



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

**ASOCIACIÓN DE LA VARIANTE EXM1377645 DEL GEN NPC1 CON
LA HIPERTRIGLICERIDEMIA EN UNA COHORTE DE MEXICANOS**

T E S I S D E P O S G R A D O

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN:

ENDOCRINOLOGÍA Y METABOLISMO

PRESENTA:

DR. ALONSO ALBERTO CASTRO ARGÜELLES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS



CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
DR. "SALVADOR ZUBIRÁN"
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA
México, D.F.

AUTORIZACIÓN

Dr. Sergio Ponce de León

Director de Enseñanza del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

Dr. Carlos A. Aguilar Salinas

Médico Titular del Departamento de Endocrinología y Metabolismo Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)
Director De Tesis.

Dr. Alfredo A. Reza Albarrán

Médico Titular del Departamento de Endocrinología y Metabolismo Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)
Co.asesor de Tesis.

Título

Asociación de la variante exm1377645 del gen NPC1 con la hipertrigliceridemia en una cohorte de mexicanos.

Marco teórico

Los triglicéridos se constituyen por tres ácidos grasos y un esqueleto de glicerol, la síntesis se lleva a cabo mediante la vía de glicerol-fosfato en el tejido adiposo. El tejido adiposo es el principal sitio de almacenamiento de los triglicéridos, debido a la acción de la insulina que inhibe a la lipasa lipoproteica. La obesidad aumenta la lipólisis del tejido adiposo, lo cual resulta en la elevación de ácidos grasos libres en la circulación. Los ácidos grasos libres son el sustrato para la síntesis hepática de moléculas ricas en triglicéridos, como lo son las VLDL. (1)

Las concentraciones séricas de triglicéridos no sólo dependen del aumento de la síntesis a nivel hepático, también de la disminución en su eliminación. La síntesis de triglicéridos a nivel hepático se regula por la expresión de los genes LXR, ChREBP y FXR; los dos primeros aumentan la síntesis y el último la disminuye. (2-4) La eliminación de triglicéridos se regula por diferentes proteínas; tales como: la lipasa lipoproteica, la lipasa endotelial, la lipasa hepática, la proteína GPIHBP1, la apolipoproteína C-II y la apolipoproteína A-V. (5-8)

La hipertrigliceridemia depende de la interacción entre factores ambientales y genéticos. Entre las causas ambientales más comunes están la hiperglucemia, la ingestión de alcohol, el consumo excesivo de azúcares simples y/o grasas, la uremia, el síndrome metabólico y el empleo de varios fármacos. (9,10)

La hipertrigliceridemia se define como el valor de triglicéridos $>1.7\text{mmol/L}$ ($>150\text{mg/dL}$). (11) Es un factor de riesgo cardiovascular independiente de otros factores, (12) y es frecuente en adultos mexicanos. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 la hipertrigliceridemia, en México, tiene una prevalencia

de 31.5%; es la segunda dislipidemia más común después de la hipoalfalipoproteinemia. En esta encuesta la concentración de triglicéridos fue mayor en el subgrupo de hombres que en el de mujeres. Las personas mayores de 40 años de edad tuvieron valores de triglicéridos mayores que las personas menores a esta edad. Las personas con sobrepeso y con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 tuvieron un nivel mayor de triglicéridos en suero al compararlos con personas con peso normal y sin diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2. (13)

Las variaciones alélicas de numerosos genes, que intervienen en la síntesis y en la eliminación de triglicéridos, determinan la concentración en el suero; existen estudios de asociación genética que identificaron nuevas variantes que se asocian al riesgo de tener hipertrigliceridemia.

