via biliar o bien ser depuradas en el riñón.

Subfracciones de las HDL

Como se ya se mencionó las HDL son un grupo altamente heterogéneo de partículas, ello está relacionado con la estructura helicoidal, anfipática y altamente dinámica de la apolipoproteína AI, que le permite adoptar diferentes conformaciones espaciales y como consecuencia la cantidad de lípidos asociados a ella también varía (Davidson and Thompson 2007). En un esfuerzo por develar si las poblaciones de HDL podrían predecir mejor el riesgo cardiovascular, se han desarrollado diversas técnicas para fraccionarlas. Es así como podemos mencionar que al someter la fracción plasmática correspondiente a las HDL a ultracentrifugación, pueden identificarse dos grupos: las HDL2 que son grandes, de baja densidad y ricas en lípidos y las HDL3 que en contraste son pequeñas, densas y ricas en proteínas. Si se realiza un fraccionamiento sucesivo mediante gel en gradiente de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, distinguiremos cinco grupos que en orden decreciente de tamaño son: HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b y HDL3c (Rosenson, Brewer et al. 2011).

En algunos estudios in vitro se ha demostrado que esta diversidad en composición, estructura y densidad refleja diferencias en la función llevada a cabo por cada subfracción. Las subfracciones grandes (HDL2) son más eficaces inhibiendo la agregación plaquetaria y tienen una potente actividad vasodilatadora. Por su parte las subfracciones pequeñas y densas (HDL3), son mejores mediadoras del transporte reverso del colesterol, cumplen importantes funciones antioxidantes, antiinflamatorias e inhiben mejor la actividad plaquetaria (Camont, Chapman et al. 2011), sin embargo, las asociaciones clínicas son poco consistentes y el papel de las subfracciones de las HDL en el campo clínico sigue siendo controversial (Rosenbaum, Hansel et al. 2012, Superko, Pendyala et al. 2012).

Hipoalfalipoproteinemia en México y sus asociaciones con patologías metabólicas

La hipoalfalipoproteinemia es definida como niveles de colesterol asociado a HDL (C-HDL) menores a 40 mg/dL según el Panel de Expertos para la Detección, Evaluación y Tratamiento de Colesterol Sanguíneo Alto en Adultos (ATPIII, 2004) y el Panel de Expertos en Instrucciones para la Salud Cardiovascular y Reducción del Riesgo en Niños y Adolescentes (Expert Panel of Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents, 2011).

Debido a la diversidad de funciones llevadas a cabo por esta lipoproteína es posible visualizar que las repercusiones de su escasez son igualmente diversas. En estudios epidemiológicos se ha demostrado que los niveles bajos de C-HDL son un factor de riesgo independiente a los niveles de c-LDL de la enfermedad arterial coronaria (Prospective Studies, Lewington et al. 2007). Además, en algunos estudios se observa que un incremento de 1 mg/dL en los niveles de C-HDL está asociado a una disminución entre un 2 y un 3% en el riesgo de padecer enfermedad arterial coronaria en ambos géneros (Wilson 1990, Linsel-Nitschke and Tall 2005).

En nuestro país, la hipoalfalipoproteinemia es la dislipidemia más común entre los adultos mayores de 20 años con una prevalencia de 36% (Aguilar-Salinas, Olaiz et al. 2001). En un estudio previo en nuestro grupo de trabajo se demostró que esta dislipidemia tiene un inicio temprano en México, y se describió como la más común entre la población infantil y adolescente de nuestro país con una prevalencia de 15% (Flores-Dorantes, Arellano-Campos et al. 2010).

En una gran cantidad de estudios se ha observado que la etnicidad es un factor que debe ser tomado en cuenta en la variación de los niveles de C-HDL (Kuller 2004). La mayoría de la población mexicana es considerada como una población mestiza, producto de una mezcla entre tres principales poblaciones parentales: la amerindia o indígena, la europea (principalmente española) y en menor medida, la africana (Lisker, Ramirez et al. 1990, Price, Patterson et al. 2007).

De manera consistente, en diversos estudios se ha descrito que la media de las concentraciones de C-HDL en individuos mexicanos es de entre 38 y 45 mg/dL, lo que es muy similar entre las diversas poblaciones mestizas de Latinoamérica (Miranda, Herrera et al. 2013). En contraste, en los estudios realizados en población española, se observa que la media para este mismo parámetro bioquímico es mayor, con valores de 55 a 60 mg/dL (Nunez-Cortes, Pedro-Botet Montoya et al. 2010).

Los niveles de C-HDL son particularmente bajos en nuestro país y de manera general, en América Latina, cuyas etnicidades presentan una alta similitud. Estos hallazgos sugieren que la contribución del componente indígena presente en estas poblaciones, podría ser importante en la variación de los niveles de C-HDL; sin embargo, en la actualidad existen poco trabajos que puedan aportar información al respecto (Villarreal-Molina, Aguilar-Salinas et al. 2007).

Heredabilidad

Actualmente se sabe que los niveles de C-HDL son un rasgo complejo, es decir, se encuentran sujetos a regulación tanto de factores ambientales como de factores genéticos.

Algunos de los factores ambientales como el tabaquismo, una dieta alta en hidratos de carbono o grasas saturadas, niveles altos de triglicéridos y el sedentarismo ocasionan una disminución en los niveles de C-HDL (Tall 1990, Jeffs, Godsland et al. 2006). Además, factores como el género y la edad también modifican los niveles de C-HDL, ya que en general las mujeres presentan concentraciones plasmáticas mayores que los hombres. Sin embargo, el efecto del género varía respecto a las diferentes etapas del desarrollo, siendo los niveles hormonales y sus modificaciones durante la adolescencia y la menopausia los que más contribuyen a este comportamiento (Badeau, Metso et al. 2013).

Con base en estudios realizados en familias y en gemelos se ha estimado que los factores genéticos representan entre un 47 a un 76% de la variabilidad interindividual en los niveles plasmáticos de C-HDL (Friedlander, Kark et al. 1986, Souren, Paulussen et al. 2007). La identificación de estos factores genéticos ha requerido el uso de distintas estrategias genéticas y genómicas.

Estrategias para identificación de determinantes genéticas asociadas a niveles de C-HDL

Con la finalidad de identificar las determinantes genéticas involucradas en la modulación de las concentraciones plasmáticas de C-HDL se han utilizado principalmente tres estrategias: los estudios de genes candidato, los estudios de genoma completo en búsqueda de nuevos genes para el análisis de loci para rasgos cuantitativos (QTL por sus siglas en inglés) y más recientemente los estudios de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés).

a) Estudios de genes candidato

Algunos de los genes principalmente implicados en la síntesis y metabolismo del C-HDL fueron identificados, en algunos casos, mediante mutaciones raras que ocurren naturalmente en los humanos y que presentan fenotipos clínicamente bien descritos como en el caso de la enfermedad de Tangier y el descubrimiento del transportador ABCA1 (Wang and Paigen 2002). Otros más se descubrieron mediante modelos murinos en los cuales fue posible evaluar su función. De esa manera se propusieron cinco grupos de genes candidato para la asociación con los niveles de C-HDL:

- 1) Proteínas asociadas a la estructura de las HDL: en este grupo se propusieron a los genes *APOA1* y *APOA2*, que codifican para las apolipoproteínas AI y AII cuyo papel estructural y funcional ya ha sido muy estudiado.
- 2) Enzimas y proteínas de transferencia asociadas a las HDL: en esta categoría se incluyeron a los genes que codifican para la proteína de

transferencia de ésteres de colesterol, *CETP*; la lecitin colesterol acil transferasa, *LCAT* y la proteína de transferencia de fosfolípidos, *PLTP*. Todas ellas desempeñan un papel fundamental en la remodelación y modificación de las partículas del C-HDL.

- 3) Enzimas asociadas a la pared celular de tejidos involucrados en el metabolismo de las HDL: los principales genes incluidos en esta categoría son *LPL*, *LIPC* y *LIPG* que codifican para la lipasa lipoproteica, la lipasa hepática y la lipasa endotelial. El papel de todas ellas se centra en la remodelación del C-HDL.
- 4) Receptores celulares, adaptadores y transportadores: en este grupo podemos mencionar al gen *ABCA1* que codifica al transportador cassette de unión a trifosfato de adenosina y al gen *SRB1* que codifica para el receptor basurero tipo B1 los cuales llevan a cabo funciones fundamentales para la síntesis y catabolismo del C-HDL.
- 5) Factores de transcripción: entre los más importante factores de transcripción que han sido propuestos como genes candidato son los pertenecientes a la familia de los *RXR* o receptores de retinoides X, los *LXR* que codifican para los factores de transcripción conocidos como receptores hepáticos X y la familia de factores *PPAR* o receptores activados por los proliferadores de los peroxisomas, ya que ha sido muy estudiado el papel que todos ellos desempeñan en la regulación de la síntesis y el metabolismo de las lipoproteínas (Wang and Paigen 2002, Wang and Paigen 2005).

a) Análisis de locus para rasgos cuantitativos (QTLs)

Debido a que la estrategia de genes candidatos no era capaz de explicar la totalidad de la variación genética en los niveles de C-HDL se desarrolló la técnica de análisis de locus para rasgos cuantitativos (QTLs). Esta estrategia es capaz de identificar regiones génicas asociadas a una variable cuantitativa sin que haya un estudio previo sobre el posible papel funcional (Lander and Botstein 1989).

Para las concentraciones de C-HDL los estudios que reportan QTL fueron llevados a cabo de manera inicial en modelos de ratón siguiendo cuatro pasos básicos: 1) generación de las cepas de ratón con diferencia en las concentraciones de C-HDL mediante cruza endogámicas, retrocruza o intercruza con la progenie. 2) Determinación de las concentraciones de C-HDL, las cuales habitualmente siguen una distribución normal, en la progenie de la segunda generación. 3) Uso de microsatélites polimórficos en el genotipo de la progenie como marcadores del fenotipo a intervalos de 15 a 20 cM, recordando que un centimorgan (cM) equivale a 1% de recombinación cuando nos referimos a la distancia relativa entre genes ligados, es decir, que están presentes en un mismo cromosoma. De manera más reciente utilizando microarreglos y 4) determinación de regiones cromosómicas asociadas a los marcadores (QTLs) que contienen a los genes responsables de la mayor parte de las diferencias de C-HDL entre cepas utilizando programas estadísticos (Gu, Johnson et al. 1999, Suto, Matsuura et al. 1999) .

Los pasos anteriormente descritos se utilizaron para describir los 36 QTLs asociados a los niveles de C-HDL en ratón, sin embargo, mediante genómica comparativa realizada en 15 poblaciones distintas han podido ser reportados 45 QTLs en los humanos, es decir, la información obtenida para el ratón corresponde en más de un 90% a lo que ha sido reportado de manera posterior para los seres humanos, utilizando el mismo tipo de análisis, lo cual demuestra el alto grado de homología entre ambas especies y la validez de la utilización del modelo murino (Wang and Paigen 2002).

b) Estudios de asociación del genoma completo (GWAs)

Los estudios de asociación del genoma completo o GWAs, por sus siglas (Genome Wide Association study) en inglés, son una estrategia propuesta de manera reciente para continuar con la búsqueda de determinantes genéticos que podrían estar asociadas a la variación de los niveles plasmáticos de C-HDL con la finalidad de explicar un mayor porcentaje de la heredabilidad del rasgo.

Este tipo de estudios se basa en la premisa de que polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) pueden asociarse a la variación de un fenotipo (Marjoram, Zubair et al. 2013). Se realizan mediante la genotipificación un gran número de SNPs ubicados a lo largo de todo el genoma, cada uno de los cuales brinda información sobre el bloque de desequilibrio de ligamiento (LD) en el que se encuentra de manera que se evita incluir variantes que se localicen en el mismo haplotipo para evitar información redundante. Otra característica importante de los GWAs es que son estudios libres de hipótesis, ya que, adicionalmente a los genes involucrados directamente en el metabolismo del C-HDL, otros genes con función menos conocida o no directamente relacionada, podrían estar involucrados en la modulación de los niveles de esta lipoproteína. Debido a que se espera que cada SNP incluido contribuya de manera discreta en el fenotipo, en esta clase de análisis se incluye a una gran cantidad de individuos, generalmente siguiendo el modelo caso-control (Visscher, Brown et al. 2012).

Hasta el momento, se han asociado 38 variantes distintas a los niveles de C-HDL por medio de análisis de GWAs y se calcula que en total estos SNPs podrían explicar un 12.1% de la variabilidad genética del rasgo (Teslovich, Musunuru et al. 2010). De esta proporción, se estima que alrededor de 61.8% puede ser atribuida a la presencia de variantes comunes, definidas como aquellas con una frecuencia del alelo menor (MAF) superior al 1% (Cohorts for, Aging Research in Genetic Epidemiology et al. 2013). Lo anterior sugiere que este tipo de polimorfismos son clave para el entendimiento de la varianza de los niveles de C-HDL.

Sin embargo, estos escaneos se han realizado principalmente población de origen europeo y que existen discrepancias interpoblacionales en la arquitectura genética, entre las cuales se incluyen: las diferencias en las frecuencias alélicas y en los patrones de desequilibrio de ligamiento, así como en la prevalencia de enfermedades y las interacciones entre genes y ambiente llevan a sugerir que es necesario realizar GWAS que incluyan a cada población de interés (Weissglas-Volkov, Aguilar-Salinas et al. 2013). A este respecto, en algunos estudios se han utilizado muestras de individuos no europeos, de manera particular

afroamericanos y asiáticos (chinos, coreanos y filipinos), con la finalidad de probar que las variantes identificadas en caucásicos también podrían estar asociadas en otras poblaciones. Con lo anterior ha demostrado que más de un 80% de los SNPs asociados a C-HDL en europeos se pueden asociar en la misma dirección en otros grupos poblacionales (Teslovich, Musunuru et al. 2010).

Recientemente se ha propuesto la búsqueda de la heredabilidad que no ha sido identificada por las estrategias descritas anteriormente mediante las técnicas secuenciación masiva. Sin embargo, Los resultados de los primeros estudios realizados a partir de éste enfoque son muy similares a los obtenidos con los GWAs (Cohorts for, Aging Research in Genetic Epidemiology et al. 2013).

De manera interesante para la comprensión de la genética de la variabilidad del C-HDL, las determinantes genéticas reportadas a través de las tres estrategias mencionadas en los apartados anteriores son esencialmente las mismas, lo cual no es común en otras enfermedades complejas, ello podría indicar que las vías metabólicas involucradas en la modulación del rasgo están altamente definidas y conservadas.

Los SNPs que han sido asociados en población europea con los niveles de C-HDL con los mejores valores de significancia se presentan en la tabla 1. La mayor parte de ellos están localizados en genes cuya función se encuentra ampliamente descrita y además está directamente relacionada con el metabolismo de las HDL (*CETP*, *LIPC*, *LPL*, *ABCA1*, *LCAT* y *PLTP*). Un grupo más pequeño de variantes, se ubican en genes que han sido descritos como factores de transcripción o cuyas funciones e implicación en el metabolismo de lípidos no se ha estudiado o se ha estudiado de manera muy reciente como *TRIB1*, *CCTCF*, *LILRA3*, *NUTF2*, *KLF14*, *MMAB/MVK* y *MLXIPL*. Otro aspecto a tomar en cuenta es que la mayoría de estos SNPs no se encuentran en las regiones codificantes de los genes donde están localizados (Kathiresan, Willer et al. 2009, Keebler, Sanders et al. 2009, Teslovich, Musunuru et al. 2010, Weissglas-Volkov, Aguilar-Salinas et al. 2010, Chang, Ned et al. 2011).

Tabla 1. Polimorfismos asociados a los niveles de C-HDL en población europea con la mayor significancia estadística.

