



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE VARIANTES FUNCIONALES DEL GEN DE LA LH COMO
MODULADORAS DE LOS NIVELES DE COLESTEROL HDL Y SU ASOCIACIÓN CON
COMORBILIDADES EN LA POBLACIÓN MEXICANA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MARÍA TERESA GUERRA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARÍA TERESA TUSIÉ LUNA

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. LEÓN PATRICIO MARTÍNEZ CASTILLA

Facultad de Química, UNAM

DR. ARMANDO R. TOVAR PALACIO

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Ciudad de México. mayo, 2022



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.

ESTUDIO DE VARIANTES FUNCIONALES DEL GEN DE LA LH COMO MODULADORAS DE LOS NIVELES DE COLESTEROL HDL Y SU ASOCIACIÓN CON COMORBILIDADES EN LA POBLACIÓN MEXICANA.

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

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

Dra. María Teresa Tusié Luna
Dr. León P. Martínez Castilla
Dr. Armando R. Tovar Palacio

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Patricia Ostrosky Wegman	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Victor Julián Valdés Rodríguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Juan Pablo Méndez Blanco	Facultad de Medicina, UNAM
Vocal	Dra. Myrian Velasco Torres	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dra. María E. Gonsebatt Bonaparte	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

AGRADECIMIENTOS

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

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa y los técnicos académicos Saúl Cano Colín y José Luis Ventura Gallegos por su apoyo en la realización de los ensayos in vitro.

A Maribel Rodríguez Torres por su asesoría técnica.

A la Biol. María Luisa Ordoñez Sánchez por su colaboración en la genotipificación de las muestras biológicas.

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

A los Doctores Patricia Ostrosky, Victor Julián Valdés, Juan Pablo Méndez, Myrian Velasco, María E. Gonsebatt, por sus comentarios y sugerencias en la realización de esta tesis.

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

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

Al CONACYT por el apoyo recibido durante los estudios de posgrado (CV 170090).

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo recibido para presentar este trabajo en el Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Genética Humana.

ÍNDICE

1. Antecedentes.....	1
2. Introducción.....	3
2.1 La estructura de las lipoproteínas HDL.....	3
2.2 Estructura y función de la proteína LH	5
2.3 Estructura del gen <i>LIPC</i>	8
2.4 Variantes del gen <i>LIPC</i>	10
2.5 El panorama epidemiológico de las dislipidemias y otras enfermedades metabólicas en México.....	14
2.6 La diabetes.....	15
2.6.1 Clasificación de la diabetes.....	16
2.6.2 Fisiopatología de la DT2.....	16
2.7 Análisis de mediación.....	21
3. Planteamiento del problema.....	23
4. Hipótesis	23
5. Objetivo general.....	24
5.1 Objetivos particulares.....	24
6. Sujetos de estudio y métodos.....	24
6.1 Frecuencia de cada uno de los alelos en sujetos de la población abierta.....	24
6.2 Sujetos seleccionados para el estudio de las variantes.....	25
6.2.1 Población seleccionada para el análisis del efecto de la variante -514 C>T	25
6.2.2 Muestra seleccionada para el análisis del efecto de las variantes identificadas como posibles mutaciones	25
6.3 Parámetros bioquímicos y criterios utilizados para definir los fenotipos de los sujetos de estudio.....	26
6.4 Definición de algunos fenotipos y criterios diagnósticos.....	26
6.5 Determinación de genotipos.....	26
6.5.1 Determinación de genotipos de la variante -514 C>T.....	26

6.5.2 Determinación de genotipos de las variantes identificadas como posibles mutaciones.....	27
6.6 Análisis del efecto funcional de las variantes <i>in vitro</i> e <i>in silico</i>	27
6.6.1 Variantes de la secuencia promotora.....	27
6.6.1.1 Análisis <i>in silico</i> para las variantes -480 C>T, y -592 G>A.....	27
6.6.1.2 Análisis del efecto funcional <i>in vitro</i> de las variantes de secuencia promotora.....	27
6.6.1.2.1 Ensayos EMSA de las variantes -480 C>T y -592 G>A.....	27
6.6.1.2.2 Ensayos de gen reportero para las variantes -480 C>T, -514 C>T y -592 G>A.....	30
6.6.2 Variantes en secuencia codificante.....	32
6.6.2.1 Análisis <i>in silico</i> para las variantes R135C y Q355R.....	33
6.6.2.2 Análisis del efecto funcional <i>in vitro</i> de las variantes de secuencia codificante.....	34
6.6.2.2.1 Ensayos de secreción de la proteína LH.....	37
6.6.2.2.1.1 Citometría de flujo.....	37
6.6.2.2.1.2 Microscopia confocal.....	37
6.6.2.2.2 Recuperación de sobrenadantes y lisado celular	38
6.6.2.2.2.1 Ensayos ELISA.....	38
6.6.2.2.2.2 Inmunoblot.....	39
6.7 Análisis Estadístico	40
6.7.1 Análisis del efecto de la variante -514 C>T sobre los parámetros bioquímicos.....	40
6.7.1.1 Modelo de Mediación para evaluar el efecto de la variante -514 C>T.....	41
6.7.1.2 Corrección de los análisis por estratificación de ancestría.....	41
6.7.2 Análisis del efecto de las variantes que posiblemente son mutaciones sobre los parámetros bioquímicos.....	42
6.7.3 Determinación del efecto funcional <i>in vitro</i> de las variantes.....	42
6.7.3.1 Variantes de promotor.....	42
6.7.3. Variantes de secuencia codificante.....	42
7. Resultados	44
7.1 La variante -514 C>T incrementa los niveles de C-HDL e indirectamente disminuye el riesgo de desarrollar de DT2.....	44
7.2 La variante Q355R se comporta como una mutación de alta penetrancia que incrementa los niveles de C-HDL.....	48
7.3 Análisis del efecto funcional de las variantes <i>in vitro</i> e <i>in silico</i>	52