En un metaanálisis de estudios de escrutinio completo del genoma, en población europea, se identificaron 24 locus que se asocian con la hipertrigliceridemia. Algunos de los genes fueron ANGPTL3, APOB, GCKR, LPL, LRP1, APOE. Estas variantes explican en conjunto el 10-12% de los casos de hipertrigliceridemia. (14)

Recientemente, se realizó un escrutinio completo del genoma con múltiples marcadores en una muestra representativa de población mexicana, se genotiparon cerca de 600,000 SNPs en la fase de descubrimiento y 1,536 SNPs en la fase de replicación. Se identificó que las variantes que tuvieron la mayor fuerza de asociación con la hipertrigliceridemia se encuentran en los genes APOA5, GCKR, LPL, MLXIPL, TIMD4, CILP2, ANGPTL3 Y NPC1. La identificación de la asociación entre la variante del gen NPC1 (rs9949617) y la hipertrigliceridemia fue un hallazgo novedoso, presente solamente en población mexicana. El alelo de riesgo está presente en el 40% de los casos. (15)

El gen NPC1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 18, contiene 4 exones y codifica la información para la síntesis de una proteína de 1,278 aminoácidos. La proteína NPC1 se localiza en la membrana de los lisosomas,

tiene 13 dominios transmembrana con el extremo aminoterminal intralisosomal y el extremo carboxiterminal citoplásmico. (16, 17)

La proteína NPC1 es un aceptor del colesterol hidroxilado que proviene de la proteína NPC2, posteriormente la proteína NPC1 lo transporta hacia el retículo endoplásmico donde el colesterol se une al factor transcripcional SREBP2. La interacción entre SREBP2 y las regiones regulatorias de los genes que participan en la lipogénesis depende de la concentración de colesterol en el retículo endoplásmico. Concentraciones bajas de colesterol inducen la liberación de SREBP2 y con ello la activación de la lipogénesis. Por lo anterior, una variante del gen NPC1 que altere su actividad resultará en menor aporte de colesterol al retículo endoplásmico y en consecuencia mayor expresión de los genes que regulan lipogénesis. (17, 18)

En modelos murinos, la haploinsuficiencia del gen NPC1 se asocia con aumento de la adiposidad abdominal, el aumento en el tamaño del hígado por aumento en la cantidad de triglicéridos en éste, y aumento en la concentración de colesterol y triglicéridos en suero (19). En el mismo contexto, el gen NPC1 se asocia con la obesidad en niños mexicanos (20).

Planteamiento del problema

La hipertrigliceridemia es un factor de riesgo cardiovascular común en mexicanos. Se demostró de forma novedosa en un escrutinio completo del genoma una asociación entre dos variantes del gen NPC1 (rs9949617 y rs4800467) la hipertrigliceridemia en una cohorte de mexicanos. Estas variantes no se identificaron en población europea. La identificación de nuevas variantes del gen NPC1 reforzará el conocimiento sobre la patogénesis de la hipertrigliceridemia, lo que ayudará a identificar individuos con riesgo mayor de presentar complicaciones cardiovasculares, y a reforzar las medidas farmacológicas y no farmacológicas para prevenirlas.

Pregunta de investigación

¿La variante exm1377645 del gen NPC1 se asocia con la hipertrigliceridemia en esta cohorte de mexicanos?

Hipótesis

Hipótesis nula: La variante exm1377645 del gen NPC1 no se asocia con la hipertrigliceridemia en esta cohorte de mexicanos.

Hipótesis alterna: La variante exm1377645 del gen NPC1 se asocia con la hipertrigliceridemia en esta cohorte de mexicanos.

Objetivos

Objetivo general: Explorar la asociación de la variante exm1377645 del gen NPC1 y la hipertrigliceridemia en esta cohorte de mexicanos.

Específicos:

- a) Ajustar la asociación a variables tales como sexo, edad, índice masa corporal, dos marcadores de ancestría y estatus de diabetes mellitus tipo 2.
- b) Explorar el desequilibrio de ligamiento (LD) con las variantes rs9949617 y rs4800467 del gen NPC1.