Gen	SNP	P	Localización/ Función
<i>CETP</i>	rs3764261	7×10^{-380}	Promotor
<i>LIPC</i>	rs1532085	3×10^{-96}	Intergénico
<i>CETP</i>	rs1800775	1×10^{-79}	Promotor
<i>APOA1/C3 A1-A5</i>	rs964184	1×10^{-60}	Región 3' UTR
<i>LIPG</i>	rs7241918	3×10^{-49}	Intergénico
<i>HERPUD1/CETP/NOD27</i>	rs5880	3×10^{-44}	Región codificante
<i>HERPUD1/CETP/NOD27</i>	rs1800777	5.2×10^{-38}	
<i>LPL</i>	rs12678919	2×10^{-34}	Intergénico
<i>ABCA1</i>	rs1883025	2×10^{-33}	Intrónico
<i>LCAT</i>	rs16942887	8×10^{-33}	Intrónico
<i>LIPC</i>	rs1800588	2×10^{-32}	Promotor
<i>PPP1R3B</i>	rs9987289	6×10^{-25}	Intrónico
<i>LPL</i>	rs328	9×10^{-23}	Región codificante
<i>PLTP</i>	rs6065906	2×10^{-22}	Intergénico
<i>TRIB1</i>	rs2954029	3×10^{-19}	Intrónico
<i>NUTF2</i>	rs2271293	8.3×10^{-16}	Intrónico
<i>LILRA3</i>	rs386000	4×10^{-16}	Intergénico
<i>KLF14</i>	rs4731702	1×10^{-15}	Intergénico
<i>MMAB/MVK</i>	rs7134594	7×10^{-15}	Intrónico
<i>MLXIPL</i>	rs17145738	2×10^{-12}	Región 3' UTR

CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol, APOA1/C3 A1-A5: cluster apolipoproteína A1/C3 A1-A5, LIPG: lipasa endotelial, HERPUD: inducible por homocisteína y estrés de retículo endoplásmico con dominio parecido a ubiquitina miembro 1, NOD27: dominio 27 de unión y oligomerización de nucleótidos, LPL: lipasa lipoproteica, ABCA1: cassette de unión a trifosfato de adenosina miembro 1 subfamilia A, LCAT: lectin colesterol acil transferasa, LIPC: lipasa hepática, PP1R3B: subunidad regulatoria 3B de la fosfatasa proteica 1, PLTP: proteína de transferencia de fosfolípidos, TRIB1: homólogo tribbles 1, NUTF2: factor de transporte nuclear 2, LIRA3: receptor leucocitario parecido a inmunoglobulina subfamilia A, KLF14: factor similar a Kruppel 14, MMAB: aciduria metilmalónica tipo cb1B, MVK: cinasa de mevalonato, MLXIPL: similar proteína que interactúa con MLX, P: significancia estadística, UTR: región no traducida.

Antecedentes directos

a) Gen *CETP*

El gen *CETP* está localizado en el cromosoma 16q2 presenta 16 exones y codifica para la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (*CETP*), una glucoproteína hidrofóbica que en su forma activa tiene una longitud de 493 aminoácidos. Esta proteína se expresa principalmente en el hígado y en menor medida en el intestino delgado, las glándulas adrenales, el tejido adiposo y el bazo, desde donde es secretada al plasma y se localiza principalmente asociada a las HDL (Barter, Hopkins et al. 1982, Agellon, Quinet et al. 1990, Tall 1993). *CETP* tiene una función importante en el TRC ya que incrementa el contenido de triglicéridos de las HDL generando partículas de mayor tamaño que pueden ser fácilmente metabolizadas a través de la actividad de lipasas de triglicéridos, es decir, participa de manera directa en el metabolismo de estas lipoproteínas (Barter, Hopkins et al. 1982). Todo lo anterior ha colocado a este gen no sólo como uno de los principalmente analizados en estudios genéticos sino también como un importante blanco terapéutico para nuevas terapias farmacológicas que buscan incrementar los niveles de C-HDL plasmáticos. De ésta manera, todas las estrategias genéticas han reportado a *CETP* como asociado a los niveles de C-HDL y actualmente existen al menos tres inhibidores de la proteína en el mercado aunque con resultados cuestionables (Thompson, Di Angelantonio et al. 2008, Hewing and Fisher 2012).

Desde hace dos décadas se conocen dos isoformas de *CETP*, la primera de ellas con una secuencia de 493 aminoácidos como se mencionó en el párrafo anterior y una isoforma corta, que sólo comprende los primeros 8 exones del gen producto del empalme alternativo del RNA mensajero (mRNA) en el exón 9, generando un polipéptido con una secuencia de 433 aminoácidos. De manera interesante, esta isoforma más pequeña no se secreta y no posee actividad por lo que se ha propuesto que interactúa con la isoforma de longitud completa regulando así su secreción (Quinet, Yang et al. 1993).

Otro aspecto a tomar en cuenta sobre el gen *CETP* es su carácter altamente polimórfico. Diversos estudios han mostrado que los SNPs localizados en su promotor están asociados a la variabilidad en los niveles de C-HDL (Papp, Pinsonneault et al. 2012).

La variante rs3764261 está localizada en el promotor del gen *CETP*, el alelo menor A, se asocia a mayores concentraciones de C-HDL en diversas poblaciones. A nivel funcional se desconoce si esta variante modifica la expresión del gen, ya que hasta el momento no se ha realizado la cuantificación del mRNA con respecto al genotipo. Sin embargo, se sabe que la disminución en la actividad de la proteína codificada por el gen tiene como consecuencia un incremento en las concentraciones de C-HDL, por lo que resulta posible proponer que la presencia del alelo A disminuye la actividad de *CETP*. (Zhong, Sharp et al. 1996, Chang, Ned et al. 2011).

b) Gen *LIPC*

El gen *LIPC* se encuentra en el cromosoma 15, tiene nueve exones y codifica para la lipasa hepática, una glucoproteína de 65 kD. Se trata de un miembro de la familia de lipasas de triglicéridos, que se expresa, como su nombre lo indica, principalmente en los hepatocitos y en menor medida en los macrófagos (Jansen, van Berkel et al. 1978, Kuusi, Nikkla et al. 1979).

Existen dos principales reservorios de ésta molécula: la porción de lipasa unida a la superficie celular de los hepatocitos y las células sinusoidales por medio de proteoglicanos de heparán sulfato. Una vez que se secreta por las células y una segunda fracción, unida a las HDL que se encuentra en circulación. Esta última se genera mediante el desplazamiento de la unión proteoglicano-lipasa hepática mediado por las partículas de HDL. Ambos reservorios contienen la forma catalíticamente inactiva de la enzima. La activación de la misma se lleva a cabo principalmente durante la etapa postprandial, es decir, cuando hay una mayor concentración de triglicéridos libres en circulación en un proceso regulado por el

contenido de apolipoproteínas de las partículas de HDL, principalmente AII y E o bien, de manera artificial, administrando heparina intravenosa con el método descrito por Hahn (Hahn 1943, Ramsamy, Neville et al. 2000, Ramsamy, Boucher et al. 2003).

Esta enzima está involucrada en el proceso de depuración de lipoproteínas con alto contenido de triglicéridos, como las VLDL y los quilomicrones pero además, de manera muy importante, en la remodelación de las partículas de HDL mediante la hidrólisis tanto de los triglicéridos como de los fosfolípidos que se encuentran en la superficie de estas generando así las subfracciones más pequeñas y densas de estas lipoproteínas (Grundy, Vega et al. 1999, Jansen, Verhoeven et al. 2002, Jansen 2004, Santamarina-Fojo, Gonzalez-Navarro et al. 2004). Es debido a lo anterior que se considera a *LIPC* uno de los principales genes dentro del metabolismo lipídico, por lo que ha sido estudiado ampliamente por todas las estrategias genéticas anteriormente descritas. De manera importante, cuatro variantes comunes localizadas en el promotor del gen han sido las mayormente asociadas a los niveles de C-HDL en múltiples estudios (Cai, Wong et al. 1989, Ameis, Stahnke et al. 1990).

El polimorfismo rs1800588, también es conocido de manera alternativa como -480C>T o -514C>T y está localizado en la región promotora del gen que codifica para la lipasa hepática, *LIPC*. En una gran cantidad de estudios de asociación realizados en diversas poblaciones, se ha analizado a esta variante común, demostrando que el alelo T, descrito como el menos frecuente en la población caucásica, está asociado a un incremento en las concentraciones de C-HDL de manera dependiente de dosis. Este efecto parece ser la consecuencia de una disminución en la actividad de la lipasa hepática en los sujetos portadores del alelo T, tanto en su forma heterocigota como homocigota; lo cual, se sugiere, corresponde a la reducción de la transcripción del gen *LIPC* demostrada por un estudio in vitro realizado con la línea AML12 de hepatocitos murinos (Jansen, Verhoeven et al. 1997, Jansen, Chu et al. 1999, Deeb and Peng 2000).

c) **Gen *LPL***

El gen *LPL* está localizado en aproximadamente 30 kb del cromosoma 8 (8p21.3) y codifica para la lipasa lipoproteica. Esta enzima es una glucoproteína expresada principalmente en el tejido adiposo, en el músculo esquelético y cardíaco. Otros tejidos como las glándulas adrenales, los macrófagos, el sistema nervioso central, los túbulos proximales renales, las células pancreáticas y los pulmones también la expresan aunque en menor medida (Stein and Stein 2003).

La lipasa lipoproteica se localiza en forma de homodímero en la superficie luminal de las células del endotelio vascular y de los adipocitos, ya que se encuentra unida a ésta mediante proteoglicanos de heparán sulfato. Su activación requiere de la apolipoproteína CII como cofactor, la cual forma parte de la estructura de las VLDL, los quilomicrones y las HDL por lo que existe regulación bidireccional entre los tres tipos de lipoproteínas y la lipasa lipoproteica. Dado lo anterior, tiene un papel importante en el metabolismo lipídico ya que cataliza a la hidrólisis de triglicéridos presentes en VLDL y quilomicrones, proporcionando así ácidos grasos libres que pueden ser utilizados por los tejidos. De igual manera, reduce el tamaño y contenido de triglicéridos de las HDL, favoreciendo la producción de las subfracciones más pequeñas y densas (Mead, Irvine et al. 2002, Otarod and Goldberg 2004).

Todo lo anterior coloca al gen *LPL* como una de las piezas centrales en el metabolismo tanto de los triglicéridos como de las HDL, y sus variantes funcionales han sido ampliamente estudiadas principalmente en población europea.

El polimorfismo rs328, también conocido como Ser447X, inserta un codón de paro en el codón 447, lo cual genera una proteína trunca en la región carboxilo terminal.

Durante alrededor de dos décadas se estudió su papel en la modulación de los lípidos sanguíneos en diversos estudios efectuados en población europea. Todos ellos confirmaron que su alelo menos frecuente, G, incrementa los niveles de C-HDL y disminuye los de triglicéridos. Ambos efectos se asocian de manera amplia

con la disminución del riesgo cardiovascular (Groenemeijer, Hallman et al. 1997, Kuivenhoven, Groenemeyer et al. 1997).

Estudios funcionales demostraron que la ausencia de los últimos dos aminoácidos de la secuencia genera un aumento en la actividad de la lipasa lipoproteíca. De manera muy reciente se ha propuesto que la razón de dicho incremento es un aumento en la traducción del mRNA de *LPL*. Este efecto podría ser ocasionado por la presencia de la variante en un haplotipo cercano a la región 3' UTR y que pudiese ser un sitio importante para la asociación de algún complejo de unión a RNA (Zhang, Henderson et al. 1996, Ranganathan, Unal et al. 2012).

d) Gen *LIPG*

El gen *LIPG* se localiza en el brazo largo del cromosoma 18 (18q21.1) y codifica para la lipasa endotelial, el miembro más recientemente descubierto de la familia de lipasas de triglicéridos (Hirata, Dichek et al. 1999, Jaye, Lynch et al. 1999). Como su nombre lo indica, se expresa principalmente por las células endoteliales aunque también ha sido encontrada en la placenta, la glándula tiroides, los pulmones, el hígado, los riñones y las gónadas. Tiene alta afinidad por los fosfolípidos presentes en las HDL, donde ejerce su función de manera importante.(Yasuda, Ishida et al. 2010)

En algunos estudios realizados in vitro se ha sugerido que la disminución o carencia de actividad de la lipasa endotelial se encuentra asociada al aumento del C-HDL y es por ello que se considera que el gen *LIPG* podría jugar un papel importante en la modulación de los niveles de esta lipoproteína (Jaye, Lynch et al. 1999, Maugeais, Tietge et al. 2003, Nijstad, Wiersma et al. 2009). Recientemente, los estudios se han centrado en los mecanismos moleculares en los que podría estar (Pennacchio and Rubin 2003) participando la lipasa endotelial así como en su estructura tridimensional ya que debido a su reciente caracterización, esta información aún no se encuentra disponible.

El polimorfismo rs7241918 se localiza en una región intergénica del cromosoma 18, muy cerca del promotor del gen LIPG. Un estudio en europeos describió a su alelo menos frecuente, G, asociado a niveles bajos de C-HDL, por encima de otras variantes de este gen. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios a nivel funcional que sugieran el mecanismo por el cual ocurre lo anterior (Teslovich, Musunuru et al. 2010)

.

e) Gen *APOA5*

El gen *APOA5* está localizado en el cromosoma 11, comprende cuatro exones y fue recientemente descubierto como parte del cluster que incluye a los genes *APOA1*, *APOC3* y *APOA4*, una de las regiones genéticas mayormente estudiadas (Pennacchio and Rubin 2003).

Codifica para la apolipoproteína AV, una molécula de 396 aminoácidos que, a diferencia de otras de su misma familia, se encuentra en muy bajas concentraciones en la sangre periférica. Se expresa únicamente en el hígado y se localiza en las VLDL, los quilomicrones y las HDL. Recientemente se ha informado que la apolipoproteína AV se une a la lipasa lipoproteica y es a partir de ésta, que ejerce su actividad regulando la hidrólisis de los triglicéridos presentes estas lipoproteínas (Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004).

En estudios en modelo murino se ha demostrado que la disminución en las concentraciones de la apolipoproteína AV se encuentra asociado a niveles más altos de triglicéridos (Pennacchio, Olivier et al. 2001). Lo anterior es consistente con los estudios de asociación de variantes de pérdida de función en los humanos. Sin embargo, es necesario señalar que muchas de las funciones de esta apolipoproteína aún se desconocen (Endo, Yanagi et al. 2002, Weissglas-Volkov, Aguilar-Salinas et al. 2010).

El polimorfismo rs964184 está localizada en la región 3' UTR del gen *APOA5*. Existen pocos estudios en que la asocian a las concentraciones de triglicéridos. Sin embargo, uno de ellos fue llevado a cabo con individuos mestizos mexicanos,

observando que el alelo G, se encuentra asociado con mayores niveles de éstos lípidos. Los aspectos funcionales de esta variante han sido poco estudiados, pero se propone que ocasione una disminución en la concentración de la apolipoproteína en circulación (Weissglas-Volkov, Aguilar-Salinas et al. 2010, Weissglas-Volkov, Aguilar-Salinas et al. 2013).

JUSTIFICACIÓN

La población mexicana mestiza presenta una alta prevalencia de hipoalfalipoproteinemia, se ha calculado que participación de los factores genéticos en la modulación de los niveles de C-HDL alcanza hasta un 70%.

Se han utilizado diversas estrategias para identificar variantes y genes responsables de dicha heredabilidad. Entre ellas recientemente destacan los GWAs, que se han llevado a cabo principalmente en poblaciones de origen europeo.

Es de gran relevancia realizar un estudio en que se evalúe la contribución de las variantes asociadas al C-HDL obtenidas por los GWAs disponibles en la población mestiza, incluyendo tanto adultos como población infantil, ésta última con un tiempo de exposición al ambiente menor.

Además, es de especial interés conocer como estas variantes podrían estar modulando los niveles de C-HDL en población indígena, de la cual hasta el momento se tiene información muy escasa ya que se ha propuesto que el componente amerindio podría ser clave en la prevalencia de niveles bajos de las HDL en nuestra población.

HIPÓTESIS

Los polimorfismos comunes rs3764261, rs1800588, rs328, rs7241918 y rs964184 localizados en los genes CETP, LIPC, LPL, LIPG y APOA5 respectivamente, participan en la modulación de los niveles de C-HDL en distintos grupos de población mexicana.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la participación de polimorfismos comunes identificados a través de GWAS en la modulación de los niveles de C-HDL en distintos grupos de población mexicana.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto individual de los alelos de riesgo en la modulación de los niveles de C-HDL en población infantil y adulta mexicana, incluyendo distintos grupos de población indígena.
- Determinar el impacto de polimorfismos comunes en la modulación de otros parámetros metabólicos como triglicéridos y C-LDL.
- Analizar la contribución de los polimorfismos comunes en la modulación de las subfracciones de lipoproteínas de alta densidad.

METODOLOGÍA

Grupos de población mexicana

El estudio incluyó la participación de 3879 sujetos pertenecientes a tres grupos de población mexicana los cuales se describen a continuación.

a) Niños mestizos

La población infantil incluida se conformó con 1200 niños mexicanos, procedentes de la Ciudad de México, con padres y abuelos mestizos nacidos en México, no relacionados, con edades de 6 a 15 años cuyos padres aceptaron, mediante la firma de un consentimiento informado, su participación en el estudio. Fueron reclutados durante las Convivencias Infantiles de Verano para los hijos de trabajadores del Sindicato de Salud llevadas a cabo en los años 2008 y 2009 así como en una Escuela Secundaria Pública; estas últimas con la colaboración del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Se realizó la medición de peso, talla, circunferencia de cintura y presión arterial. Los percentiles de IMC y z-scores para el IMC fueron calculados usando los datos de referencia de IMC por edad y género. Se obtuvo una muestra de sangre periférica después de un periodo de ayuno de 8 horas. Ninguno de los participantes presentó evidencia clínica de enfermedades crónicas como diabetes, enfermedad renal, hipo o hipertiroidismo ni enfermedad hepática. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

b) Adultos mestizos

Se analizaron dos grupos de adultos mestizos. El primero de ellos, conformado por 1293 individuos mayores de 18 años, mexicanos no relacionados procedentes principalmente de la Ciudad de México, a los cuales se determinaron parámetros antropométricos como talla, peso, circunferencia de cintura además de la muestra sanguínea correspondiente. Todos ellos firmaron la carta de consentimiento

informado aprobada por las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las muestras sanguíneas y las mediciones antropométricas fueron obtenidas en colaboración con la Escuela Nacional de Antropología e Historia.