7.3.1 Mediante un análisis <i>in silico</i> se determinó que el alelo menor de las variantes -480 C>T y -592 G>A pueden modificar la unión de factores de transcripción.....	52
7.3.2 Los alelos menores de la variante -480 C>T y la variante -592 G>A disminuyen la unión de proteínas nucleares.....	53
7.3.3. Las variantes del promotor -480 C>T, -514 C>T y -592 G>A disminuyen la actividad transcripcional del gen <i>LIPC</i>	55
7.3.4 Efectos de las variantes de la secuencia codificante R135C, S289F y Q355R.....	56
7.3.4.1 Las variantes de la secuencia codificante R135C y Q355R modifican la distribución de carga de la proteína LH y la variante S289F se encuentra muy cercana al sitio activo de la enzima LH.....	56
7.3.4.2 Las variantes R135C, S289F Y Q355R disminuyen la secreción de la proteína LH así como su contenido intracelular	59
8. Discusión.....	66
8.1 Estudio de la variante -514 C>T del gen <i>LIPC</i> en una cohorte de la población mexicana.....	66
8.2 Caracterización de las variantes de secuencia promotora – 480 C>T, -514 C>T y -592 G>A del gen <i>LIPC</i>	69
8.3 Estudio funcional de las variantes de secuencia codificante R135C, S289F y Q355R.....	72
9. Conclusiones.....	78
10. Perspectivas.....	78
11. Bibliografía.....	80
Anexo1. Consentimiento informado.....	87
Anexo2. Hoja de recolección de datos.....	88
Anexo 3. Immunoblot para identificar la proteína LH en la línea celular HepG2.....	91
Anexo 4. Artículo publicado.....	92

ABREVIATURAS

aa: aminoácido(s)

ABCA1: Transportador de colesterol ABCA1; ATP binding cassette transporter, transportador ABCA1

ADA: Asociación Americana de diabetes; American Diabetes Association

AML12: Línea celular murina de origen hepático; alpha-mouse liver-12

AP-1: Proteína activadora 1; activating protein 1,

ApoA-I: Apolipoproteína A-I

ApoA-II: Apolipoproteína A-II

ApoA-IV: Apolipoproteína A-IV

ApoC-I: Apolipoproteína C-I

ApoC-II: Apolipoproteína C-II

ApoL-I: Apolipoproteína L-I

ApoM: Apolipoproteína M

ARP-1: Proteína regulatoria de la apolipoproteína A-I; apolipoprotein A-I regulatory protein-1

Asp: Ácido aspártico

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

CAT: Cloranfenicol: acetiltransferasa; chloramphenicol acetyltransferase

DNA: Ácido desoxirribonucleico; deoxyribonucleic acid,

DNasa I: Enzima DNasa 1

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

ENSANUT: Encuesta de Salud y nutrición

FXR: Receptor X del farnesilo farnesoid X receptor,

HDL: lipoproteínas de alta densidad; High density lipoproteins,

HepG2: Células humanas de hepatoblastoma; human hepatoblastoma cells,

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

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

IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia; intermediate density lipoproteins,

IMC: Índice de masa corporal

INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

LCAT: Lecitina: colesterol aciltransferasa; lecitin: colesterol acyltransferase,

LDL: Lipoproteínas de baja densidad; low density lipoproteins,

LDLR: Receptor de la LDL; LDL receptor

LH: Lipasa hepática

LPL: Lipoproteína lipasa

Lp-PLA2: Fosfolipasa A2 asociada a la lipoproteína, lipoprotein-associated phospholipase A2,

NCBI: Centro nacional para la información biotecnológica; National center for biotechnology information,

PAF-AH: Acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas; platelet-activating factor-acetylhydrolase,

PBD: Banco de datos de proteínas; protein data bank,

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; polymerase chain reaction,

PGC-1 α : Co-activador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisoma γ

PLAT: Policisteína, lipoxigenasa, toxina alfa; polycystin-1, lipoxygenase, alpha-toxin,

PolyPhen: Fenotipado del polimorfismo; polymorphism phenotyping,

PON1: Paraoxonasa 1

RE α : Receptor de estrógeno α

RNA: Ácido ribonucleico; ribonucleic acid,

RNA_m: RNA mensajero

RXR α : Receptor X del ácido retinoico α

SR-B1: Receptor basurero clase B tipo1: scavenger receptor class B type 1

TG: Triglicéridos

USF: Factor estimulador “río arriba; upstream stimulatory factor,”

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad; very low density lipoprotein

RESUMEN

La enfermedad cardiovascular (ECV) es una de las principales causas de muerte en México. Estudios epidemiológicos en distintas poblaciones y en modelos animales han demostrado que la presencia de niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL; high density lipoproteins) es un factor de riesgo para desarrollar ECV. En la mayoría de las familias la concentración de colesterol HDL (C-HDL) se comporta como un rasgo poligénico y su heredabilidad se estima entre el 50-70%. Los genes asociados con la modulación de los niveles séricos de estas lipoproteínas son en su mayoría aquellos que participan en el transporte reverso del colesterol. Uno de estos genes es el de la lipasa hepática (*LIPC*), la enzima codificada por este gen (LH) se encarga de hidrolizar los fosfolípidos y triglicéridos de las HDL₂. En el humano y en modelos animales se ha observado que existe una relación inversa entre la actividad sérica de esta enzima y los niveles de C-HDL.

Otra de las patologías que puede contribuir al desarrollo de la ECV es la diabetes tipo 2 (DT2), que al igual que las anormalidades lipídicas también tiene una alta prevalencia en nuestra población

En una primera instancia identificamos variantes en la región regulatoria y dentro de la secuencia codificante del gen *LIPC* en sujetos de la población mexicana. Se identificaron 5 variantes con una baja frecuencia en la población general y una variante común de promotor (-514 C>T). De las 5 variantes de baja frecuencia 3 de ellas se encuentran en la secuencia codificante (R135C S289F y Q355R) y 2 en el promotor (-480 C>T y -592 G>A).