Metodología

Características de la población:

Se obtuvo la secuenciación de exomas de las muestras de ADN de 1,825 personas que se reclutaron en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) en México D.F. Un total de 1,109 personas tuvieron los niveles de triglicéridos $>1.7\text{mmol/L}$, mientras que 716 personas tuvieron los niveles $<1.7\text{mmol/L}$. La cuantificación de triglicéridos se realizó con métodos estandarizados disponibles comercialmente. La búsqueda de las variantes del gen NPC1 se extendió entre las posiciones 18800 y 19400 en el brazo largo del cromosoma 18, se identificó la variante exm1377645 presente en la totalidad de la cohorte.

Características del estudio:

Estudio transversal, observacional y comparativo.

.

Criterios de selección:

a) Criterios de inclusión

Casos: Individuos mayores de 18 años de edad con hipertrigliceridemia ($>1.7\text{mmol/L}$)

Controles: Individuos mayores de 18 años de edad sin hipertrigliceridemia. ($<1.7\text{mmol/L}$)

Variable Dependiente:

- Variante exm1377645 del gen NPC1

Variable Independiente

- Concentración de triglicéridos

Variabes de confusión:

Edad, índice de masa corporal (IMC), dos marcadores de ancestría (pc1 y pc2) y estatus de diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

Estrategia de análisis estadístico:

Se realizó la estadística descriptiva para las características basales de las personas, media, desviación estándar y porcentajes.

Se exploró la asociación de la hipertrigliceridemia y la variante de riesgo exm1377645 mediante un modelo de regresión logística múltiple para las variables hipertrigliceridemia, edad, índice de masa corporal, dos marcadores de ancestría y estatus de diabetes mellitus tipo 2 (STATA® versión 12.1)

Se exploró el LD entre la variante de riesgo exm1377645 y las variantes del gen NPC1 rs9949617 y rs4800467 (Haploview® versión 4.2)

Resultados

Las características clínicas de los participantes en ambos grupos se resumen en la Tabla 1. El porcentaje de participantes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 fue mayor en el grupo de casos en comparación de los controles, 58.43% vs. 41.57% respectivamente. El promedio de edad de ambos se encontró dentro de la sexta década de la vida, y el promedio de índice de masa corporal se encontró en el rango de sobrepeso en ambos grupos.

Tabla 1. Características basales

	Triglicéridos > 1.7mmol/L	Triglicéridos < 1.7mmol/L
n (%)	1109 (60.76)	716 (39.23)
mmol/L	3.06 (\pm 1.62)	1.20 (\pm 0.24)
Edad	55.03 (\pm 10.42)	56.54 (\pm 10.95)
IMC	28.78 (\pm 4.15)	27.50 (\pm 4.18)
DM 2 (%)	648 (58.43)	298 (41.57)

La variante exm1377645 del gen NPC1 se encontró en la posición 19154143 en el brazo largo del cromosoma 18.

El modelo de regresión logística demostró que la variante exm1377645 es de riesgo para la hipertrigliceridemia, OR=1.18 (IC 95% 1.03-1.36), $p=0.016$. En la Tabla 2 se presentan los ORs de cada una de las variables de riesgo que se exploraron en la búsqueda de asociación con la hipertrigliceridemia.