El segundo grupo incluyó a 983 individuos mayores de 18 años, mexicanos, no relacionados procedentes de la Ciudad de México. De igual manera se realizó la medición de parámetros antropométricos como talla, peso, circunferencia de cintura y cadera para cada uno de ellos. Además, se realizó la toma de muestra sanguínea después de 8 horas de ayuno.

Todos firmaron la carta de consentimiento informado correspondiente la cual fue aprobada por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

El índice de masa corporal (IMC) fue calculado como peso en kilogramos dividido entre la talla elevada al cuadrado.

c) Adultos indígenas

El grupo de población indígena se conformó por 406 adultos indígenas pertenecientes a los grupos nahua y totonaca, residentes de comunidades rurales de los estados de Puebla, Morelos y Veracruz. Todos los individuos tenían al menos dos generaciones de ancestros pertenecientes a su grupo étnico y conservaban su lengua de origen. Se contó con el apoyo de traductores en caso necesario y se obtuvo la firma del consentimiento informado para la toma de muestra de sangre periférica. Estos procedimientos fueron aprobados por el comité de ética del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.

Selección de SNPs

Previa revisión en la literatura, se realizó una lista de los principales SNPs asociados a la modulación de los niveles de C-HDL en población europea. Se seleccionaron las cinco variantes localizadas en cinco genes distintos para formar parte del estudio, tomando en cuenta los criterios siguientes: frecuencia reportada

por el HAP-MAP para caucásicos mayor a 5%, que no estuvieran en desequilibrio de ligamiento entre sí, y con un valor de significancia alto ($> 1 \times 10^{-23}$) para la asociación con los niveles plasmáticos de C- HDL. Las variantes seleccionadas fueron: rs3764261, rs1800588, rs328, rs7241918 y rs964184 ubicados en los genes CETP, LIPC, LPL, LIPG y APOA5 respectivamente. En la tabla 2 se muestran los SNPs seleccionados así como algunas de sus características.

Tabla 2. Polimorfismos seleccionados.

GEN	SNP	P	LOCALIZACIÓN	FRECUENCIA MEX (HAPMAP)	CAMBIO
CETP	rs3764261	7×10^{-380}	Promotor	0.319	C/A
LIPC	rs1800588	2×10^{-32}	Promotor	0.54	C/T
LPL	rs328	9×10^{-23}	Exón 9	0.07	C/G
LIPG	rs7241918	3×10^{-49}	Intergénico	No reportado	T/G
APOA5	rs964184	1×10^{-60}	3' UTR	0.276	C/G

CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol, LIPC: lipasa hepática, LPL: lipasa lipoproteica, LIPG: lipasa endotelial, APOA5: apolipoproteína AV, MEX: México-americanos, HAPMAP: mapa de haplotipos, Proyecto Internacional.

Determinación de parámetros bioquímicos

Se realizó la determinación de los perfiles bioquímicos para cada uno de los individuos incluidos en el análisis. Las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y colesterol total se midieron a través de métodos enzimáticos (Boehringer-Mannheim). Por otra parte los niveles de C-HDL se determinaron utilizando ácido fosfotúngstico y Mg^{2+} . La concentración de C-LDL se calculó mediante la ecuación de Friedewald. Se definió hipoalfalipoproteinemia como concentraciones menores a 40 mg/dL para los tres grupos de acuerdo con los criterios establecidos por el Panel de Expertos para la Detección, Evaluación y Tratamiento de Colesterol Sanguíneo Alto en Adultos (ATPIII, 2004), en el caso de adultos mestizos e indígenas, así como en el Panel de Expertos en Instrucciones para la Salud Cardiovascular y Reducción del Riesgo en Niños y Adolescentes (Expert Panel of Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents, 2011) para la población infantil. Las mediciones se realizaron

en el Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Ciencias Médica y Nutrición “Salvador Zubirán” y en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” con métodos estandarizados.

Medición de subfracciones de C- HDL en población infantil

Se realizó la determinación de subfracciones de C-HDL en 135 individuos pertenecientes al grupo de población infantil descrito en el punto 3a y se realizó de la manera siguiente: por medio de ultracentrifugación se obtuvo la fracción plasmática correspondiente al C-HDL. A continuación se realizó una electroforesis en gradiente 4-30% de gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes.

La cuantificación de proteína total se hizo mediante una modificación del método de Lowry y la tinción se llevó a cabo con azul de Coomasie R-250. Posteriormente se determinó el diámetro promedio por densitometría utilizando un equipo GS-670 Bio-Rad después de lo cual los datos se procesaron con el software de análisis molecular (Bio-Rad Labs, CA). La distancia de migración de cada gel se calculó a través del uso de una curva estándar de proteínas de alto peso molecular con la función de distancia de migración relativa: tiroglobulina 17.0 nm, ferritina 12.2 nm, catalasa 10.4 nm, lactato deshidrogenasa 8.1 nm y albúmina 7.1 nm (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). La proporción relativa de cada fracción del C-HDL se determinó como se presenta a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Tamaño de las Subfracciones de C-HDL.

SUBFRACCIÓN	TAMAÑO
C-HDL	(nm)
C-HDL2b	9.71-12.93
C-HDL2a	8.77-9.71
C-HDL3a	8.17-8.77
C-HDL3b	7.76-8.17
C-HDL3c	7.21-7.76

El tamaño de la partícula se calculó mediante el promedio del tamaño de cada subfracción en nm multiplicado por el área relativa del escaneo densitométrico. El

resultado se expresa como un porcentaje de área bajo la curva tomando en cuenta el total de las partículas de C-HDL.

Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA se realizó a partir de la fracción leucocitaria extraída de sangre total utilizando el kit QIAmp 96 Blood Kit (Quiagen, Dueseldorf, Alemania), de acuerdo con lo especificado por el fabricante. Posteriormente se cuantificó el DNA utilizando un equipo NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 y se prepararon diluciones a una concentración de 10 ng/μL para realizar posteriormente la genotipificación de las muestras.

Genotipificación de las variantes seleccionadas

La genotipificación de las variantes seleccionadas se realizó en un equipo para PCR en tiempo real Roche LC480 (Roche, Rokreuz, Suiza). Se utilizaron para tal fin ensayos tipo TaqMan (Applied Biosystems, USA) con los siguientes números de identificación: C__27513218_10 CETP rs3764261, C___901792_1_ LPL rs328, C__8757333_30 LIPC rs1800588, C__30011938_10 LIPG rs7241918 y C__8907629_10 APOA5. Posteriormente, como control de calidad, se realizó la genotipificación de 40 muestras duplicadas, no identificándose genotipos discordantes.

Genotipificación de 40 marcadores de ancestría: primer grupo de adultos mestizos.

El análisis de mezcla étnica se realizó en 1293 adultos. Se realizó la genotipificación de 40 marcadores informativos de ancestría, los cuales se enlistan a continuación: rs174570, rs260690, rs260698, rs356652, rs717225, rs734241, rs871122, rs973787, rs1197062,rs1243370, rs1544450, rs1559163, rs1834619, rs1849384, rs2042314, rs2052386, rs2176046, rs2426552, rs2585897, rs2719921, rs3754675, rs3870336, rs4145160, rs4701693, rs4702241, rs4769128, rs6119879, rs6464749, rs7018273, rs7134749, rs7919248, rs10037656, rs10510511, rs10935320, rs11725412, rs12104228, rs12347078, rs12662498, rs17086231,

rs17130385. Se tomó en cuenta que la diferencia promedio entre las frecuencias de las poblaciones parentales (europeo, americana y africana) fuera mayor a 0.5. (Mao, Bigham et al. 2007, Kosoy, Nassir et al. 2009, Galanter, Fernandez-Lopez et al. 2012, Nievergelt, Maihofer et al. 2013).

Análisis estadístico

La comparación entre las medias estratificando por género para cada uno de los grupos de población mexicana incluidos se realizó mediante la prueba t de Student. El análisis para el porcentaje de individuos con hipoalfalipoproteinemia se realizó mediante la prueba de chi Cuadrada.

Para el análisis de asociación, el de suma de alelos y el de efecto de ancestría se utilizó el análisis de regresión lineal múltiple ajustada por las variables pertinentes en cada caso (edad, género, IMC o percentil de IMC). Se probó para cada polimorfismo qué modelo genético arrojaba un mejor resultado siendo el modelo aditivo el utilizado en todos los casos.

En el caso del análisis de asociación del genotipo con la hipoalfalipoproteinemia, se utilizó regresión logística múltiple, nuevamente ajustada por las variables pertinentes en cada modelo.

El análisis para las subfracciones de C-HDL se realizó mediante comparación de medias a través de una prueba de ANOVA seguida de una post hoc de Bonferroni.

Con el fin de determinar la suma de efectos, se realizó una prueba basada en el ajuste con la distribución t, mientras que la suma de razones de momios fue llevada a cabo mediante una prueba de Cochran-Mantel-Haenszel.

Las variables que no seguían una distribución normal (curtosis >3) fueron transformadas mediante el cálculo del logaritmo base diez, este fue el caso de los triglicéridos.

Todo lo anterior se llevo a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows (IBM, Chicago, IL, USA). Se consideró una $P < 0.05$ como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Asociación de las variantes seleccionadas con los niveles de C-HDL

La tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de asociación de las variantes genéticas con los niveles de C-HDL para los tres grupos de población mexicana: niños mestizos, ambos grupos de adultos mestizos y adultos indígenas. Cuatro de los cinco polimorfismos analizados se asociaron de manera estadísticamente significativa con los niveles de C-HDL en al menos uno de los tres grupos de estudio, siendo el polimorfismo cercano *LIPG* el único que no fue asociado en ninguno de los tres grupos. Cabe mencionar que los alelos de riesgo son los mismos observados para otras poblaciones; sin embargo, los efectos sobre los niveles de C-HDL varían en magnitud para cada uno de los polimorfismos en los tres grupos de estudio.

El SNP ubicado en el promotor del gen *CETP* rs3764261, fue asociado de manera significativa a los niveles de C-HDL en los cuatro grupos: niños mestizos, los dos grupos de adultos mestizos y adultos indígenas ($P=7.12E-9$, $2.23E-6$, $3.25E-5$ y $5.30E-5$ respectivamente). De esta manera, el alelo A (el menos frecuente, ver anexos) fue asociado a niveles mayores de esta lipoproteína y presentó un efecto mayor en el grupo de adultos indígenas a pesar de que el número de individuos es el más pequeño de todos los grupos estudiados ($\beta=2.74$, 2.11 , 2.25 , 3.73 en niños mestizos, primer y segundo grupo de adultos mestizos y adultos indígenas, respectivamente).

El polimorfismo localizado en el promotor del gen *LIPC* rs1800588, se asoció con los niveles de C-HDL en tres grupos: niños mestizos, el primer grupo de adultos mestizos y los adultos indígenas ($P=4.89E-3$, $7.80E-3$, 0.012 respectivamente). El efecto mayor fue observado nuevamente en este último grupo, en todos los casos el alelo T (el de mayor frecuencia en los grupos de población mexicana analizados) mostró incrementar los niveles plasmáticos de C-HDL ($\beta=1.36$, 1.10 ,

2.54 para el grupo de niños mestizos, primer grupo de adultos mestizos y adultos indígenas).

La variante funcional ubicada en el exón 9 del gen *LPL* rs328, se asoció significativamente a los niveles de C-HDL y triglicéridos únicamente en el grupo de niños mestizos ($P=9.1E-4$). En este caso el alelo G (muy poco común en niños y adultos mestizos así como en adultos indígenas) se asocia a niveles más altos de C-HDL ($\beta=3.59$).

El polimorfismo situado en la región 3'UTR del gen *APOA5* rs964184, el alelo G (alelo menor para los dos grupos de mestizos) se asoció de manera significativa a niveles plasmáticos más bajos de C-HDL en niños mestizos, el segundo grupo de adultos mestizos y adultos indígenas ($P=9.50E-4$, $3.31E-5$ y $1E-3$). Para el caso de la asociación con C-HDL mayor efecto de este polimorfismo se observa en los adultos indígenas ($\beta=-1.54$, -2.32 , -3.01 para los niños mestizos, el Segundo grupo de adultos mestizos y los adultos indígenas). Sin embargo el primer grupo de adultos mestizos no mostró asociación significativa.

Con el fin de estimar el efecto global de cada una de las variantes, se realizó un meta análisis para estimar la suma de los efectos tomando en cuenta cada uno de los grupos de población mexicana incluidos en el estudio de manera independiente debido a las diferencias entre cada uno de ellos que incluyen: tamaño de muestra, edad, fecha de toma de muestra y origen étnico. Estos resultados se muestran en la tabla 9 y presentan de manera clara que independientemente de la edad y el grupo étnico las asociaciones observadas en cada uno de los grupos se mantienen en la misma dirección y toman mayor importancia al aumentar el tamaño de muestra tal como era esperado ($P=1.24E-20$, $2.16E-6$, $8.14E-5$, $5.28E-9$ para el polimorfismo CETP rs3664261, LIPC rs1800588, LPL rs328 y APOA5 rs964184, respectivamente.

Tabla 4. Resultados del análisis de asociación para C-HDL

Grupo de población mexicana	SNP														
	CETP (rs3764261)			LIPC (rs1800588)			LPL (rs328)			LIPG (rs7241918)			APOA5 (rs964184)		
	Effect (SE)	P	R ²	Effect (SE)	P	R ²	Effect (SE)	P	R ²	Effect (SE)	P	R ²	Effect (SE)	P	R ²
Niños mestizos (n=1200)	2.74 (0.470)	7.12E-9	0.128	1.36 (0.483)	4.89E-3	0.099	3.59 (1.081)	9.1E-4	0.106	0.27 (1.127)	0.812	0.096	-1.54 (0.464)	9.50E-4	0.110
Adultos mestizos															
Primer Grupo (n=1289)	2.11 (0.443)	2.23E-6	0.213	1.10 (0.414)	7.80E-3	0.208	1.47 (0.977)	0.133	0.203	0.32 (1.066)	0.762	0.200	-0.53 (0.440)	0.233	0.200
Segundo Grupo (n=983)	2.25 (0.539)	3.25E-5	0.236	0.97 (0.538)	0.070	0.223	2.19 (1.138)	0.054	0.219	-1.31 (1.361)	0.338	0.213	2.32 (0.557)	3.31E-5	0.243
Ambos Grupos (n=2276)	2.17 (0.342)	2.10E-10		1.05 (0.328)	1.37E-3		1.77 (0.741)	0.017		-0.30 (0.839)	0.721		1.22 (0.345)	4.28E-4	
Adultos indígenas (n=403)	3.73 (0.913)	5.30E-5	0.132	2.54 (1.007)	0.012	0.107	8.97 (5.861)	0.103	0.095	-0.82 (2.932)	0.780	0.084	3.01 (0.902)	1E-3	0.109
Todos los grupos (n=3875)	2.48 (0.265)	1.24E-20		1.24 (0.262)	2.16E-6		2.40 (0.608)	8.14E-5		-0.14 (0.658)	0.830		1.52 (0.260)	5.28E-9	

CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol, LIPC: lipasa hepática, LPL: lipasa lipoproteica, LIPG: lipasa endotelial, APOA5: apolipoproteína AV, C-HDL: colesterol asociado a lipoproteína de alta densidad, TG: triglicéridos, EE: error estándar, R²: coeficiente de determinación. Datos obtenidos mediante regresión lineal y ajustados por sexo, edad e índice de masa corporal o su percentila cuando fue necesario.

Asociación con la hipoalfalipoproteinemia

Una vez que se observó que cuatro de los cinco polimorfismos se asocian con los niveles de C-HDL en al menos uno de los grupos analizados, se decidió verificar si dicha asociación también podría encontrarse con la dislipidemia ocasionada por los niveles de C-HDL bajos: la hipoalfalipoproteinemia. Los resultados del análisis se presentan en la tabla 5.

El polimorfismo localizado en el promotor del gen *CETP* rs3764261, se asoció de manera significativa a la hipoalfalipoproteinemia en los cuatro grupos de estudio: niños mestizos, los dos grupos de adultos mestizos y adultos indígenas ($P=2.24E-4$, $2.72E-4$, 0.013 , $5.41E-5$).

Por otra parte, el SNP ubicado en el promotor del gen *LIPC* rs1800588, presentó asociación limítrofe para el grupo de adultos indígenas ($P=0.044$) y fue asociado de manera significativa en el primer grupo de adultos mestizos ($P=0.015$) mientras que para los niños y el segundo grupo de adultos mestizos no se observó este comportamiento.