El objetivo general de este trabajo fue realizar una caracterización funcional de estas 6 variantes. Se realizaron estudios tanto *in silico* como *in vitro* de estas variantes. También se realizó una caracterización parcial de los efectos *in vivo* de las mismas.

Adicionalmente, en un análisis de mediación en 2105 sujetos se determinó que la variante -514 C>T se relaciona con niveles elevados de C-HDL y riesgo bajo de desarrollar diabetes tipo 2 (DT2). Demostramos que el efecto de esta variante sobre el riesgo de desarrollar DT2 es indirecto ya que los niveles elevados de colesterol HDL son la variable mediadora a través de la cual la variante genética -514 C>T ejerce sus efectos para disminuir el riesgo de desarrollar DT2. Mediante ensayos de movilidad electroforética se pudo determinar que el alelo menor de las variantes -480 C>T y -592 G>A

disminuyen la unión de proteínas nucleares. Adicionalmente, a través de ensayos de gen reportero se evidenció que las variantes de promotor -480 C>T, -514 C>T y -592 G>A disminuyen la expresión del gen *LIPC* de manera importante.

Por otro lado, mostramos que las variantes no sinónimas R135C, S289F y Q355R disminuyen el contenido de proteína LH intracelular así como la secreción de la misma. La variante S289F, ya se había reportado anteriormente en una familia con deficiencia en lipasa hepática; mientras que las otras dos variantes no habían sido caracterizadas. Adicionalmente, la variante R135C no ha sido identificada en otras poblaciones por lo que podría tratarse de una variante exclusiva de poblaciones de origen amerindio. La variante Q355R se comporta como una mutación de alta penetrancia que aumenta los niveles de C-HDL.

Como perspectivas de este trabajo se plantea realizar una caracterización de las 5 variantes de baja frecuencia midiendo la actividad enzimática de la LH en el suero de los portadores así como la estimación de parámetros cinéticos de las proteínas mutadas LH R135C, LH S289F y LH Q355R.

1. Antecedentes

La cardiopatía isquémica por aterosclerosis de las arterias coronarias es la primera causa de muerte en México [INEGI, 2021]. Estudios epidemiológicos en distintas poblaciones, así como en modelos animales han mostrado que existe una relación inversa entre los niveles plasmáticos de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) y el riesgo de desarrollar cardiopatía isquémica [Gordon y cols., 1989a; Gordon y cols., 1989b; Duverger y cols., 1996; Genest y cols., 1999; Benoit y cols., 1999; Grundy y cols., 1999; von Eckardstein y cols., 2001].

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2006 reveló que la hipoalfalipoproteinemia (C-HDL < 35 mg/dl) es una de las anormalidades lipídicas más frecuentes y persistentes en población mexicana con una prevalencia del 63% [Aguilar y cols., 2001; Villalpando y cols., 2010]. Por lo tanto, a nivel mundial México encabeza la lista de los países con la prevalencia más elevada para esta alteración lipídica [Mahley y cols., 1995; Bhopal y cols., 1999].

Otra de las patologías que puede contribuir al desarrollo de la ECV es la diabetes tipo 2 (DT2), que al igual que las anormalidades lipídicas también tiene una alta prevalencia en nuestra población (10,3%) [ENSANUT, 2018]. En pacientes con alguna alteración metabólica la prevalencia de esta enfermedad puede ser mayor; tal es el caso de pacientes con obesidad central donde la prevalencia se eleva hasta un 18.9% [Villalpando y cols., 2010].

En algunos pacientes con DT2 se puede presentar alguna dislipidemia como una comorbilidad. Las anormalidades lipídicas más frecuentes que coexisten en pacientes con DT2 son niveles bajos de C-HDL y niveles elevados de triglicéridos (hipertrigliceridemia); por lo cual estos pacientes tienen un alto riesgo de presentar cardiopatía isquémica. Como en cualquier otro conjunto de rasgos complejos es difícil identificar de entre las dislipidemias y la DT2 cuál es la condición o causa preexistente y cuál se presenta de manera secundaria. De esta forma, en algunos pacientes la DT2 será la causa primaria y la dislipidemia se desarrollará como complicación secundaria, mientras que en otros individuos, las dislipidemias serán la condición primaria que desencadenará la alteración en la homeostasis de glucosa [Mykkänen y cols., 1993; Wilson y cols., 2007; Abbasi y cols., 2013]. A este respecto, mediante estudios prospectivos se ha podido evidenciar que los niveles bajos de C-HDL son un factor de riesgo

importante para el desarrollo de DT2 [Mykkänen y cols., 1993; Wilson y cols., 2007]; en contraste los niveles elevados de C-HDL son un factor de protección independiente para el desarrollo de esta patología [Abbasi y cols., 2013].

La heredabilidad del C-HDL se ha estimado entre 50-70% [Whitfield y cols., 1983; Heller y cols., 1993] y en la mayoría de las familias los niveles de C-HDL son un rasgo poligénico. Los principales genes asociados con la modulación de los niveles séricos de estas lipoproteínas son principalmente los genes que participan en el transporte reverso del colesterol [Fielding y cols., 1995; Tall y cols., 2001; Cohen y cols., 2004].

Uno de estos genes es el gen de la lipasa hepática (*LIPC*). La enzima codificada por este gen (LH) se encarga de hidrolizar los fosfolípidos y triglicéridos de las HDL, las lipoproteínas de densidad intermedia y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [Jensen y cols., 1982; Kinnunen y cols., 1984]. En particular en el caso de las HDL la hidrólisis mediada por la LH permite la transformación de HDL₂ (ricas en lípidos) a HDL₃ (partículas densas y pequeñas). La LH independientemente de su función enzimática favorece además la captación del C-HDL mediada por el receptor basurero B1 (SR-B1) [Lambert y cols., 1999].