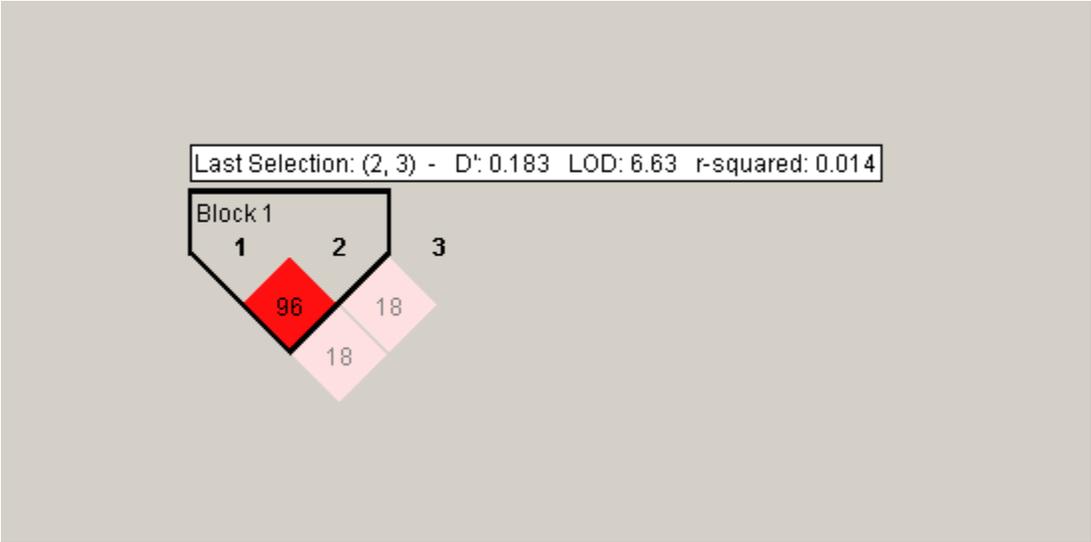
Tabla 2. Variables y su asociación a la hipertrigliceridemia

Variable	OR	P	IC 95%
Edad	0.99	0.033	0.98-0.99
IMC	1.08	<0.001	1.05-1.10
DM2	1.39	0.001	1.13-1.70
pc1	0.15	0.209	0.008-2.83
pc2	0.0001	0.435	1.36e-14 - 932892.4

exm1377645	1.18	0.016	1.03-1.36
-------------------	------	-------	-----------

pc1 y pc2: marcadores de ancestría

La variante exm1377645 del gen NPC1 tuvo un LD de $r^2=0.014$ con las variantes rs9949617 y rs4800467 del mismo gen. Las frecuencias genotípicas de la variante exm1377645 fueron: AA 58%, CC 39.6% y AC 1.5%. La frecuencia del alelo menor (MAF) de la variante exm1377645 fue de 37.7%.



Discusión:

Se realizó la secuenciación de exomas en las muestras de ADN en una cohorte de mexicanos, en la cual, se identificó una nueva variante del gen NPC1, exm1377645, que se asocia con la hipertrigliceridemia. La frecuencia del alelo menor (FAM) fue de 37%. Las variantes del gen NPC1, rs9949617 y rs4800467, se asociaron con la hipertrigliceridemia en otra cohorte de mexicanos, con una FAM del 40% (15), mientras que en cohortes europeas no se identificaron variantes de este gen que se asociaran con la hipertrigliceridemia. (14) La variante exm1377645 no fue el único factor de riesgo que se asoció con la hipertrigliceridemia en esta cohorte; el sobrepeso y el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, se asociaron con significancia estadística. Se conoce que estos factores ambientales son causa de la hipertrigliceridemia. (9)

Los pacientes con enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, la cual se caracteriza por deficiencia congénita de la proteína NPC1, presentan acumulación de colesterol no esterificado en endosomas y lisosomas. Las alteraciones en el perfil de lípidos en estos pacientes son la disminución del colesterol HDL y la elevación de triglicéridos. (21) Los modelos murinos con haploinsuficiencia del gen NPC1 tuvieron elevación de los triglicéridos en suero y el aumento de la adiposidad abdominal. (19) La variante rs1805081 del gen NPC1 se asoció con obesidad en niños mexicanos. (20) Lo anterior demuestra el rol que tiene el gen NPC1 en la lipogénesis, mediante la activación del factor de transcripción SREBP. La alteración en la síntesis del receptor hepático X (LXR), presente en las células deficientes del gen NPC1, pudiera explicar el aumento en la síntesis de triglicéridos. (22)

La variante exm1377645 del gen NPC1 se hereda de forma independiente a las variantes rs9949617 y rs4800467 del mismo gen. El LD de $r^2=0.014$ demuestra que la variante exm1377645 se encuentra en una región génica distinta a las otras variantes, con un efecto independiente.