En el caso de la variante situada en el exón nueve del gen *LPL* rs328, únicamente muestra asociación significativa con la hipoalfalipoproteinemia en el grupo de niños mestizos y el primer grupo de adultos mestizos ($P=0.010$ y 0.039 respectivamente).

Si bien el polimorfismo intergénico cercano al gen *LIPG* rs7241918 no fue asociado a los niveles de C-HDL en ningún grupo de población mexicana analizado, al realizar el análisis para el fenotipo de hipoalfalipoproteinemia, éste se asocia de manera significativa con la dislipidemia únicamente en el segundo grupo de adultos mestizos ($P=0.017$).

Por último, el SNP rs964184 ubicado en la región 3'UTR del gen *APOA5* se asoció significativamente a la hipoalfalipoproteinemia en el grupo de los niños mestizos así como en el segundo grupo de adultos mestizos analizados ($P=0.020$ y 0.012). El primer grupo de adultos mestizos no presentó asociación con la dislipidemia, lo cual podría corresponder a que tampoco se observa asociación del polimorfismo con los niveles de C-HDL en este grupo, como se mencionó anteriormente. En el caso de los adultos indígenas, la asociación con la hipoalfalipoproteinemia fue

límitrofe, a pesar de que el alelo G presenta una alta frecuencia en este grupo de población mexicana.

Al igual que en el caso del análisis de asociación con los niveles de C-HDL, se calcularon las razones de momios comunes tomando en cuenta a cada grupo de población mexicana incluido de manera independiente. Únicamente el polimorfismo rs3764261 ubicado en el gen *CETP* y el polimorfismo rs328 del gen *LPL* mostraron estar asociados de manera significativa con la hipoalfalipoproteinemia al tomar en cuenta la totalidad de los individuos de población mexicana ($P=0.005$ y 0.05).

Asociación con los niveles de subfracciones de C-HDL

El alelo A del polimorfismo rs3764261 del gen CETP, se asoció significativamente a una disminución en la subfracción C-HDL3c ($P=0.029$). Como se mencionó en la sección de la metodología, las subfracciones de C-HDL son reportadas como un porcentaje del C-HDL total, por lo que a la disminución de la subfracción antes mencionada corresponde un aumento con significancia limítrofe en la fracción HDL2b, la de mayor tamaño (ver anexos).

La variante 1800588 localizada en el gen LIPC no fue asociada de manera significativa a la modulación de alguna subfracción de C-HDL. Este también es el caso de las variantes rs328 y rs7241918, localizadas en los genes LPL y LIPG respectivamente.

Por último el alelo G de la variante rs964184 situada en el gen APOA5, se asoció significativamente al aumento en la fracción C-HDL3b, la cual es compensada por una disminución en la fracción C-HDL2a, la cual no llega a ser significativa.

Efecto combinado de los 4 alelos de riesgo

Como se mencionó anteriormente, cuatro de los cinco polimorfismos seleccionados se asociaron a los niveles ya sea de C-HDL, o de esta lipoproteína y triglicéridos. Si bien, al realizar el análisis de asociación a estos parámetros pudimos obtener la contribución individual de estas variantes a la modulación de los mismos, es de gran interés calcular la contribución conjunta de los cuatro polimorfismos con asociación significativa. Para ello se realizó un análisis para evaluar el efecto de la suma de alelos que disminuyen las concentraciones de C-HDL (que en este caso no siempre son los menos frecuentes). Los resultados se muestran en la tabla 6. En ella podemos observar, que la magnitud del efecto de los cuatro alelos asociados sumados sobre los niveles de C-HDL es mayor en adultos indígenas, seguido por los niños mestizos y por último los adultos mestizos.

Tabla 6. Análisis para la suma de alelos que disminuyen el C-HDL

Niños mestizos			Adultos mestizos			Adultos indígenas		
Efecto (EE)	P	R ²	Efecto (EE)	P	R ²	Efecto (EE)	P	R ²
-1.81 (0.270)	3.66E-11	0.135	-1.66 (0.303)	6.07E-8	0.262	-3.21 (0.564)	6.19E-8	0.187

EE: error estándar. R². Coeficiente de determinación. Datos obtenidos mediante regresión lineal múltiple.

Por otra parte, al analizar los coeficientes de determinación obtenidos mediante el análisis de regresión lineal, podemos ver que la variación genética explicada por el modelo representa desde un 13.5% en niños mestizos con menor tiempo de exposición al ambiente hasta un 26.2% en los adultos mestizos.

La figura 2, mostrada a continuación muestra que, el comportamiento, es decir la disminución de las concentraciones plasmáticas de C-HDL es inversamente proporcional de la dosis alélica, lo anterior se observa en los tres grupos analizados: niños mestizos, adultos mestizos y adultos indígenas.

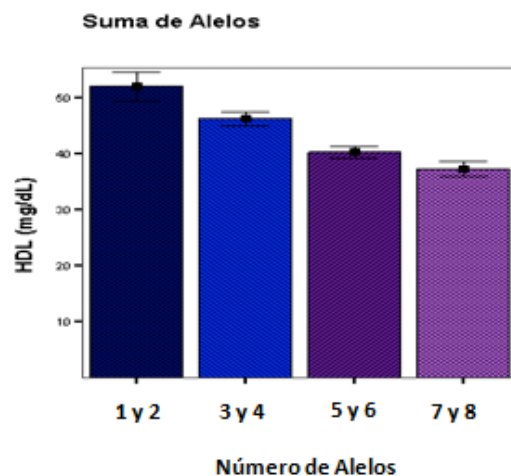


Figura 2. Suma de alelos que disminuyen el C-HDL. Se muestra la disminución de las concentraciones plasmáticas de C-HDL al incrementarse el número de alelos que disminuyen a esta lipoproteína.

Asociación de las variantes seleccionadas con otros lípidos sanguíneos

En la tabla 7 se presentan los resultados del polimorfismo rs328 del gen *LPL* y rs964184 localizado en la región 3'UTR del gen *APOA5*. En ella podemos observar que la variante del gen *LPL* está asociada significativamente con niveles más bajos de triglicéridos en los niños mestizos y el primer grupo de adultos mestizos ($P=2.45E-4$, $9.63E-4$ y $\beta=-0.08$ y -0.09 respectivamente).

Al igual que para el análisis de asociación con los niveles de C-HDL se realizó un meta análisis tomando en cuenta cada grupo poblacional por separado. Como resultado de este análisis observamos que aunque el segundo grupo de adultos mestizos y el de adultos indígenas no se asoció, al incluir a todos los individuos el valor de significancia disminuye como era esperado ($P=2.66E-14$).

Para el caso del polimorfismo del gen *APOA5*, se observa asociación significativa con los niveles de triglicéridos en todos los grupos de población mexicana estudiados exceptuando al de adultos indígenas, lo cual llama la atención debido a que el alelo G presenta una alta frecuencia y éste fue asociado con los niveles de C-HDL ($P=7.51 E-10$, $4.02E-11$, $1.76E-7$ y 0.336).

Al realizar el análisis de la suma de efectos tomando en cuenta cada uno de los grupos, de manera interesante, vemos que la asociación de esta variante con los niveles de triglicéridos es la que presenta el mejor valor de significancia en todo el estudio lo que sugiere la gran relevancia de este polimorfismo en la modulación principalmente de los niveles de triglicéridos ($P=2.54E-29$).

Tabla 7. Análisis de asociación de las variantes estudiadas con los niveles de triglicéridos.

Grupo de Población Mexicana	LPL (rs328)			APOA5 (rs964184)		
	Efecto (SE)	P	R ²	Efecto (SE)	P	R ²
Niños Mestizos (n=1200)	-0.08 (0.021)	2.45E-4	0.170	0.056 (0.009)	7.51 E-10	0.180
Adultos Mestizos						
Primer Grupo (n=1289)	-0.07 (0.020)	9.63E-4	0.250	0.058 (0.008)	4.02E-11	0.269
Segundo Grupo (n=983)	-0.04 (0.023)	0.134	0.163	0.06 (0.011)	1.76E-7	0.183
Ambos Grupos (n=2276)	-0.06 (0.015)	1.59E-4		0.059 (0.006)	2.47E-19	
Adultos Indígenas (n=403)	-0.002 (0.089)	0.985	0.089	-0.01(0.015)	0.336	0.102
Total (n=3875)	-0.064 (0.012)	2.66E-14		0.050 (0.005)	2.54E-29	

LPL: lipasa lipoproteíca, APOA5: apolipoproteína AV, EE: error estándar, P: significancia, R²:coeficiente de determinación. Triglicéridos normalizados mediante aplicación de log.

Efecto de la ancestría en la asociación con los niveles de lípidos sanguíneos

Debido a que la población mexicana es en su mayoría producto del mestizaje entre indígenas y europeos, se realizó un análisis para descartar a la mezcla étnica como una variable confusora en los análisis de asociación anteriormente mostrados. En la tabla 8 se presentan los resultados de la asociación de las variantes estudiadas antes y después del ajuste por ancestría, el cual fue llevado a cabo a partir de la información proporcionada por 40 marcadores informativos. En ella se observa que con excepción del polimorfismo rs1800588 ubicado en el gen *LIPC*, que después del ajuste por mezcla étnica mejora su significancia de asociación en un orden de magnitud (P=7.80E-3, 3.1E-4 antes y después de la corrección), el resto de las variantes no se modificaron de manera significativa en cuanto a su asociación con los niveles tanto de C-HDL como de triglicéridos después del ajuste por esta variable, sugiriendo que la mezcla étnica no es un confusor importante en la población de estudio.

Tabla 8. Efecto de la mezcla étnica en el análisis de asociación

Gen	SNP	Alelo analizado	Rasgo	Efecto (EE)	P	P*	R ²
CETP	rs3764261	A	HDL	2.16(0.442)	2.23E-6	1.14E-6	0.211
LIPC	rs1800588	T	HDL	1.58 (0.437)	7.80E-3	3.1E-4	0.205
LPL	rs328	G	HDL	1.17 (0.983)	0.133	0.232	0.201
			TG	-0.06 (0.020)	0.001	0.002	0.250
LIPG	rs7241918	G	HDL	-0.01 (1.073)	0.762	0.992	0.198
			TG	-0.39 (0.441)	0.232	0.365	0.197
APOA5	rs964184	G	HDL	0.06 (0.009)	4.02E-11	1.91E-11	0.269

CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol, *LIPC*: lipasa hepática, *LPL*: lipasa lipoproteica, *LIPG*: lipasa endotelial, *APOA5*: apolipoproteína AV, SNP: polimorfismo de un solo nucleótido, EE: error estándar, P: significancia antes del ajuste por ancestría, P*: significancia después del ajuste por mezcla étnica, R²: coeficiente de determinación.

DISCUSIÓN

Parámetros bioquímicos

Estudios previos muestran una prevalencia alta de hipoalfalipoproteinemia en población infantil mexicana (alrededor de 15%, siendo mayor en las niñas que en los niños) (Flores-Dorantes, Arellano-Campos et al. 2010, Santesso, Akl et al. 2012). Esta tendencia con respecto al género se invierte a partir de la pubertad, cuando factores hormonales ejercen su efecto incrementando los niveles de C-HDL en las mujeres. Los adultos indígenas presentaron una frecuencia de hipoalfalipoproteinemia mayor a los adultos mestizos (46.8% vs 30.01). Este valor es similar al reportado por ((Rodríguez-Moran, Guerrero-Romero et al. 2008) en población indígena del Estado de Durango. En otro estudio realizado con indígenas del centro de Brasil se informan medias muy similares para los niveles de C-HDL en las mujeres a las observadas en este estudio (Agostinho Gimeno, Rodrigues et al. 2007). De manera interesante, los niveles bajos de C-HDL en un grupo de población Cherokee han sido asociados de manera negativa con el porcentaje de ancestría indígena (Lee, Begum et al. 2004), lo cual es consistente con los datos obtenidos ya que los individuos mestizos, con un menor porcentaje de esta ancestría, presentan niveles más altos de C-HDL en comparación con el grupo de población indígena mexicana estudiado. Otro dato a considerar en nuestros resultados es que no se observa diferencia significativa entre las medias de los niveles de C-HDL de hombres y mujeres en el grupo de población indígena analizado.

Contribución de variantes genéticas a la variación de los niveles de C-HDL

Polimorfismo rs3764261 del gen CETP

Cuatro de los cinco polimorfismos analizados se asociaron significativamente con los niveles de C-HDL en al menos un grupo de población mexicana. De manera notable el polimorfismo rs3764261 ubicado en el gen *CETP*, fue el único

asociado en los cuatro grupos estudiados: niños mestizos, los dos grupos de adultos mestizos y adultos indígenas, de lo cual no existe un estudio previo en población mexicana. En todos ellos se observa que el alelo A, que presenta una frecuencia menor, incrementa los niveles de C-HDL, lo cual es consistente con todos los estudios realizados para esta variante en diversas poblaciones (Teslovich, Musunuru et al. 2010). De manera interesante, esta variante, fue asociada también a la hipoalfalipoproteinemia en los cuatro grupos estudiados, lo cual confirma su importante participación en la modulación de los niveles de C-HDL.

Un estudio muy reciente realizado en individuos mexicanos mestizos, muestra que a diferencia de los individuos europeos, la variante rs3764261 no es la principalmente asociada con los niveles de C-HDL, ya que la variante rs1532624, ubicada en desequilibrio de ligamiento con respecto a ella, presenta, en un grupo de 2240 mexicanos mestizos con hipertrigliceridemia una asociación significativa con los niveles de C-HDL de $1.39E-24$. (Weissglas-Volkov, Aguilar-Salinas et al. 2013).

Otro punto novedoso de este trabajo es el análisis de asociación que fue llevado a cabo para el subgrupo de niños mestizos con subfracciones de C-HDL. De manera interesante, el polimorfismo del gen *CETP* rs3764261 fue asociado a mayores niveles de la subfracción C-HDL2b que es compensado con una disminución en los niveles de C-HDL3c. Existen reportes de que la disminución en la actividad de CETP, lo cual se ha propuesto que podría ser el efecto final de la variante, favorece la formación de fracciones grandes de C-HDL, lo cual es consistente con el resultado obtenido (Huesca-Gomez, Carreon-Torres et al. 2004, Bellanger, Julia et al. 2012). Hasta el momento no existen estudios que asocien a este polimorfismo con los niveles de las subfracciones de C-HDL. Sin embargo, algunos trabajos muestran que la subfracción C-HDL2b correlaciona mejor con la protección al riesgo cardiovascular que los niveles de HDL totales (Ma,Zhao et al. 2009). Además, la disminución en los niveles de C-HDL2b relacionada a la actividad de CETP se ha asociado en diversas condiciones patológicas como el

hígado graso no alcohólico, así como con una edad más temprana de aparición de infarto agudo al miocardio y se ven modificados cuando el paciente sufre proteinuria (Ma, Zhao et al. 2009, Soto-Miranda, Carreon-Torres et al. 2012). (Zeller, Masson et al. 2007).

Polimorfismo rs1800588 del gen LIPC

La asociación del alelo T del polimorfismo rs1800588 con niveles mayores de C-HDL en distintos grupos de población mexicana es consistente con reportes de asociación de esta variante en otras poblaciones infantiles y de adultos de diferentes poblaciones de origen europeo (Guerra, Wang et al. 1997, Jansen, Verhoeven et al. 1997, Murtomaki, Tahvanainen et al. 1997, Chen, Srinivasan et al. 2003). Es importante señalar que sólo existe un estudio previo realizado con tres diferentes poblaciones nativas canadienses, en el cual no se encontró asociación del polimorfismo *LIPC* rs1800588 con los niveles de C-HDL (Hegele, Harris et al. 1999). Sin embargo, a diferencia de lo observado en las poblaciones de origen europeo, el alelo T presentó una frecuencia de hasta 70% en las poblaciones mexicanas. Este comportamiento en la frecuencia puede deberse tanto a diferencias étnicas en los patrones de desequilibrio de ligamiento (Hamblin, Buckler et al. 2011).

Al realizar el análisis de asociación para las subfracciones, este polimorfismo no mostró diferencias significativas en ninguna de ellas, lo cual podría indicar que el polimorfismo no induce cambios de manera particular sobre alguna subfracción en nuestra población o bien, que debe ser analizado con un mayor tamaño de muestra ya que con el utilizado no es posible detectar el efecto de la variante. En algunos informes previos se observa que el polimorfismo *LIPC* rs1800588 está asociado significativamente con un incremento en la fracción HDL2c sobre todo en mujeres y se sugiere que podría estar involucrado en la distribución del tamaño de partículas de HDL (Couture, Otvos et al. 2000).

Polimorfismo rs328 del gen LPL

El polimorfismo rs328, se asoció a los niveles de C-HDL en el grupo de niños mestizos y de manera limítrofe en el segundo grupo de adultos mestizos. Sin embargo, en los cuatro grupos analizados podemos observar niveles mayores de esta lipoproteína en los portadores del alelo G, producto de la ganancia de función provocada por la variante, tal como ha sido ampliamente descrito en la literatura en estudios realizados para diversas poblaciones (Gagne, Larson et al. 1999).