De acuerdo a estudios en modelos animales y en humanos se ha observado que la actividad de la LH guarda una relación inversa con los niveles de C-HDL [Mezdour y cols; 1997; Isaacs y cols., 2004].

En un análisis inicial en individuos de población mexicana, secuenciamos el promotor del gen *LIPC* así como sus 9 exones, esto con el propósito de identificar variantes que tuvieran un efecto funcional importante. Para este análisis se incluyeron dos grupos: 30 individuos con hipoalfalipoproteinemia severa (C-HDL < percentila 10) y 30 individuos con hiperalfalipoproteinemia (C-HDL > percentila 90). Estos sujetos fueron seleccionados con estrictos criterios de exclusión que incluyeron factores ambientales que pudieran modificar los niveles de C-HDL tales como tabaquismo y alcoholismo, niveles elevados de triglicéridos, diabetes, enfermedad tiroidea, disfunción renal y uso de esteroides así como hepatopatías. Bajo estas consideraciones, las variantes identificadas exclusivamente en uno de los dos grupos es posible que tengan un efecto importante sobre los niveles de expresión o la actividad de la enzima, de tal manera que esto se vea reflejado en los niveles de C-HDL [Guerra-García, 2008].

Como resultado de esta secuenciación se identificaron 2 variantes del promotor y 3 variantes de la secuencia codificante del gen *LIPC* que fueron exclusivas de alguno de los dos grupos, también se pudo observar además que la variante común -514 C>T (rs1800588) está presente en población mexicana con una frecuencia mayor al 40% [Guerra-García, 2008].

Existe evidencia de que algunas variantes del gen *LIPC* incluida la variante -514 C>T, además de relacionarse con niveles elevados de C-HDL y una disminución de la actividad de la enzima LH en el suero de los pacientes [Isaacs y cols., 2004], también se asocian con dislipidemias y sus comorbilidades, tales como: niveles séricos de colesterol total [Hoffer y cols., 2000], el índice LDL/HDL [Zambon y cols., 2000; Knoblauch y cols., 2004], la diabetes [Todorova y cols., 2004], la obesidad central [Carr y cols., 1999], la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (Sx metabólico) [Teran y cols., 2005]. Por lo tanto en este estudio se evaluó el papel de estas 5 variantes identificadas y su relación con algunos de estos fenotipos.

2. Introducción

2.1 La estructura de las lipoproteínas HDL

Las HDL, como el resto de las lipoproteínas son complejos macromoleculares, pseudomicelares constituidos principalmente por lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y proteínas llamadas apolipoproteínas. Los lípidos anfipáticos se organizan formando una monocapa en la superficie del complejo, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso (Figura 1) [Edelstein y cols., 1979].

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

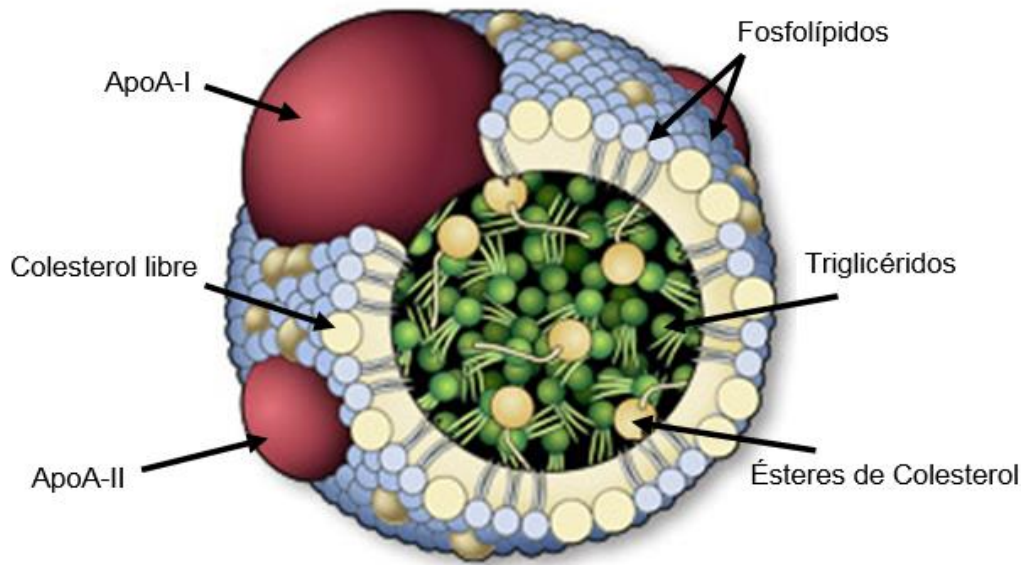


Figura 1. Estructura básica y composición de las HDL. Modificado de <http://wichita.kumc.edu/edtech/medill.html>.

Las HDL tienen un diámetro de 70-100Å y una masa que va de los 200, 000 a 400,000 daltones. Estas partículas tienen una densidad entre 1.063 a 1.21 g/ml; mediante ultracentrifugación analítica pueden separarse en partículas ligeras y partículas pesadas llamadas HDL₂ y HDL₃, respectivamente. Las primeras tienen una densidad entre 1.063 a 1.12 g/ml mientras que las últimas se encuentran en el rango de 1.13 a 1.21 g/ml. Las HDL₂ son relativamente más abundantes en lípidos y con una menor cantidad de proteínas comparadas con las HDL₃. La densidad de estas partículas se relaciona inversamente con su tamaño, el cual, es el reflejo del contenido relativo de lípidos del “core” y las proteínas de superficie [Scriver y cols., 2001].