Conclusiones:

1. Se identificó la variante exm1377645 del gen NPC1 que se asocia con a hipertrigliceridemia en mexicanos.
2. Se incrementa la evidencia sobre la asociación del gen NPC1 y la hipertrigliceridemia en mexicanos.
3. Se demostró que la variante exm1377645 del gen NPC1 se hereda de forma independiente a las variantes rs9949617 y rs4800467 del gen.
4. Se debe demostrar la contribución poblacional de las variantes del gen NPC1 para la hipertrigliceridemia en nuevos estudios.

Bibliografia:

1. Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14:281-287.
2. Shulman AI, Mangelsdorf DJ. Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med.* 2005; 353:604-615.
3. Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, et al. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science.* 2009; 325:100-104.
4. Iizuka K, Horikawa Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocr J.* 2008; 55:617-624.
5. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res.* 2002; 43:1997-2006.
6. Connelly PW, Maguire GF, Little JA. Apolipoprotein CII St. Michael: familial apolipoprotein CII deficiency associated with premature vascular disease. *J Clin Invest.* 1987; 80:1597-1606.
7. Beigneux AP, Franssen R, Bensadoun A, et al. Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:956-9.
8. Priore Oliva C, Pisciotta L, Li Volti G, et al. Inherited Apolipoprotein A-V Deficiency in Severe Hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:411-417.
9. Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006; 35:491-510.
10. Frohlich JJ. Effects of alcohol on plasma lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta.* 1996; 246:39-49.
11. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal* 2011; 32, 1769–1818.

12. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 1998; 81:7B-12B.
13. Aguilar-Salinas CA, Gómez-Pérez FJ, Rull J, et al. Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Publica Mex* 2010; 52 suppl 1:S44-S53.
14. Teslovich et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010; 466:707-13.
15. Weissglas-Volkov D, Aguilar-Salinas CA, Nikkola E, et al. Genomic study in Mexicans identifies a new locus for triglycerides and refines European lipid loci. *J Med Genet* 2013; 50:298–308.
16. Carstea ED, et al. Niemann-Pick C1 Disease Gene: Homology to Mediators of Cholesterol Homeostasis. *Science* 1997; 277:228-231.
17. Davies JP, Ioannou YA. Topological Analysis of Niemann-Pick C1 Protein Reveals That the Membrane Orientation of the Putative Sterol-sensing Domain Is Identical to Those of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase and Sterol Regulatory Element Binding Protein Cleavage-activating Protein. *J Biol Chem* 2000; 275:24367-74.
18. Millard EE, Gale SE, Dudley N, et al. The Sterol-sensing Domain of the Niemann-Pick C1 Protein Regulates Trafficking of Low Density Lipoprotein Cholesterol. *J Biol Chem* 2005; 280:28581-90.
19. Jelinek D, Millward V, Birdi A, et al. NPC1 haploinsufficiency promotes weight gain and metabolic features associated with insulin resistance. *Hum Mol Genet* 2011;20:312-21.
20. Mejía-Benitez A, Klünder-Klünder M, Yengo L, et al. Analysis of the contribution of FTO, NPC1, ENPP1, NEGR1, GNPDA2 and MC4R genes to obesity in Mexican children. *BMC Medical Genetics* 2013; 14:21.
21. Garver WS, Jelinek D, Meaney FJ, et al. The National Niemann-Pick Type C1 Disease Database: correlation of lipid profiles, mutations, and biochemical phenotypes. *J Lipid Res* 2010; 52:406-15.
22. Korach-André M, Archer A, Gabbi C, et al. Liver X receptors regulate de novo lipogenesis in a tissue-specific manner in C57BL/6 female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301:E210–222.