De manera importante, este polimorfismo también se asoció a los niveles de triglicéridos lo cual nuevamente es consistente con los estudios realizados principalmente en poblaciones de origen europeo y asiático (Fisher, Humphries et al. 1997, Corella, Guillen et al. 2002, Nierman, Rip et al. 2005, Sagoo, Tatt et al. 2008, Qi, Liu et al. 2011), esta vez en los niños mestizos y el primer grupo de adultos mestizos. En estos mismos grupos, se encontró asociación con la hipotalipoproteinemia (Groenemeijer, Hallman et al. 1997).

La frecuencia alélica del alelo G de la variante rs328 para la población mexicana fue significativamente menor que en población de origen europeo según lo reportado por el HAPMAP. Dada la importancia del gen *LPL* dentro del metabolismo tanto del C-HDL como de los triglicéridos, es probable que otras variantes en el gen tengan más influencia en su modulación en nuestra población, aunque hasta el momento no se han realizado estudios al respecto.

Cuando se realizó el análisis para las subfracciones de C-HDL para este polimorfismo, no observamos cambios significativos en ninguna de ellas de manera puntual. Sin embargo, debido a la baja frecuencia del alelo G, y al tamaño de muestra utilizado, es probable que el efecto de éste no haya podido observarse de manera adecuada. Debido a que no existe ningún reporte previo al respecto, estudios con un mayor tamaño de muestra podrían indicar con mayor certeza si efectivamente la variante tiene o no un papel en la modulación de alguna de ellas.

Polimorfismo rs7241918 del gen LIPG

Este polimorfismo fue el único que no mostró asociación con ningún lípido sanguíneo en los grupos de población analizada incluidos en el estudio. Lo anterior representa una diferencia notable con la población europea debido a que en ésta, la variante rs7241918 se encuentra reportada como la principal localizada en el gen *LIPG* para este rasgo. Parte de esta discrepancia puede explicarse debido a que el alelo G, que fue reportado como asociado a menores niveles de C-HDL, es muy poco frecuente tanto en mestizos como en indígenas a diferencia de la alta frecuencia que presenta en caucásicos (Teslovich, Musunuru et al. 2010). Cabe señalar que el reciente descubrimiento del gen *LIPG* implica poca información disponible la mayoría de la cual proviene de estudios realizados en modelos in vitro o murinos (Paradis and Lamarche 2006).

El análisis de las subfracciones de C-HDL no arrojó ningún resultado significativo, lo cual era esperado debido a que no se encontró asociación con la población total de C-HDL.

Polimorfismo rs964184 del gen APOA5

El polimorfismo rs964184 localizado en el gen *APOA5* fue asociado con los niveles C-HDL en tres de los cuatro grupos de población mexicana analizados de manera significativa: niños mestizos, el segundo grupo de adultos mestizos y los adultos indígenas. Respecto a este resultado, el polimorfismo ha sido asociado principalmente con los niveles de triglicéridos y de manera menos significativa con los niveles de C-HDL en población de origen europeo. Nuevamente observamos discrepancias entre los resultados del análisis de asociación de ambos grupos de adultos mestizos. En el caso de esta variante, la edad no es un factor a tomar en cuenta debido a que los niños mestizos, con un tiempo de exposición a los factores ambientales aún menor que el de este primer grupo. Sin embargo, debemos recordar que en el mayor número de casos los resultados de las réplicas en los estudios de asociación no son idénticos y que podrían existir otras variables

relacionadas a ello (1999, Lohmueller, Pearce et al. 2003). Los resultados anteriormente mencionados corresponden con los grupos en los que se observa asociación con la hipoalafalipoproteinemia lo cual sólo fue observado anteriormente para el polimorfismo del gen *CETP* y para lo cual no hay un reporte previo.

Además, la variante rs964184 también fue asociada significativamente con los niveles de triglicéridos en todos los grupos de población mexicana analizados con excepción del grupo de adultos indígenas (Weissglas-Volkov, Aguilar-Salinas et al. 2010). Es necesario destacar que la asociación a este rasgo, es la más significativa en todo el estudio, ello es consistente con lo mostrado por un estudio reciente en el que se reporta a esta variante como una de las principalmente involucradas en la modulación de los niveles de triglicéridos y la principal ubicada en el gen *APOA5* en población mexicana mestiza. Además, lo anterior también corresponde al mecanismo funcional propuesto en el que la variante ocasiona una disminución en los niveles de APOAV circulantes (Weissglas-Volkov, Aguilar-Salinas et al. 2013).

Es de llamar la atención que la frecuencia del alelo G es significativamente mayor en los adultos indígenas, en comparación con los grupos de población mestiza infantil y adulta. (0.516 vs 0.377). Otra diferencia importante entre el grupo de los adultos indígenas y los de mexicanos mestizos es que en los primeros, el alelo G fue asociado únicamente con los niveles de C-HDL, mientras que en los segundos se observó asociación tanto con los niveles de C-HDL como, de manera más significativa con los triglicéridos, tal como era esperado. Un estudio sobre la estructura de los haplotipos en poblaciones amerindias podría brindar información para conocer si existen otras variantes dentro de estos genes que ejercen mayor influencia en la modulación de los lípidos sanguíneos (Cantor and Wilcox 2011) (Li and Leal 2008).

También observamos un efecto significativo sobre la subfracciones C-HDL2a y C-HDL2b, pero se requiere mayor información a nivel funcional para justificar dicho resultado ya que no había sido reportado con anterioridad ya que el papel de

APOAV en el metabolismo de las partículas de C-HDL aún no es claro. Sin embargo, la disminución observada en los niveles de las dos subfracciones antes mencionadas se han asociado con resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 en población infantil mexicana (Perez-Mendez, Torres-Tamayo et al. 2007).

Resultados globales

A partir los datos obtenidos con el análisis de suma de efectos podemos observar que cuatro de los cinco polimorfismos están asociados a los niveles de C-HDL tomando en cuenta la totalidad de los individuos incluidos en el estudio. Únicamente el polimorfismo rs7241918 ubicado del gen *LIPG* carece de asociación significativa, lo cual es consistente con los resultados individuales. Por otra parte, dos de ellos, el polimorfismo rs328 del gen *LPL* y el rs964184 del gen *APOA5* mostraron asociación significativa con los niveles de triglicéridos en éste mismo análisis.

Es necesario resaltar que, la mezcla étnica no tuvo influencia alguna en la asociación de este polimorfismo con los niveles de C-HDL o los de triglicéridos, por lo que podemos descartar el fenómeno de estratificación poblacional y por lo tanto los falsos positivos (Jiang, Epstein et al. 2013).

Además, la suma de alelos revela que, al tomar en cuenta a los cuatro polimorfismos que sí mostraron asociación significativa en los grupos de población mexicana, podemos explicar, desde un 13% en el grupo de los niños mestizos hasta un 26% en los adultos mestizos, de la varianza genética de los niveles de C-HDL, esto último es atípico en los estudios genéticos de rasgos complejos tomando en cuenta que en total las variantes comunes son capaces de explicar un 61.8 % de dicha varianza en los niveles de C-HDL (Cohorts for, Aging Research in Genetic Epidemiology et al. 2013). Lo anterior confirma la importancia de estas variantes en la modulación de ésta lipoproteína no sólo en las poblaciones europeas, en los cuales se han realizado la mayor parte de los estudios, sino también en poblaciones mestizas como la nuestra y más importante aún en poblaciones indígenas, dónde existe escasa información al respecto.

En estudios anteriores se ha sugerido que el componente amerindio podría ser clave en la comprensión de los niveles bajos de C-HDL que prevalecen en la población de nuestro país (Flores-Dorantes, Arellano-Campos et al. 2010, Weissglas-Volkov, Aguilar-Salinas et al. 2010). Sin embargo, los polimorfismos analizados en el presente estudio no presenta diferencias concluyentes sobre la magnitud de los efectos ejercidos por cada uno de ellos entre los grupos mestizos y los indígenas. Es posible que existan polimorfismos aún no descritos y propios de las poblaciones nativas que contribuyan a demostrar esta hipótesis. Sin embargo, debemos tomar en cuenta que se trata de un rasgo complejo, y que la influencia de los factores ambientales interactuando con los genéticos es fundamental, aunque este tipo de interacciones todavía son difíciles de establecer (Aguilar-Salinas, Canizales-Quinteros et al. 2009).

Por otra parte, en cuanto a los niveles particularmente bajos de C-HDL en las poblaciones de América Latina, algunos trabajos proponen que la funcionalidad del C-HDL, medida por contenido enzimático, proteico y lipídico adecuado así como su capacidad de eflujo y capacidades antioxidantes, podría ser más importante que los niveles mismos (Camont, Chapman et al. 2011). Sin embargo, son necesarios estudios funcionales que puedan brindar datos concluyentes a este respecto en nuestra población.

Las estrategias genéticas nuevas intentan establecer la heredabilidad del rasgo que no ha sido explicada por las metodologías utilizadas hasta el momento (Manolio, Collins et al. 2009). El uso reciente de la secuenciación masiva no ha revelado hallazgos novedosos (Cohorts for, Aging Research in Genetic Epidemiology et al. 2013). Así que el siguiente paso hacia un entendimiento más amplio sobre la genética de los niveles de C-HDL todavía es incierto. Recientemente, las estrategias de la epigenética y las redes biológicas proponen ser las que brinden la información que estamos buscando (Guay, Brisson et al. 2013).

CONCLUSIONES

Los polimorfismos rs3764261, rs1800588, rs328 y rs964184 localizados en los genes *CETP*, *LIPC*, *LPL* y *APOA5* respectivamente, contribuyen a la modulación de los niveles plasmáticos de C-HDL en al menos un grupo de población mexicana incluido en el estudio.

Estas cuatro variantes de manera conjunta, lograron explicar en promedio un 19.3% de la variación en las concentraciones de HDL en población mexicana lo que, dada la contribución discreta de cada uno de los polimorfismos a explicar el fenómeno, es relevante.

Además los genotipos de las variantes rs3764261, rs1800588, rs328, rs7241918 y rs964184 ubicadas en los genes *CETP*, *LIPC*, *LPL*, *LIPG* y *APOA5* de manera respectiva, están asociados a hipoalfalipoproteinemia en por lo menos uno de los tres grupos de población mexicana analizados. Si bien de manera parcial también explican el fenotipo originado por la presencia de niveles bajos de C-HDL.

Finalmente las variantes analizadas presentes en los genes *CETP* y *APOA5* modulan los niveles de subfracciones de C-HDL en niños mestizos. Sin embargo, se requieren de estudios funcionales que identifiquen los mecanismos por los que estas variantes llevan a cabo las funciones aquí descritas.

PERSPECTIVAS

Realizar estudios funcionales que incluyan cuantificación del mRNA, actividad y masa de CETP para el polimorfismo rs3764261.

Analizar otros polimorfismos comunes localizados en otros genes, cuya participación sobre el metabolismo de lípidos sea conocida y que además estén asociados con alta significancia en población europea, principalmente a los niveles de C-HDL, en los distintos grupos de población mexicana, con la finalidad de determinar si éstos podrían contribuir o no a la varianza genética del rasgo.

Realizar un análisis de haplotipos para las poblaciones indígenas mexicanas con el propósito de identificar las posibles diferencias entre éstas y las poblaciones mestiza y europea.

REFERENCIAS

1. (1999). "Freely associating." *Nat Genet* **22**(1): 1-2.
2. Agellon, L. B., E. M. Quinet, T. G. Gillette, D. T. Drayna, M. L. Brown and A. R. Tall (1990). "Organization of the human cholesteryl ester transfer protein gene." *Biochemistry* **29**(6): 1372-1376.
3. Agostinho Gimeno, S. G., D. Rodrigues, H. Pagliaro, E. N. Cano, E. E. de Souza Lima and R. G. Baruzzi (2007). "[Metabolic and anthropometric profile of Aruak Indians: Mehinaku, Waura and Yawalapiti in the Upper Xingu, Central Brazil, 2000-2002]." *Cad Saude Publica* **23**(8): 1946-1954.
4. Aguilar-Salinas, C. A., S. Canizales-Quinteros, R. Rojas-Martinez, R. Mehta, M. T. Villarreal-Molina, O. Arellano-Campos, L. Riba, F. J. Gomez-Perez and M. T. Tusie-Luna (2009). "Hypoalphalipoproteinemia in populations of Native American ancestry: an opportunity to assess the interaction of genes and the environment." *Curr Opin Lipidol* **20**(2): 92-97.
5. Aguilar-Salinas, C. A., G. Olaiz, V. Valles, J. M. Torres, F. J. Gomez Perez, J. A. Rull, R. Rojas, A. Franco and J. Sepulveda (2001). "High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey." *J Lipid Res* **42**(8): 1298-1307.
6. Ameis, D., G. Stahnke, J. Kobayashi, J. McLean, G. Lee, M. Buscher, M. C. Schotz and H. Will (1990). "Isolation and characterization of the human hepatic lipase gene." *J Biol Chem* **265**(12): 6552-6555.
7. Anderson, H. A., E. M. Hiltbold and P. A. Roche (2000). "Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation." *Nat Immunol* **1**(2): 156-162.
8. Badeau, R. M., J. Metso, P. T. Kovanen, M. Lee-Rueckert, M. J. Tikkanen and M. Jauhiainen (2013). "The impact of gender and serum estradiol levels on HDL-mediated reverse cholesterol transport." *Eur J Clin Invest* **43**(4): 317-323.
9. Barter, P. J., G. J. Hopkins and G. D. Calvert (1982). "Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins." *Biochem J* **208**(1): 1-7.
10. Bellanger, N., Z. Julia, E. F. Villard, P. El Khoury, E. Duchene, M. J. Chapman, N. Fournier, W. Le Goff and M. Guerin (2012). "Functionality of postprandial larger HDL2 particles is enhanced following CETP inhibition therapy." *Atherosclerosis* **221**(1): 160-168.
11. Boes, E., S. Coassin, B. Kollerits, I. M. Heid and F. Kronenberg (2009). "Genetic-epidemiological evidence on genes associated with HDL cholesterol levels: a systematic in-depth review." *Exp Gerontol* **44**(3): 136-160.
12. Brill, A., T. A. Fuchs, A. K. Chauhan, J. J. Yang, S. F. De Meyer, M. Kollnberger, T. W. Wakefield, B. Lammle, S. Massberg and D. D. Wagner (2011). "von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models." *Blood* **117**(4): 1400-1407.
13. Cai, S. J., D. M. Wong, S. H. Chen and L. Chan (1989). "Structure of the human hepatic triglyceride lipase gene." *Biochemistry* **28**(23): 8966-8971.

14. Camont, L., M. J. Chapman and A. Kontush (2011). "Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease." Trends Mol Med **17**(10): 594-603.
15. Cantor, R. M. and M. Wilcox (2011). "Detecting rare variant associations: methods for testing haplotypes and multiallelic genotypes." Genet Epidemiol **35 Suppl 1**: S85-91.
16. Cao, Y., D. M. Stafforini, G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre and S. M. Prescott (1998). "Expression of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is transcriptionally regulated by mediators of inflammation." J Biol Chem **273**(7): 4012-4020.
17. Carpintero, R., L. Gruaz, K. J. Brandt, A. Scanu, D. Faille, V. Combes, G. E. Grau and D. Burger (2010). "HDL interfere with the binding of T cell microparticles to human monocytes to inhibit pro-inflammatory cytokine production." PLoS One **5**(7): e11869.
18. Chang, M. H., R. M. Ned, Y. Hong, A. Yesupriya, Q. Yang, T. Liu, A. C. Janssens and N. F. Dowling (2011). "Racial/ethnic variation in the association of lipid-related genetic variants with blood lipids in the US adult population." Circ Cardiovasc Genet **4**(5): 523-533.
19. Chen, W., S. R. Srinivasan, E. Boerwinkle, G. S. Berenson and S. Bogalusa Heart (2003). "Hepatic lipase promoter C-514T polymorphism influences serial changes in HDL cholesterol levels since childhood: the Bogalusa Heart Study." Atherosclerosis **169**(1): 175-182.
20. Cockerill, G. W., K. A. Rye, J. R. Gamble, M. A. Vadas and P. J. Barter (1995). "High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(11): 1987-1994.
21. Cohorts for, H., C. Aging Research in Genetic Epidemiology, A. C. Morrison, A. Voorman, A. D. Johnson, X. Liu, J. Yu, A. Li, D. Muzny, F. Yu, K. Rice, C. Zhu, J. Bis, G. Heiss, C. J. O'Donnell, B. M. Psaty, L. A. Cupples, R. Gibbs and E. Boerwinkle (2013). "Whole-genome sequence-based analysis of high-density lipoprotein cholesterol." Nat Genet **45**(8): 899-901.
22. Corella, D., M. Guillen, C. Saiz, O. Portoles, A. Sabater, J. Folch and J. M. Ordovas (2002). "Associations of LPL and APOC3 gene polymorphisms on plasma lipids in a Mediterranean population: interaction with tobacco smoking and the APOE locus." J Lipid Res **43**(3): 416-427.
23. Couture, P., J. D. Otvos, L. A. Cupples, C. Lahoz, P. W. Wilson, E. J. Schaefer and J. M. Ordovas (2000). "Association of the C-514T polymorphism in the hepatic lipase gene with variations in lipoprotein subclass profiles: The Framingham Offspring Study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(3): 815-822.
24. Davidson, W. S. and T. B. Thompson (2007). "The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins." J Biol Chem **282**(31): 22249-22253.
25. Deeb, S. S. and R. Peng (2000). "The C-514T polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter diminishes its activity." J Lipid Res **41**(1): 155-158.