Las HDL tienen en promedio una relación 1:1 de lípidos y proteínas; el 32% de la composición de lípidos son ésteres de colesterol, el 5% es colesterol libre, el 55% son fosfolípidos y el 8% son triglicéridos. La parte proteica consiste principalmente de la apolipoproteína A-I (ApoA-I, 70%), y ApoA-II (20%) [Scriver y cols., 2001].

En una menor proporción las HDL además contienen una variedad de proteínas que incluyen las apolipoproteínas ApoA-IV, ApoC-I, ApoC-II, apoD, ApoE, ApoL-I, ApoM, y enzimas como la LCAT (Lecitín colesterol aciltransferasa), PON1 (paraoxonasa 1) y PAF-AH/Lp-PLA2 (Acetil hidrolasa del

factor activador de plaquetas o Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas). Algunas de las apolipoproteínas son cofactores de enzimas hidrolasas que “remodelan” las HDL y algunas otras pueden ser ligandos que median la captación de las HDL por el hígado. Las enzimas LCAT, PON1 y PAF-AH/Lp-PLA2 le confieren a las HDL propiedades antioxidantes y en especial la PAF-AH/Lp-PLA2 les confiere propiedades antitrombóticas; ya que estando unidas a la superficie de las HDL catalizan reacciones en las que moléculas pro-oxidantes o pro-trombóticas son escindidas e inactivadas [Lewis y Rader, 2005; Ansell., 2005].

Las partículas HDL que únicamente contienen ApoA-I como constituyente proteico, poseen 4 cadenas polipeptídicas ApoA-I y son ligeras (HDL₂); por su parte aquellas partículas que contienen tanto ApoA-I como ApoA-II contienen dos copias de cada una de estas apolipoproteínas y son más densas y pequeñas (HDL₃). Las partículas HDL enriquecidas de ApoE contienen principalmente esta apolipoproteína y su densidad es menor que la de las HDL₂. Existen también las HDL pre-β1 que a diferencia de las HDL₂ y HDL₃ tienen un bajo contenido en lípidos y una densidad aproximada de 1.28 g/ml. El corrimiento electroforético de las lipoproteínas séricas muestra que las HDL₂ y HDL₃ son las que más logran separarse del origen (punto de carga en el gel donde se depositan las muestras para someterlas a una corriente eléctrica). Por este motivo a las HDL también se las conoce α-lipoproteínas. [Scriver y cols., 2001].

2.2 Estructura y función de la proteína LH

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

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

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

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

Aunque no se conocen exactamente los aminoácidos del sitio activo se ha postulado en la base de datos *ProRule* cuales podrían ser los residuos necesarios para la actividad enzimática de la LH. Esta base de datos contiene información funcional y estructural de proteínas y se considera que la triada catalítica de la LH podría consistir de los residuos: 168 correspondiente a una serina (S), 194 correspondiente al ácido aspártico (D) y 279 correspondiente a una Histidina (H) [Sigrist y cols., 2005]. Esta tríada Ácido-Base-Nucleófilo (D-H-S) es un motivo común presente en varias hidrolasas y transferasas (proteasas, amidasas, estererasas, acilasas, lipasas y β -lactamasas) [Dodson y cols., 1998; Buller y cols., 2013].

Este motivo es necesario para la generación de un residuo nucleofílico y de esta manera llevar a cabo una catálisis covalente. Estos tres residuos forman una red de transferencia de carga que polariza y activa el residuo nucleofílico, que a su vez realiza un ataque al sustrato formando un intermedio

covalente enzima-sustrato que luego se hidroliza para liberar la enzima nuevamente [Dodson y cols., 1998; Buller y cols., 2013].

En la figura 2 se observa la estructura primaria de la LH donde se representaron los residuos de la triada catalítica en azul, así como los aminoácidos donde se identificaron las mutaciones que se estudiaron en este proyecto. En verde además se presentan residuos que de acuerdo a estudios y técnicas de secuenciación masiva de proteínas podrían estar Glucosilados (N-Glicosilación) [The UniProt Consortium, 2019].

Figura. Estructura primaria de la lipasa hepática

10	20	30	40	50
MDTSPLCFSI	LLVLCIFIQS	SALGQSLKPE	PFGRRQAQAVE	TNKTLEHMK
60	70	80	90	100
RFLLFGETNQ	GCQIRINHPD	TLOECGFNSS	LPLVMIIHGW	SVDGVLENWI
110	120	130	140	150
WQMVAALKSQ	PAQPVNVGLV	DWITLAHDHY	TIAVRNTRLV	GKEVAALLRW
160	170	180	190	200
LEESVQLSRS	HVHLIGYSLG	AHVSGFAGSS	IGGTHKIGRI	TGLDAAGPLF
210	220	230	240	250
EGSAPSNRLS	PDDANFVDI	HTFTREHMGL	SVGIKQPIGH	YDFYPNGGSF
260	270	280	290	300
QPGCHFLELY	RHIAQHGfNA	ITQTIKCSHE	RSVHLFIDSL	LHAGTQSMAY
310	320	330	340	350
PCGDMNSFSQ	GLCLSCCKGR	CNTLGYHVRQ	EPRSKSKRLF	LVTRAQSPFK
360	370	380	390	400
VYHYQFKIQF	INQTETPIQT	TFTMSLLGTK	EKMQKIPITL	GKGIASNRTY
410	420	430	440	450
SFLITLDVDI	GELIMIKFKW	ENSAVWANVW	DTVQTIIPWS	TGPRHSGLVL
460	470	480	490	
KTIRVKASET	QQRMTFCSEN	TDDLRLRPTQ	EKIFVKCEIK	SKTSKRKIR

Figura 2. Se observa en amarillo los 22 aminoácidos del péptido señal y en azul los que pudieran ser los residuos de la triada catalítica de acuerdo a la base *ProRule*. En rojo se observan también los residuos donde se identificaron las mutaciones de este estudio, y en verde los residuos que podrían sufrir modificación postraduccional.