26. Endo, K., H. Yanagi, J. Araki, C. Hirano, K. Yamakawa-Kobayashi and S. Tomura (2002). "Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren." *Hum Genet* **111**(6): 570-572.
27. Fisher, R. M., S. E. Humphries and P. J. Talmud (1997). "Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis." *Atherosclerosis* **135**(2): 145-159.
28. Fleisher, L. N., A. R. Tall, L. D. Witte, R. W. Miller and P. J. Cannon (1982). "Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins." *J Biol Chem* **257**(12): 6653-6655.
29. Florentin, M., E. N. Liberopoulos, A. S. Wierzbicki and D. P. Mikhailidis (2008). "Multiple actions of high-density lipoprotein." *Curr Opin Cardiol* **23**(4): 370-378.
30. Flores-Dorantes, T., O. Arellano-Campos, R. Posadas-Sanchez, T. Villarreal-Molina, A. Medina-Urrutia, S. Romero-Hidalgo, P. Yescas-Gomez, O. Perez-Mendez, E. Jorge-Galarza, T. Tusie-Luna, M. Villalobos-Comparan, L. Jacobo-Albavera, H. Villamil-Ramirez, B. E. Lopez-Contreras, C. A. Aguilar-Salinas, C. Posadas-Romero and S. Canizales-Quinteros (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**(17-18): 1214-1217.
31. Friedlander, Y., J. D. Kark and Y. Stein (1986). "Complex segregation analysis of low levels of plasma high-density lipoprotein cholesterol in a sample of nuclear families in Jerusalem." *Genet Epidemiol* **3**(5): 285-297.
32. Fruchart-Najib, J., E. Bauge, L. S. Niculescu, T. Pham, B. Thomas, C. Rommens, Z. Majd, B. Brewer, L. A. Pennacchio and J. C. Fruchart (2004). "Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5." *Biochem Biophys Res Commun* **319**(2): 397-404.
33. Gagne, S. E., M. G. Larson, S. N. Pimstone, E. J. Schaefer, J. J. Kastelein, P. W. Wilson, J. M. Ordovas and M. R. Hayden (1999). "A common truncation variant of lipoprotein lipase (Ser447X) confers protection against coronary heart disease: the Framingham Offspring Study." *Clin Genet* **55**(6): 450-454.
34. Galanter, J. M., J. C. Fernandez-Lopez, C. R. Gignoux, J. Barnholtz-Sloan, C. Fernandez-Rozadilla, M. Via, A. Hidalgo-Miranda, A. V. Contreras, L. U. Figueroa, P. Raska, G. Jimenez-Sanchez, I. S. Zolezzi, M. Torres, C. R. Ponte, Y. Ruiz, A. Salas, E. Nguyen, C. Eng, L. Borjas, W. Zabala, G. Barreto, F. R. Gonzalez, A. Ibarra, P. Taboada, L. Porras, F. Moreno, A. Bigham, G. Gutierrez, T. Brutsaert, F. Leon-Velarde, L. G. Moore, E. Vargas, M. Cruz, J. Escobedo, J. Rodriguez-Santana, W. Rodriguez-Cintron, R. Chapela, J. G. Ford, C. Bustamante, D. Seminara, M. Shriver, E. Ziv, E. G. Burchard, R. Haile, E. Parra, A. Carracedo and L. Consortium (2012). "Development of a panel of genome-wide ancestry informative markers to study admixture throughout the Americas." *PLoS Genet* **8**(3): e1002554.
35. Garner, B., A. R. Waldeck, P. K. Witting, K. A. Rye and R. Stocker (1998). "Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of

- lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII." *J Biol Chem* **273**(11): 6088-6095.
36. Groenemeijer, B. E., M. D. Hallman, P. W. Reymers, E. Gagne, J. A. Kuivenhoven, T. Bruin, H. Jansen, K. I. Lie, A. V. Brusckhe, E. Boerwinkle, M. R. Hayden and J. J. Kastelein (1997). "Genetic variant showing a positive interaction with beta-blocking agents with a beneficial influence on lipoprotein lipase activity, HDL cholesterol, and triglyceride levels in coronary artery disease patients. The Ser447-stop substitution in the lipoprotein lipase gene. REGRESS Study Group." *Circulation* **95**(12): 2628-2635.
 37. Grundy, S. M., G. L. Vega, J. D. Otvos, D. L. Rainwater and J. C. Cohen (1999). "Hepatic lipase activity influences high density lipoprotein subclass distribution in normotriglyceridemic men. Genetic and pharmacological evidence." *J Lipid Res* **40**(2): 229-234.
 38. Gu, L., M. W. Johnson and A. J. Lusis (1999). "Quantitative trait locus analysis of plasma lipoprotein levels in an autoimmune mouse model : interactions between lipoprotein metabolism, autoimmune disease, and atherogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(2): 442-453.
 39. Guay, S. P., D. Brisson, B. Lamarche, P. Marceau, M. C. Vohl, D. Gaudet and L. Bouchard (2013). "DNA methylation variations at CETP and LPL gene promoter loci: new molecular biomarkers associated with blood lipid profile variability." *Atherosclerosis* **228**(2): 413-420.
 40. Guerra, R., J. Wang, S. M. Grundy and J. C. Cohen (1997). "A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4532-4537.
 41. Hahn, P. F. (1943). "Abolishment of Alimentary Lipemia Following Injection of Heparin." *Science* **98**(2531): 19-20.
 42. Hamblin, M. T., E. S. Buckler and J. L. Jannink (2011). "Population genetics of genomics-based crop improvement methods." *Trends Genet* **27**(3): 98-106.
 43. Hegele, R. A., S. B. Harris, J. H. Brunt, T. K. Young, A. J. Hanley, B. Zinman and P. W. Connelly (1999). "Absence of association between genetic variation in the LIPC gene promoter and plasma lipoproteins in three Canadian populations." *Atherosclerosis* **146**(1): 153-160.
 44. Hewing, B. and E. A. Fisher (2012). "Rationale for cholesteryl ester transfer protein inhibition." *Curr Opin Lipidol* **23**(4): 372-376.
 45. Hirata, K., H. L. Dichek, J. A. Cioffi, S. Y. Choi, N. J. Leeper, L. Quintana, G. S. Kronmal, A. D. Cooper and T. Quertermous (1999). "Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family." *J Biol Chem* **274**(20): 14170-14175.
 46. Huesca-Gomez, C., E. Carreon-Torres, T. Nepomuceno-Mejia, M. Sanchez-Solorio, M. Galicia-Hidalgo, A. M. Mejia, L. F. Montano, M. Franco, C. Posadas-Romero and O. Perez-Mendez (2004). "Contribution of cholesteryl ester transfer protein and lecithin:cholesterol acyltransferase to HDL size distribution." *Endocr Res* **30**(3): 403-415.
 47. Jansen, H. (2004). "Hepatic lipase: friend or foe and under what circumstances?" *Curr Atheroscler Rep* **6**(5): 343-347.

48. Jansen, H., G. Chu, C. Ehnholm, J. Dallongeville, V. Nicaud and P. J. Talmud (1999). "The T allele of the hepatic lipase promoter variant C-480T is associated with increased fasting lipids and HDL and increased preprandial and postprandial LpCIII:B : European Atherosclerosis Research Study (EARS) II." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(2): 303-308.
49. Jansen, H., T. J. van Berkel and W. C. Hulsmann (1978). "Binding of liver lipase to parenchymal and non-parenchymal rat liver cells." Biochem Biophys Res Commun **85**(1): 148-152.
50. Jansen, H., A. J. Verhoeven and E. J. Sijbrands (2002). "Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein?" J Lipid Res **43**(9): 1352-1362.
51. Jansen, H., A. J. Verhoeven, L. Weeks, J. J. Kastelein, D. J. Halley, A. van den Ouweland, J. W. Jukema, J. C. Seidell and J. C. Birkenhager (1997). "Common C-to-T substitution at position -480 of the hepatic lipase promoter associated with a lowered lipase activity in coronary artery disease patients." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(11): 2837-2842.
52. Jaye, M., K. J. Lynch, J. Krawiec, D. Marchadier, C. Maugeais, K. Doan, V. South, D. Amin, M. Perrone and D. J. Rader (1999). "A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism." Nat Genet **21**(4): 424-428.
53. Jeffs, J. A., I. F. Godsland and D. G. Johnston (2006). "Less than 50% of variation in HDL cholesterol between and within individuals, is explained by established predictors." Atherosclerosis **184**(1): 178-187.
54. Jiang, Y., M. P. Epstein and K. N. Conneely (2013). "Assessing the Impact of Population Stratification on Association Studies of Rare Variation." Hum Hered **76**(1): 28-35.
55. Kathiresan, S., C. J. Willer, G. M. Peloso, S. Demissie, K. Musunuru, E. E. Schadt, L. Kaplan, D. Bennett, Y. Li, T. Tanaka, B. F. Voight, L. L. Bonnycastle, A. U. Jackson, G. Crawford, A. Surti, C. Guiducci, N. P. Burt, S. Parish, R. Clarke, D. Zelenika, K. A. Kubalanza, M. A. Morcken, L. J. Scott, H. M. Stringham, P. Galan, A. J. Swift, J. Kuusisto, R. N. Bergman, J. Sundvall, M. Laakso, L. Ferrucci, P. Scheet, S. Sanna, M. Uda, Q. Yang, K. L. Lunetta, J. Dupuis, P. I. de Bakker, C. J. O'Donnell, J. C. Chambers, J. S. Kooner, S. Hercberg, P. Meneton, E. G. Lakatta, A. Scuteri, D. Schlessinger, J. Tuomilehto, F. S. Collins, L. Groop, D. Altshuler, R. Collins, G. M. Lathrop, O. Melander, V. Salomaa, L. Peltonen, M. Orho-Melander, J. M. Ordovas, M. Boehnke, G. R. Abecasis, K. L. Mohlke and L. A. Cupples (2009). "Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia." Nat Genet **41**(1): 56-65.
56. Keebler, M. E., C. L. Sanders, A. Surti, C. Guiducci, N. P. Burt and S. Kathiresan (2009). "Association of blood lipids with common DNA sequence variants at 19 genetic loci in the multiethnic United States National Health and Nutrition Examination Survey III." Circ Cardiovasc Genet **2**(3): 238-243.
57. Kim, K. D., H. Y. Lim, H. G. Lee, D. Y. Yoon, Y. K. Choe, I. Choi, S. G. Paik, Y. S. Kim, Y. Yang and J. S. Lim (2005). "Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation." Biochem Biophys Res Commun **338**(2): 1126-1136.

58. Kimura, T., H. Tomura, C. Mogi, A. Kuwabara, A. Damirin, T. Ishizuka, A. Sekiguchi, M. Ishiwara, D. S. Im, K. Sato, M. Murakami and F. Okajima (2006). "Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells." *J Biol Chem* **281**(49): 37457-37467.
59. Kobayashi, T., Y. Tahara, M. Matsumoto, M. Iguchi, H. Sano, T. Murayama, H. Arai, H. Oida, T. Yurugi-Kobayashi, J. K. Yamashita, H. Katagiri, M. Majima, M. Yokode, T. Kita and S. Narumiya (2004). "Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice." *J Clin Invest* **114**(6): 784-794.
60. Kosoy, R., R. Nassir, C. Tian, P. A. White, L. M. Butler, G. Silva, R. Kittles, M. E. Alarcon-Riquelme, P. K. Gregersen, J. W. Belmont, F. M. De La Vega and M. F. Seldin (2009). "Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America." *Hum Mutat* **30**(1): 69-78.
61. Kuivenhoven, J. A., B. E. Groenemeyer, J. M. Boer, P. W. Reymers, R. Berghuis, T. Bruin, H. Jansen, J. C. Seidell and J. J. Kastelein (1997). "Ser447stop mutation in lipoprotein lipase is associated with elevated HDL cholesterol levels in normolipidemic males." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(3): 595-599.
62. Kuller, L. H. (2004). "Ethnic differences in atherosclerosis, cardiovascular disease and lipid metabolism." *Curr Opin Lipidol* **15**(2): 109-113.
63. Kuusi, T., E. A. Nikkila, I. Virtanen and P. K. Kinnunen (1979). "Localization of the heparin-releasable lipase in situ in the rat liver." *Biochem J* **181**(1): 245-246.
64. Lander, E. S. and D. Botstein (1989). "Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps." *Genetics* **121**(1): 185-199.
65. Lee, E. T., M. Begum, W. Wang, P. R. Blackett, K. S. Blevins, M. Stoddart, B. Tolbert and P. Alaupovic (2004). "Type 2 diabetes and impaired fasting glucose in American Indians aged 5-40 years: the Cherokee diabetes study." *Ann Epidemiol* **14**(9): 696-704.
66. Lewis, G. F. and D. J. Rader (2005). "New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport." *Circ Res* **96**(12): 1221-1232.
67. Li, B. and S. M. Leal (2008). "Methods for detecting associations with rare variants for common diseases: application to analysis of sequence data." *Am J Hum Genet* **83**(3): 311-321.
68. Linsel-Nitschke, P. and A. R. Tall (2005). "HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease." *Nat Rev Drug Discov* **4**(3): 193-205.
69. Lisker, R., E. Ramirez, R. P. Briceno, J. Granados and V. Babinsky (1990). "Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers." *Hum Biol* **62**(6): 791-801.
70. Lohmueller, K. E., C. L. Pearce, M. Pike, E. S. Lander and J. N. Hirschhorn (2003). "Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution

- of common variants to susceptibility to common disease." *Nat Genet* **33**(2): 177-182.
71. Ma, Y. H., L. Zhao, X. D. Xian, D. Yang, W. Huang, Y. H. Wang, O. Mueller, E. Chang, Y. Konigshofer, M. Van-Cleve, G. Liu and J. K. Yang (2009). "A case-control study on the relationship between HDL2b and non-alcoholic fatty liver disease in Chinese type 2 diabetic patients." *Clin Chem Lab Med* **47**(9): 1067-1072.
 72. Mackness, B., P. N. Durrington, A. J. Boulton, D. Hine and M. I. Mackness (2002). "Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls." *Eur J Clin Invest* **32**(4): 259-264.
 73. Mackness, M. I., D. Harty, D. Bhatnagar, P. H. Winocour, S. Arrol, M. Ishola and P. N. Durrington (1991). "Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus." *Atherosclerosis* **86**(2-3): 193-199.
 74. Manolio, T. A., F. S. Collins, N. J. Cox, D. B. Goldstein, L. A. Hindorff, D. J. Hunter, M. I. McCarthy, E. M. Ramos, L. R. Cardon, A. Chakravarti, J. H. Cho, A. E. Guttmacher, A. Kong, L. Kruglyak, E. Mardis, C. N. Rotimi, M. Slatkin, D. Valle, A. S. Whittemore, M. Boehnke, A. G. Clark, E. E. Eichler, G. Gibson, J. L. Haines, T. F. Mackay, S. A. McCarroll and P. M. Visscher (2009). "Finding the missing heritability of complex diseases." *Nature* **461**(7265): 747-753.
 75. Mao, X., A. W. Bigham, R. Mei, G. Gutierrez, K. M. Weiss, T. D. Brutsaert, F. Leon-Velarde, L. G. Moore, E. Vargas, P. M. McKeigue, M. D. Shriver and E. J. Parra (2007). "A genomewide admixture mapping panel for Hispanic/Latino populations." *Am J Hum Genet* **80**(6): 1171-1178.
 76. Marjoram, P., A. Zubair and S. V. Nuzhdin (2013). "Post-GWAS: where next? More samples, more SNPs or more biology?" *Heredity (Edinb)*.
 77. Matsushita, K., C. N. Morrell, B. Cambien, S. X. Yang, M. Yamakuchi, C. Bao, M. R. Hara, R. A. Quick, W. Cao, B. O'Rourke, J. M. Lowenstein, J. Pevsner, D. D. Wagner and C. J. Lowenstein (2003). "Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor." *Cell* **115**(2): 139-150.
 78. Maugeais, C., U. J. Tietge, U. C. Broedl, D. Marchadier, W. Cain, M. G. McCoy, S. Lund-Katz, J. M. Glick and D. J. Rader (2003). "Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase." *Circulation* **108**(17): 2121-2126.
 79. Mead, J. R., S. A. Irvine and D. P. Ramji (2002). "Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease." *J Mol Med (Berl)* **80**(12): 753-769.
 80. Memon, R. A., J. Fuller, A. H. Moser, K. R. Feingold and C. Grunfeld (1999). "In vivo regulation of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase during the acute phase response." *Am J Physiol* **277**(1 Pt 2): R94-103.
 81. Miranda, J. J., V. M. Herrera, J. A. Chirinos, L. F. Gomez, P. Perel, R. Pichardo, A. Gonzalez, J. R. Sanchez, C. Ferreccio, X. Aguilera, E. Silva, M. Orostegui, J. Medina-Lezama, C. M. Perez, E. Suarez, A. P. Ortiz, L. Rosero, N. Schapochnik, Z. Ortiz, D. Ferrante, J. P. Casas and L. E. Bautista (2013). "Major cardiovascular risk factors in Latin America: a

- comparison with the United States. The Latin American Consortium of Studies in Obesity (LASO)." *PLoS One* **8**(1): e54056.
82. Murphy, A. J., K. J. Woollard, A. Hoang, N. Mukhamedova, R. A. Stirzaker, S. P. McCormick, A. T. Remaley, D. Sviridov and J. Chin-Dusting (2008). "High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(11): 2071-2077.
 83. Murphy, A. J., K. J. Woollard, A. Suhartoyo, R. A. Stirzaker, J. Shaw, D. Sviridov and J. P. Chin-Dusting (2011). "Neutrophil activation is attenuated by high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I in in vitro and in vivo models of inflammation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(6): 1333-1341.
 84. Murtomaki, S., E. Tahvanainen, M. Antikainen, L. Tiret, V. Nicaud, H. Jansen and C. Ehnholm (1997). "Hepatic lipase gene polymorphisms influence plasma HDL levels. Results from Finnish EARS participants. European Atherosclerosis Research Study." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(10): 1879-1884.
 85. Navab, M., G. M. Ananthramaiah, S. T. Reddy, B. J. Van Lenten, B. J. Ansell, G. C. Fonarow, K. Vahabzadeh, S. Hama, G. Hough, N. Kamranpour, J. A. Berliner, A. J. Lusis and A. M. Fogelman (2004). "The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL." *J Lipid Res* **45**(6): 993-1007.
 86. Nicholls, S. J., G. J. Dusting, B. Cutri, S. Bao, G. R. Drummond, K. A. Rye and P. J. Barter (2005). "Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits." *Circulation* **111**(12): 1543-1550.
 87. Nierman, M. C., J. Rip, J. A. Kuivenhoven, D. H. van Raalte, B. A. Hutten, N. Sakai, J. J. Kastelein and E. S. Stroes (2005). "Carriers of the frequent lipoprotein lipase S447X variant exhibit enhanced postprandial apoprotein B-48 clearance." *Metabolism* **54**(11): 1499-1503.
 88. Nievergelt, C. M., A. X. Maihofer, T. Shekhtman, O. Libiger, X. Wang, K. K. Kidd and J. R. Kidd (2013). "Inference of human continental origin and admixture proportions using a highly discriminative ancestry informative 41-SNP panel." *Investig Genet* **4**(1): 13.
 89. Nijstad, N., H. Wiersma, T. Gautier, M. van der Giet, C. Maugeais and U. J. Tietge (2009). "Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase." *J Biol Chem* **284**(10): 6093-6100.
 90. Norata, G. D., A. Pirillo, E. Ammirati and A. L. Catapano (2012). "Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system." *Atherosclerosis* **220**(1): 11-21.
 91. Nunez-Cortes, J. M., J. Pedro-Botet Montoya, X. Pinto Sala and R. Iniciativa para la Reduccion del Riesgo (2010). "[Residual vascular risk: recommendations of the Spanish Initiative for the Reduction of Residual Risk]." *Med Clin (Barc)* **135**(4): 165-171.
 92. Oravec, S., K. Demuth, I. Myara and A. Hornyk (1998). "The effect of high density lipoprotein subfractions on endothelial eicosanoid secretion." *Thromb Res* **92**(2): 65-71.

93. Otarod, J. K. and I. J. Goldberg (2004). "Lipoprotein lipase and its role in regulation of plasma lipoproteins and cardiac risk." Curr Atheroscler Rep **6**(5): 335-342.
94. Papp, A. C., J. K. Pinsonneault, D. Wang, L. C. Newman, Y. Gong, J. A. Johnson, C. J. Pepine, M. Kumari, A. D. Hingorani, P. J. Talmud, S. Shah, S. E. Humphries and W. Sadee (2012). "Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) polymorphisms affect mRNA splicing, HDL levels, and sex-dependent cardiovascular risk." PLoS One **7**(3): e31930.
95. Paradis, M. E. and B. Lamarche (2006). "Endothelial lipase: its role in cardiovascular disease." Can J Cardiol **22 Suppl B**: 31B-34B.
96. Pennacchio, L. A., M. Olivier, J. A. Hubacek, J. C. Cohen, D. R. Cox, J. C. Fruchart, R. M. Krauss and E. M. Rubin (2001). "An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing." Science **294**(5540): 169-173.
97. Pennacchio, L. A. and E. M. Rubin (2003). "Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(4): 529-534.
98. Perez-Mendez, O., M. Torres-Tamayo, C. Posadas-Romero, V. Vidaure Garces, E. Carreon-Torres, E. Mendoza-Perez, A. Medina Urrutia, C. Huesca-Gomez, J. Zamora-Gonzalez and B. Aguilar-Herrera (2007). "Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus." Clin Chim Acta **376**(1-2): 17-22.
99. Precourt, L. P., D. Amre, M. C. Denis, J. C. Lavoie, E. Delvin, E. Seidman and E. Levy (2011). "The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation." Atherosclerosis **214**(1): 20-36.
100. Price, A. L., N. Patterson, F. Yu, D. R. Cox, A. Waliszewska, G. J. McDonald, A. Tandon, C. Schirmer, J. Neubauer, G. Bedoya, C. Duque, A. Villegas, M. C. Bortolini, F. M. Salzano, C. Gallo, G. Mazzotti, M. Tello-Ruiz, L. Riba, C. A. Aguilar-Salinas, S. Canizales-Quinteros, M. Menjivar, W. Klitz, B. Henderson, C. A. Haiman, C. Winkler, T. Tusie-Luna, A. Ruiz-Linares and D. Reich (2007). "A genomewide admixture map for Latino populations." Am J Hum Genet **80**(6): 1024-1036.
101. Prospective Studies, C., S. Lewington, G. Whitlock, R. Clarke, P. Sherliker, J. Emberson, J. Halsey, N. Qizilbash, R. Peto and R. Collins (2007). "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 **370**(9602): 1829-1839.
102. Qi, Y., J. Liu, W. Wang, M. Wang, J. Y. Sun, J. Liu, Y. Li, Z. S. Wu and D. Zhao (2011). "The HindIII polymorphism in the lipoprotein lipase gene predicts type 2 diabetes risk among Chinese adults." Clin Chim Acta **412**(13-14): 1229-1233.
103. Quinet, E., T. P. Yang, C. Marinos and A. Tall (1993). "Inhibition of the cellular secretion of cholesteryl ester transfer protein by a variant protein formed by alternative splicing of mRNA." J Biol Chem **268**(23): 16891-16894.
104. Ramsamy, T. A., J. Boucher, R. J. Brown, Z. Yao and D. L. Sparks (2003). "HDL regulates the displacement of hepatic lipase from cell surface

- proteoglycans and the hydrolysis of VLDL triacylglycerol." *J Lipid Res* **44**(4): 733-741.
105. Ramsamy, T. A., T. A. Neville, B. M. Chauhan, D. Aggarwal and D. L. Sparks (2000). "Apolipoprotein A-I regulates lipid hydrolysis by hepatic lipase." *J Biol Chem* **275**(43): 33480-33486.
 106. Ranganathan, G., R. Unal, I. D. Pokrovskaya, P. Tripathi, J. I. Rotter, M. O. Goodarzi and P. A. Kern (2012). "The lipoprotein lipase (LPL) S447X gain of function variant involves increased mRNA translation." *Atherosclerosis* **221**(1): 143-147.
 107. Ribas, V., J. L. Sanchez-Quesada, R. Anton, M. Camacho, J. Julve, J. C. Escola-Gil, L. Vila, J. Ordonez-Llanos and F. Blanco-Vaca (2004). "Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential." *Circ Res* **95**(8): 789-797.
 108. Rodriguez-Moran, M., F. Guerrero-Romero, O. Brito-Zurita, R. A. Rascon-Pacheco, R. Perez-Fuentes, M. C. Sanchez-Guillen, M. Gonzalez-Ortiz, E. Martinez-Abundis, L. E. Simental-Mendia, A. Madero, C. Revilla-Monsalve, S. E. Flores-Martinez, S. Islas-Andrade, M. Cruz, N. Wachter and J. Sanchez-Corona (2008). "Cardiovascular risk factors and acculturation in Yaquis and Tepehuanos Indians from Mexico." *Arch Med Res* **39**(3): 352-357.
 109. Rosenbaum, D., B. Hansel, D. Bonnefont-Rousselot, R. Bittar, X. Girerd, P. Giral and E. Bruckert (2012). "Waist circumference is a strong and independent determinant of the distribution of HDL subfractions in overweight patients with cardiovascular risk factors." *Diab Vasc Dis Res* **9**(2): 153-159.
 110. Rosenson, R. S., H. B. Brewer, Jr., M. J. Chapman, S. Fazio, M. M. Hussain, A. Kontush, R. M. Krauss, J. D. Otvos, A. T. Remaley and E. J. Schaefer (2011). "HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events." *Clin Chem* **57**(3): 392-410.
 111. Rye, K. A., C. A. Bursill, G. Lambert, F. Tabet and P. J. Barter (2009). "The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL." *J Lipid Res* **50** **Suppl**: S195-200.
 112. Sagoo, G. S., I. Tatt, G. Salanti, A. S. Butterworth, N. Sarwar, M. van Maarle, J. W. Jukema, B. Wiman, J. J. Kastelein, A. M. Bennet, U. de Faire, J. Danesh and J. P. Higgins (2008). "Seven lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid fractions, and coronary disease: a HuGE association review and meta-analysis." *Am J Epidemiol* **168**(11): 1233-1246.
 113. Santamarina-Fojo, S., H. Gonzalez-Navarro, L. Freeman, E. Wagner and Z. Nong (2004). "Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(10): 1750-1754.
 114. Santesso, N., E. A. Akl, M. Bianchi, A. Mente, R. Mustafa, D. Heels-Ansdell and H. J. Schunemann (2012). "Effects of higher- versus lower-protein diets on health outcomes: a systematic review and meta-analysis." *Eur J Clin Nutr* **66**(7): 780-788.

115. Shaul, P. W. (2002). "Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location." *Annu Rev Physiol* **64**: 749-774.
116. Soto-Miranda, E., E. Carreon-Torres, K. Lorenzo, B. Bazan-Salinas, C. Garcia-Sanchez, M. Franco, C. Posadas-Romero, J. M. Fragoso, V. Lopez-Olmos, M. Madero, J. M. Rodriguez-Perez, G. Vargas-Alarcon and O. Perez-Mendez (2012). "Shift of high-density lipoprotein size distribution toward large particles in patients with proteinuria." *Clin Chim Acta* **414**: 241-245.
117. Souren, N. Y., A. D. Paulussen, R. J. Loos, M. Gielen, G. Beunen, R. Fagard, C. Derom, R. Vlietinck and M. P. Zeegers (2007). "Anthropometry, carbohydrate and lipid metabolism in the East Flanders Prospective Twin Survey: heritabilities." *Diabetologia* **50**(10): 2107-2116.
118. Stein, Y. and O. Stein (2003). "Lipoprotein lipase and atherosclerosis." *Atherosclerosis* **170**(1): 1-9.
119. Steinbrecher, U. P., H. F. Zhang and M. Lougheed (1990). "Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis." *Free Radic Biol Med* **9**(2): 155-168.
120. Stocker, R. and J. F. Keaney, Jr. (2004). "Role of oxidative modifications in atherosclerosis." *Physiol Rev* **84**(4): 1381-1478.
121. Superko, H. R., L. Pendyala, P. T. Williams, K. M. Momary, S. B. King, 3rd and B. C. Garrett (2012). "High-density lipoprotein subclasses and their relationship to cardiovascular disease." *J Clin Lipidol* **6**(6): 496-523.
122. Suto, J., S. Matsuura, H. Yamanaka and K. Sekikawa (1999). "Quantitative trait loci that regulate plasma lipid concentration in hereditary obese KK and KK-Ay mice." *Biochim Biophys Acta* **1453**(3): 385-395.
123. Tall, A. R. (1990). "Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis." *J Clin Invest* **86**(2): 379-384.
124. Tall, A. R. (1993). "Plasma cholesteryl ester transfer protein." *J Lipid Res* **34**(8): 1255-1274.
125. Tang, C., Y. Liu, P. S. Kessler, A. M. Vaughan and J. F. Oram (2009). "The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor." *J Biol Chem* **284**(47): 32336-32343.
126. Taskinen, M. R. (2003). "Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice." *Diabetologia* **46**(6): 733-749.
127. Teslovich, T. M., K. Musunuru, A. V. Smith, A. C. Edmondson, I. M. Stylianou, M. Koseki, J. P. Pirruccello, S. Ripatti, D. I. Chasman, C. J. Willer, C. T. Johansen, S. W. Fouchier, A. Isaacs, G. M. Peloso, M. Barbalic, S. L. Ricketts, J. C. Bis, Y. S. Aulchenko, G. Thorleifsson, M. F. Feitosa, J. Chambers, M. Orho-Melander, O. Melander, T. Johnson, X. Li, X. Guo, M. Li, Y. Shin Cho, M. Jin Go, Y. Jin Kim, J. Y. Lee, T. Park, K. Kim, X. Sim, R. Tsee-Hee Ong, D. C. Croteau-Chonka, L. A. Lange, J. D. Smith, K. Song, J. Hua Zhao, X. Yuan, J. Luan, C. Lamina, A. Ziegler, W. Zhang, R. Y. Zee, A. F. Wright, J. C. Witteman, J. F. Wilson, G. Willemsen, H. E. Wichmann, J. B. Whitfield, D. M. Waterworth, N. J. Wareham, G. Waeber, P. Vollenweider, B. F. Voight, V. Vitart, A. G. Uitterlinden, M. Uda, J. Tuomilehto, J. R. Thompson, T. Tanaka, I. Surakka, H. M. Stringham, T. D. Spector, N. Soranzo, J. H. Smit, J. Sinisalo, K. Silander, E. J. Sijbrands, A. Scuteri, J.

- Scott, D. Schlessinger, S. Sanna, V. Salomaa, J. Saharinen, C. Sabatti, A. Ruukonen, I. Rudan, L. M. Rose, R. Roberts, M. Rieder, B. M. Psaty, P. P. Pramstaller, I. Pichler, M. Perola, B. W. Penninx, N. L. Pedersen, C. Pattaro, A. N. Parker, G. Pare, B. A. Oostra, C. J. O'Donnell, M. S. Nieminen, D. A. Nickerson, G. W. Montgomery, T. Meitinger, R. McPherson, M. I. McCarthy, W. McArdle, D. Masson, N. G. Martin, F. Marroni, M. Mangino, P. K. Magnusson, G. Lucas, R. Luben, R. J. Loos, M. L. Lokki, G. Lettre, C. Langenberg, L. J. Launer, E. G. Lakatta, R. Laaksonen, K. O. Kyvik, F. Kronenberg, I. R. Konig, K. T. Khaw, J. Kaprio, L. M. Kaplan, A. Johansson, M. R. Jarvelin, A. C. Janssens, E. Ingelsson, W. Igl, G. Kees Hovingh, J. J. Hottenga, A. Hofman, A. A. Hicks, C. Hengstenberg, I. M. Heid, C. Hayward, A. S. Havulinna, N. D. Hastie, T. B. Harris, T. Haritunians, A. S. Hall, U. Gyllensten, C. Guiducci, L. C. Groop, E. Gonzalez, C. Gieger, N. B. Freimer, L. Ferrucci, J. Erdmann, P. Elliott, K. G. Ejebe, A. Doring, A. F. Dominiczak, S. Demissie, P. Deloukas, E. J. de Geus, U. de Faire, G. Crawford, F. S. Collins, Y. D. Chen, M. J. Caulfield, H. Campbell, N. P. Burtt, L. L. Bonnycastle, D. I. Boomsma, S. M. Boekholdt, R. N. Bergman, I. Barroso, S. Bandinelli, C. M. Ballantyne, T. L. Assimes, T. Quertermous, D. Altshuler, M. Seielstad, T. Y. Wong, E. S. Tai, A. B. Feranil, C. W. Kuzawa, L. S. Adair, H. A. Taylor, Jr., I. B. Borecki, S. B. Gabriel, J. G. Wilson, H. Holm, U. Thorsteinsdottir, V. Gudnason, R. M. Krauss, K. L. Mohlke, J. M. Ordovas, P. B. Munroe, J. S. Kooner, A. R. Tall, R. A. Hegele, J. J. Kastelein, E. E. Schadt, J. I. Rotter, E. Boerwinkle, D. P. Strachan, V. Mooser, K. Stefansson, M. P. Reilly, N. J. Samani, H. Schunkert, L. A. Cupples, M. S. Sandhu, P. M. Ridker, D. J. Rader, C. M. van Duijn, L. Peltonen, G. R. Abecasis, M. Boehnke and S. Kathiresan (2010). "Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids." *Nature* **466**(7307): 707-713.
128. Thompson, A., E. Di Angelantonio, N. Sarwar, S. Erqou, D. Saleheen, R. P. Dullaart, B. Keavney, Z. Ye and J. Danesh (2008). "Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk." *JAMA* **299**(23): 2777-2788.
129. Villarreal-Molina, M. T., C. A. Aguilar-Salinas, M. Rodriguez-Cruz, D. Riano, M. Villalobos-Comparan, R. Coral-Vazquez, M. Menjivar, P. Yescas-Gomez, M. Konigsoerg-Fainstein, S. Romero-Hidalgo, M. T. Tusie-Luna, S. Canizales-Quinteros and G. Metabolic Study (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**(7): 1881-1887.
130. Visscher, P. M., M. A. Brown, M. I. McCarthy and J. Yang (2012). "Five years of GWAS discovery." *Am J Hum Genet* **90**(1): 7-24.
131. Wang, S. H., S. G. Yuan, D. Q. Peng and S. P. Zhao (2012). "HDL and ApoA-I inhibit antigen presentation-mediated T cell activation by disrupting lipid rafts in antigen presenting cells." *Atherosclerosis* **225**(1): 105-114.
132. Wang, X. and B. Paigen (2002). "Quantitative trait loci and candidate genes regulating HDL cholesterol: a murine chromosome map." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(9): 1390-1401.