Obtener la estructura tridimensional de esta proteína ha sido complicado y aunque las técnicas han mejorado con el tiempo, hasta hoy en día no se conoce la estructura tridimensional exacta de la proteína LH humana. Esto debido probablemente a que como ocurre con otras proteínas que interaccionan con lípidos la cristalización en medios acuosos para la obtención de radiografías de rayos X se complica. Lo que por ahora no se ha logrado con técnicas experimentales de proteómica y la biofísica se ha tratado de suplir con técnicas *in silico*. En este punto gracias a técnicas bioinformáticas de modelado por homología se ha logrado obtener estructuras tridimensionales de la proteína LH que

se basan en estructuras reales que tienen una muy buena resolución y una alta similitud con la proteína LH [The UniProt Consortium, 2019].

En la figura 3 se muestra la estructura tridimensional probable de la proteína LH publicada el sitio UniProt [The UniProt Consortium, 2019]. De acuerdo con este sitio existe un dominio PLAT que se encuentra muy conservado dentro de las familias de proteínas que se asocian a lípidos o a la membrana plasmática y que en la proteína LH abarca los residuos del 352 al 486. Además, experimentalmente se ha identificado que los residuos 254 al 277 son importantes para la especificidad del sustrato [Dugi y cols., 1995], en la figura representada forman un loop conformado por dos pequeñas hélices alfa.

Figura. Estructura tridimensional probable de la lipasa hepática

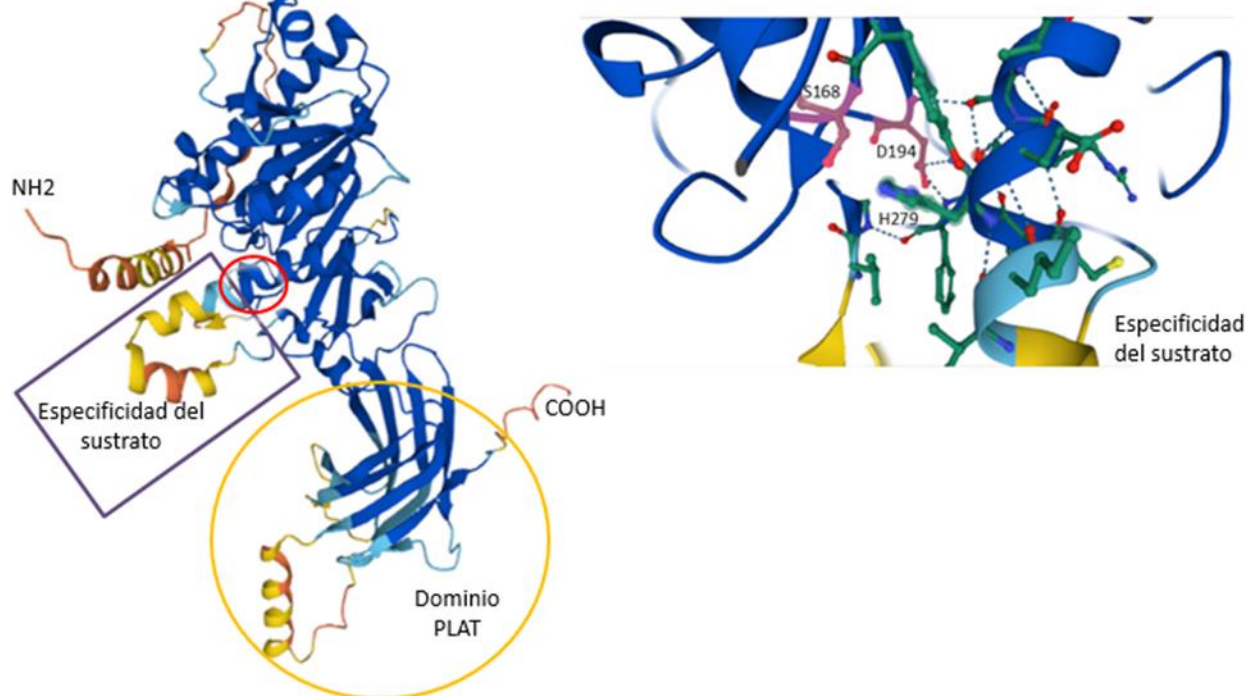


Figura 3. Se observan enmarcados el dominio PLAT y la región que se encarga de la especificidad del sustrato así como el sitio catalítico en un pequeño círculo rojo que se amplifica para mostrar el detalle de la triada catalítica.

2.3 Estructura del gen *LIPC*

En el humano, el gen *LIPC* consta de 9 exones y 8 intrones y se localiza en el cromosoma 15 (q15–q22). Se han identificado dos sitios de inicio de la transcripción, uno localizado a 42 nucleótidos y otro a 55/56 nucleótidos del inicio de la traducción [Ameis y cols., 1990; Perret y cols., 2002]. El exón 1 posee los dominios E2, E3 y E4, que son elementos regulatorios negativos [Perret y cols., 2002].

Adicionalmente, en la secuencia 5' no transcrita se localizan elementos de respuesta para distintos factores de transcripción. Entre los factores de transcripción que regulan negativamente la expresión del gen se encuentran el RE α , el AP-1, el FXR y el ARP-1 [Sensel y cols., 1990; Hadzopoulou y Cardot, 1993]; mientras que los factores de transcripción que regulan positivamente la expresión de este gen son USF, el HNF4 α , el PGC-1 α , y el HNF1 α [Hadzopoulou y Cardot, 1993; Oka y cols., 1996; Chang y cols., 1997; Jones y cols., 2002; Rufibach y cols., 2006]. Los factores de transcripción PGC-1 α y HNF4 α que promueven la expresión del gen así como el factor de transcripción ARP-1 que reprime la expresión del gen se unen a una secuencia DR1 localizada entre los nucleótidos -238 a -226 [Rufibach y cols., 2006].