133. Wang, X. and B. Paigen (2005). "Genetics of variation in HDL cholesterol in humans and mice." *Circ Res* **96**(1): 27-42.
134. Weissglas-Volkov, D., C. A. Aguilar-Salinas, E. Nikkola, K. A. Deere, I. Cruz-Bautista, O. Arellano-Campos, L. L. Munoz-Hernandez, L. Gomez-Munguia, M. L. Ordonez-Sanchez, P. M. Reddy, A. J. Lusis, N. Matikainen, M. R. Taskinen, L. Riba, R. M. Cantor, J. S. Sinsheimer, T. Tusie-Luna and P. Pajukanta (2013). "Genomic study in Mexicans identifies a new locus for triglycerides and refines European lipid loci." *J Med Genet* **50**(5): 298-308.
135. Weissglas-Volkov, D., C. A. Aguilar-Salinas, J. S. Sinsheimer, L. Riba, A. Huertas-Vazquez, M. L. Ordonez-Sanchez, R. Rodriguez-Guillen, R. M. Cantor, T. Tusie-Luna and P. Pajukanta (2010). "Investigation of variants identified in caucasian genome-wide association studies for plasma high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides levels in Mexican dyslipidemic study samples." *Circ Cardiovasc Genet* **3**(1): 31-38.
136. Wilson, P. W. (1990). "High-density lipoprotein, low-density lipoprotein and coronary artery disease." *Am J Cardiol* **66**(6): 7A-10A.
137. Yasuda, T., T. Ishida and D. J. Rader (2010). "Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis." *Circ J* **74**(11): 2263-2270.
138. Yokoyama, S. (2006). "Assembly of high-density lipoprotein." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(1): 20-27.
139. Yost, C. C., A. S. Weyrich and G. A. Zimmerman (2010). "The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses." *Biochimie* **92**(6): 692-697.
140. Yuhanna, I. S., Y. Zhu, B. E. Cox, L. D. Hahner, S. Osborne-Lawrence, P. Lu, Y. L. Marcel, R. G. Anderson, M. E. Mendelsohn, H. H. Hobbs and P. W. Shaul (2001). "High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase." *Nat Med* **7**(7): 853-857.
141. Zeller, M., D. Masson, M. Farnier, L. Lorgis, V. Deckert, J. P. Pais de Barros, C. Desrumaux, P. Sicard, J. Grober, D. Blache, P. Gambert, L. Rochette, Y. Cottin and L. Lagrost (2007). "High serum cholesteryl ester transfer rates and small high-density lipoproteins are associated with young age in patients with acute myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* **50**(20): 1948-1955.
142. Zhang, H., H. Henderson, S. E. Gagne, S. M. Clee, L. Miao, G. Liu and M. R. Hayden (1996). "Common sequence variants of lipoprotein lipase: standardized studies of in vitro expression and catalytic function." *Biochim Biophys Acta* **1302**(2): 159-166.
143. Zhong, S., D. S. Sharp, J. S. Grove, C. Bruce, K. Yano, J. D. Curb and A. R. Tall (1996). "Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels." *J Clin Invest* **97**(12): 2917-2923.

ANEXOS

Tabla 9. Parámetros bioquímicos y antropométricos de los grupos de población mexicana estudiados.

Niños Mestizos				
Parámetro	Total (1200)	Niños (581)	Niñas (619)	P
Edad (años)	9.40 ± 2.24	9.45 ± 2.29	9.34 ± 2.19	0.400
z-score IMC	0.76 ± 1.22	0.83 ± 1.16	0.69 ± 1.24	0.058
C-HDL (mg/dL)	45.91 ± 11.22	46.31 ± 11.26	45.53 ± 11.19	0.227
C-LDL (mg/dL)	103.14 ± 25.54	103.83 ± 25.06	102.50 ± 25.99	0.372
TG (mg/dL)	116.88 ± 71.27	111.60 ± 64.42	121.85 ± 76.88	0.012
CT (mg/dL)	171.23 ± 30.75	171.63 ± 30.55	170.86 ± 30.95	0.663
% HA	30.58	30.46	30.69	0.931*
Adultos Mestizos Primer Grupo				
Parámetro	Total (1289)	Hombres (509)	Mujeres (780)	P
Edad (años)	29.11 ± 12.26	28.91 ± 11.95	29.24 ± 12.47	0.633
IMC (kg/m²)	25.07 ± 4.53	25.78 ± 4.64	24.61 ± 4.41	>0.001
C-HDL (mg/dL)	49.83 ± 12.03	44.89 ± 9.72	53.05 ± 12.35	>0.001
C-LDL (mg/dL)	111.65 ± 31.54	113.44 ± 31.00	110.60 ± 31.83	0.134
TG (mg/dL)	136.99 ± 110.51	165.52 ± 145.25	118.38 ± 74.53	>0.001
CT (mg/dL)	188.37 ± 40.27	189.13 ± 39.69	187.87 ± 40.66	0.579
% HA	19.39	31.63	11.41	>0.001*
Adultos Mestizos Segundo Grupo				
Parámetro	Total (983)	Hombres (351)	Mujeres (632)	P
Edad (años)	39.75 ± 15.85	36.86 ± 12.91	41.35 ± 14.11	>0.001
IMC (kg/m²)	27.25 ± 5.13	27.05 ± 4.56	27.36 ± 5.42	0.354
C-HDL (mg/dL)	46.64 ± 12.84	40.94 ± 9.71	49.82 ± 13.27	>0.001
C-LDL (mg/dL)	124.98 ± 34.69	127.53 ± 35.44	123.59 ± 34.22	0.101
TG (mg/dL)	179.94 ± 134.11	206.42 ± 152.56	165.17 ± 120.25	>0.001
CT (mg/dL)	206.86 ± 45.26	207.82 ± 45.51	206.32 ± 41.97	0.608
% HA	30.01	44.16	22.15	>0.001*
Adultos Indígenas				
Parámetro	Total (406)	Hombres (124)	Mujeres (282)	P
Edad (años)	47.93 ± 15.19	49.15 ± 15.54	47.40 ± 15.04	0.299
IMC (kg/m²)	26.53 ± 4.26	25.30 ± 3.76	27.05 ± 4.35	>0.001
C-HDL (mg/dL)	42.03 ± 13.17	42.81 ± 17.43	41.69 ± 10.80	0.511
C-LDL (mg/dL)	108.50 ± 28.78	104.86 ± 27.93	110.05 ± 29.06	0.129
TG (mg/dL)	191.64 ± 113.40	196.28 ± 144.37	189.60 ± 98.13	0.635
CT (mg/dL)	187.30 ± 39.64	184.00 ± 39.49	188.74 ± 39.68	0.267
% HA	46.80	50.62	45.39	0.391*

Los datos representan medias \pm desviación estándar. IMC: índice de masa corporal, C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad. C-LDL: colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad, TG: triglicéridos. CT: colesterol total, HA: hipoalfalipoproteinemia. Valores de *P* calculados con prueba t de Student. (*): Valor de *P* calculado con prueba chi cuadrada.

Tabla 10. Comparación de frecuencias alélicas de los grupos de población mexicana analizados y poblaciones de referencia del HAPMAP

Gen	Cromosoma	SNP	Alelo de Referencia/ Otro	MAF				
				Poblaciones de Referencia HAPMAP		Población Mexicana		
				CEU	MEX	Niños Mestizos	Adultos Mestizos	Adultos Indígenas
CETP	16	rs3764261	A/C	0.345	0.319	0.354	0.373	0.364
LIPC	15	rs1800588	T/C	0.254	0.540	0.630*	0.623*	0.755*
LPL	8	rs328	G/C	0.131	0.070	0.038*	0.043*	0.0052*
LIPG	18	rs7241918	G/T	0.167	s/r	0.037*	0.041*	0.021*
APOA5	11	rs964184	G/C	0.0121	0.276	0.377*	0.364*	0.516*

CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol, *LIPC*: lipasa hepática, *LPL*: lipasa lipoproteica, *LIPG*: lipasa endotelial, *APOA5*: apolipoproteína AV, HAPMAP: mapa de haplotipos, CEU: caucásicos, MEX: México-americanos. (*): $P < 0.001$ con prueba chi Cuadrada entre CEU y grupos de población mexicana.

Tabla 11. Subfracciones de HDL de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs3764261 del gen *CETP*.

rs3764261 <i>CETP</i>				
	CC (n=56)	AC (n=61)	AA (n=12)	P
Edad (años)	13.04 ± 0.89	13.26 ± 0.90	13.25 ± 0.97	NS
IMC (kg/m²)	24.44 ± 5.06	24.74 ± 4.96	23.16 ± 3.69	NS
z-score IMC	1.18 ± 0.80	1.15 ± 0.89	0.99 ± 0.78	NS
C-HDL(mg/dL)	42.45 ± 10.04	47.25 ± 10.44	48.67 ± 14.39	0.050
C-HDL2a (%)	20.15 ± 3.15	20.89 ± 3.42	22.00 ± 3.42	NS
C-HDL2b (%)	11.32 ± 3.03	12.52 ± 3.16	13.70 ± 3.36	0.056
C-HDL3a (%)	27.79 ± 2.04	27.88 ± 2.24	27.87 ± 2.34	NS
C-HDL3b (%)	23.90 ± 2.50	23.52 ± 2.49	23.04 ± 2.96	NS
C-HDL3c (%)	16.71 ± 3.98	15.27 ± 4.12	13.39 ± 2.70	0.029

CETP: proteína de transferencia de ésteres de colesterol, IMC: índice de masa corporal, C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, C-HDL2a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2a, C-HDL2b: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2b, C-HDL3a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 3ª, C-HDL3b: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2ª, C-HDL2a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 3c. Análisis realizado con la prueba ANOVA de un factor, NS: no significativo.

Tabla 12. Subfracciones de HDL de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs1800588 del gen *LIPC*.

	rs1800588 <i>LIPC</i>			P
	TT (n=46)	CT (n=65)	CC (n=20)	
Edad (años)	13.09 ± 0.94	13.18 ± 0.90	13.20 ± 0.89	NS
IMC (kg/m²)	24.81 ± 4.91	24.41 ± 5.17	23.64 ± 3.91	NS
z-score IMC	1.24 ± 0.83	1.11 ± 0.86	1.06 ± 0.78	NS
HDL(mg/dL)	46.35 ± 12.20	44.91 ± 9.74	44.25 ± 11.32	NS
HDL2a (%)	20.48 ± 3.38	20.68 ± 3.31	21.28 ± 3.35	NS
HDL2b (%)	12.25 ± 3.46	12.17 ± 3.09	11.83 ± 3.04	NS
HDL3a (%)	27.59 ± 1.90	27.99 ± 2.29	27.86 ± 2.18	NS
HDL3b (%)	23.71 ± 2.57	23.63 ± 2.54	23.37 ± 2.47	NS
HDL3c (%)	15.98 ± 4.23	15.48 ± 4.05	15.54 ± 3.82	NS

LIPC: lipasa hepática, IMC: índice de masa corporal, C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, C-HDL2a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2a, C-HDL2b: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2b, C-HDL3a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 3ª, C-HDL3b: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2ª, C-HDL2a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 3c. Análisis realizado con la prueba ANOVA de un factor, NS: no significativa

Tabla 13. Subfracciones de HDL de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs328 del gen *LPL*.

	rs328	LPL	P
	CC (n=114)	CG (n=17)	
Edad (años)	13.20 ± 0.91	12.82 ± 0.91	NS
IMC (kg/m²)	24.52 ± 5.03	23.85 ± 3.80	NS
z-score IMC	1.15 ± 0.85	1.15 ± 0.76	NS
HDL(mg/dL)	44.26 ± 10.81	52.35 ± 8.36	0.002
HDL2a (%)	20.59 ± 3.38	21.48 ± 2.94	NS
HDL2b (%)	11.91 ± 3.10	13.64 ± 3.48	0.068
HDL3a (%)	27.92 ± 2.05	27.26 ± 2.63	NS
HDL3b (%)	23.78 ± 2.48	23.64 ± 2.66	NS
HDL3c (%)	15.82 ± 4.14	14.63 ± 3.38	NS

LPL: lipasa lipoproteica, IMC: índice de masa corporal, C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, C-HDL2a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2a, C-HDL2b: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2b, C-HDL3a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 3ª, C-HDL3b: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2ª, C-HDL2a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 3c. Análisis realizado con prueba t de Student, NS: no significativo.

Tabla 14. Subfracciones de HDL de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs7241918 del gen *LIPG*.

	rs7241918		P
	TT (n=113)	LIPG TG (n=16)	
Edad (años)	13.13 ± 0.91	13.38 ± 0.88	NS
IMC (kg/m²)	24.41 ± 5.05	24.78 ± 3.86	NS
z-score IMC	1.13 ± 0.86	1.26 ± 0.69	NS
HDL(mg/dL)	45.27 ± 11.23	46.75 ± 6.86	NS
HDL2a (%)	20.68 ± 3.37	20.68 ± 3.13	NS
HDL2b (%)	12.05 ± 3.23	12.70 ± 3.70	NS
HDL3a (%)	27.81 ± 2.17	27.80 ± 1.86	NS
HDL3b (%)	23.57 ± 2.55	24.00 ± 2.54	NS
HDL3c (%)	15.86 ± 4.09	14.82 ± 3.82	NS

LIPG: lipasa endotelial, IMC: índice de masa corporal, C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, C-HDL2a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2a, C-HDL2b: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2b, C-HDL3a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 3^a, C-HDL3b: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2^a, C-HDL2a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 3c. Análisis realizado con prueba t de Student, NS: no significativo

Tabla 15. Subfracciones de HDL de acuerdo al genotipo del polimorfismo rs9641184 del gen *APOA5*.

	rs9641184 APOA5			P
	CC (n=59)	CG (n=49)	GG (n=18)	
Edad (años)	13.19 ± 0.97	13.08 ± 0.86	13.06 ± 0.80	NS
IMC (kg/m²)	24.22 ± 4.40	24.28 ± 5.52	25.78 ± 5.09	NS
z-score IMC	1.14 ± 0.81	1.10 ± 0.88	1.34 ± 0.85	NS
HDL(mg/dL)	45.98 ± 10.22	45.67 ± 12.13	42.39 ± 9.26	NS
HDL2a (%)	29.32 ± 3.18	20.32 ± 3.56	21.38 ± 3.11	0.076
HDL2b (%)	12.44 ± 3.36	12.33 ± 3.25	10.61 ± 2.12	NS
HDL3a (%)	28.04 ± 2.14	27.52 ± 2.20	28.15 ± 2.05	NS
HDL3b (%)	23.03 ± 2.44	23.75 ± 2.61	25.11 ± 2.09	0.009
HDL3c (%)	15.07 ± 4.16	16.07 ± 4.13	16.81 ± 3.74	NS

APOA5: apolipoproteína AV, IMC: índice de masa corporal, C-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, C-HDL2a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2a, C-HDL2b: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2b, C-HDL3a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 3^a, C-HDL3b: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 2^a, C-HDL2a: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad fracción 3c. Análisis realizado con la prueba ANOVA de un factor, NS: no significativo.