El exón 1 codifica para el péptido señal; el exón 4 codifica para la secuencia de la proteína que se une al sustrato; mientras que el exón 5 está altamente conservado en otras especies y es donde se encuentra la función catalítica (serina hidrolasa). Los exones 6 y 9 codifican secuencias ricas en aminoácidos básicos por lo cual son importantes para la unión de la enzima a la de membrana celular de los hepatocitos donde interactúa con los glucosaminglucanos [Ameis y cols., 1990].

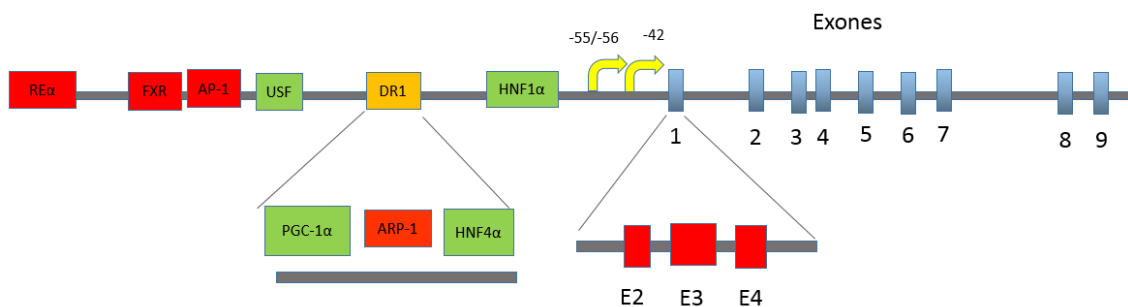


Figura 4. Estructura del gen *LIPC*, se observan en las cajas azules los 9 exones de este gen; las cajas verdes son elementos de respuesta para factores de transcripción que promueven la expresión del gen y las cajas rojas son elementos de respuesta a factores que la reprimen. A la secuencia identificada como DR1 se pueden unir los factores de transcripción PGC-1 α y HNF4 α que promueven la expresión del gen además del factor de transcripción ARP-1 que la reprime. El exón 1 posee en su secuencia los elementos E2 a E4 a través de los cuales también se reprime la expresión del gen, y las flechas indican el sitio de inicio de la transcripción.

2.4 Variantes del gen *LIPC*

En un estudio previo en población mexicana identificamos variantes en la región regulatoria y dentro de la secuencia codificante del gen *LIPC*. Para este estudio se tenía un grupo de personas con HDLs por debajo de percentila 10 (HDLs bajas) y otro grupo con HDLs por arriba de la percentila 90 (HDLs altas). En grupo con HDLs altas se identificaron las variantes de región promotora -480 C>T y -592 G>A con una frecuencia respectiva de 0.033 y 0.066 [Guerra-García, 2008]. Considerando que los niveles de expresión del gen *LIPC* se relacionan inversamente con los niveles de las HDLs, estas variantes podrían tener un efecto regulatorio negativo sobre la transcripción del gen tal como se ha reportado para otras variantes localizadas en el promotor. Las variantes del promotor identificadas en trabajos previos disminuyen la actividad de LH en el suero de los portadores pero no se han determinado *in vivo* niveles de expresión, ya que este gen se expresa en el hígado. Sin embargo, *in vitro* se ha visto una menor actividad transcripcional del alelo menor [Deeb y Peng, 2000; Su y cols., 2002; Isaacs y cols., 2004].

La variante - 592 G>A se localiza dentro de la secuencia -698 a -541. Mediante estudios funcionales se determinó que en esta secuencia podría existir un elemento de respuesta para el FXR; el cual es un factor de transcripción que regula negativamente la expresión del gen [Sirvent y cols., 2004], además de que mediante ensayos de footprinting se ha determinado que la secuencia -595/-577 es protegida de la digestión con DNase I [Oka y cols., 1996]. A solo 6 nucleótidos de donde se localiza esta variante se encuentra la variante -586 T>C, identificada exclusivamente en población china; en estudios funcionales se observó que el alelo C disminuye al 56% la transcripción del gen [Su y cols., 2002]. Los resultados anteriores nos permiten considerar que la variante - 592 G>A, pudiera estar modificando de manera importante la transcripción del gen *LIPC*.

En el mismo grupo de HDLs altas se identificaron 3 variantes de secuencia codificante. La nomenclatura que corresponde para cada una de ellas considerando los residuos del péptido señal son: Q355R, S289F y R135C (frecuencia del alelo menor en el grupo de HDLs altas: 0.100, 0.033, 0.033, respectivamente) [Guerra-García, 2008]. La variante S289F ya ha sido reportada; en conjunto los estudios funcionales tanto *in vivo* como *in vitro* demostraron que esta variante disminuye la actividad de LH y su secreción [Durstefeld y cols; 1994]. El análisis bioinformático con el programa Polyphen predice que las tres variantes de la secuencia codificante posiblemente afectan la función de la enzima.

Este análisis consistió en el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la LH en conjunto con la lipasa endotelial, y la lipoproteína lipasa de distintas especies; donde se observó que los residuos Q355 y S289 se encuentran 100% conservados. Por otro lado, aunque el residuo R135 no está 100% conservado en las lipasas analizadas, se pudo observar que ninguna de ellas presentaba el residuo cisteína en esta posición. Es probable que tanto la variante Q355R como R135C tengan un efecto semejante al de la variante S289F; ya que los resultados del análisis bioinformático son muy similares [Durstefeld y cols; 1994; Guerra-García, 2008].

Estas variantes han sido identificadas en población europea, asiática, latina y africana gracias a estudios del genoma completo y de exomas mediante el uso de tecnologías de secuenciación masiva, por lo que ya se tiene registrado un rs para 4 de ellas, y se conocen sus frecuencias en diferentes poblaciones incluida la población latina [Karczewski y cols., 2019]. Las variantes Q355R y S289F se han relacionado con deficiencia de LH (Tabla 1) [Landrum y cols., 2014]. Pero solamente se han realizado estudios funcionales de la variante S289F en reportes previos [Durstefeld y cols., 1994]. De acuerdo a los datos de la base ClinVar que contiene un banco de variantes que se asocian a diferentes enfermedades o rasgos en humanos, tres de las variantes exclusivas de grupo no han sido asociadas a algún fenotipo [Landrum y cols., 2014]. Debido a lo anterior en el presente estudio se analizó el papel de estas 5 variantes que fueron exclusivas de alguno de los grupos y de la variante común -514C >T.

Tabla. Datos de las variantes identificadas que al parecer son mutaciones y la variante común -514 C>T

Variante	rs	Posición en cromosoma	Frecuencia del alelo menor en latinos	Fenotipo en la base ClinVar
Q355R	rs140272400	15:58853075 A / G	0.0297000	Deficiencia de LH
S289F	rs121912502	15:58840586 C / T	0.0001411	Deficiencia de LH
R135C		15:58834113 C / T		
-480 C>T	rs35511894	15:58431510	0.0081920	
-592 G>A	rs36041167	15:58431398	0.0176900	
-514 C>T	rs1800588	15:58431544	0.283	

Tabla 1. Se muestra el rs y la posición de las variantes identificadas reportado en las bases de datos del gnomAD browser y los fenotipos relacionados en la base ClinVar, así como la frecuencia del alelo menor en población latina. En color azul se identifica la variante de promotor -514 C>T ya que a diferencia de las otras 5 variantes identificadas esta es una variante común que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con las variantes -250 G>A, -710T>C, y -763A>G.

En cuanto a la variante común -514 C>T se sabe que está se encuentra en desequilibrio de ligamiento (se hereda de manera conjuntamente) con las variantes -250 G>A, -710T>C, y -763A>G. Estas variantes se han relacionado con niveles altos de colesterol HDL y una actividad baja de la enzima LH en suero [Jansen y cols., 1997; Guerra y cols., 1997]. En células HepG2 transfectadas con un vector con el reportero CAT bajo el control de la secuencia promotora que comprende los nucleótidos -895/+50 no se observó efecto de los alelos -250A,-514T, -710C o -763G al estar separados o como haplotipo al compararlo con los alelos silvestres [van't Hooft y cols., 2000]. Al reproducir el experimento cambiando solo la secuencia clonada río arriba del gen reportero por la secuencia -684/+14, se logró ver que la combinación de alelos mutados -250A, y -514T en conjunto disminuían la actividad del promotor al 55% Sin embargo, de forma individual solo el alelo -250A presentaba efecto (disminución al 75% de la actividad). Al parecer el efecto de la variante -514 C>T solo es perceptible cuando ambas variantes presentan alguna sinergia [Botma y cols., 2001].

Al utilizar otro sistema de expresión que incluía la transfección de células hepáticas murinas (AML12) y el uso del reportero luciferasa bajo el control de la secuencia promotora -639/+29, se observó que el alelo -514T disminuía por sí solo la actividad del promotor al 70%. Por lo cual se concluyó que al polimorfismo -250 G>A no tenía efecto alguno [Deeb y Peng, 2000].

La diferencia entre los ensayos reportados por Deeb, Botma y van't Hooft probablemente se explique por distintos factores:

1. Es posible que las células AML12 no expresen todos los factores de transcripción necesarios para la expresión del gen *LIPC* humano; en particular aquellos a través de los cuales la variante -250 G>A ejerce su efecto.
2. Encontrar diferencias estadísticamente significativas depende de la sensibilidad y especificidad de los métodos utilizados y en los estudios se utilizaron dos reporteros distintos (la luciferasa de luciérnaga en el estudio de Deeb y acetiltransferasa de cloranfenicol ó CAT en el estudio de Botma y van't Hooft).
3. Es posible que en la secuencia de nucleótidos río arriba del nucleótido -639 y río abajo de la secuencia +29 se encuentren elementos de respuestas que modifican negativamente la expresión del gen *LIPC*, tal que al ser tan pequeña la actividad del promotor no se puedan apreciar diferencias en los alelos [Deeb y Peng, 2000; van't Hooft y cols., 2000; Botma y cols., 2001].

Además de los ensayos de gen reportero para el promotor del gen *LIPC* también se han realizado análisis para identificar interacciones DNA-proteína. En estos ensayos no se observó que la secuencia contigua a la posición -514 fuese protegida de la digestión con DNasa I ya sea usando los extractos nucleares de hepatocitos de rata [Hadzopoulou y Cardot, 1993] o de células HepG2 [Oka y cols., 1996]. Sin embargo, mediante análisis bioinformático se propone la existencia de un elemento de respuesta para USF (upstream stimulatory factor) en la secuencia contigua a esta variante [Deeb y Peng, 2000; Botma y cols., 2001]. De acuerdo con estos análisis se considera que la presencia de esta variante podría eliminar la posibilidad de unión del factor de transcripción USF [Botma y cols., 2001].

En un ensayo de EMSA, utilizando un oligonucleótido con la secuencia -531 a -502 del promotor del gen de la LH, y un anticuerpo anti-USF se observó la formación de un complejo DNA-proteína. La formación de este complejo disminuyó cuando el oligonucleótido contenía el alelo T de la variante -514C>T. Además, en ensayos de gen reportero se observó que el USF recombinante incrementó de manera dosis dependiente la actividad del promotor del gen de la LH en células HepG2; también en este caso se observó que el efecto se atenuó con la presencia del alelo -514T [Botma y cols., 2001].

Tomando en cuenta que la expresión del USF se ve incrementada en condiciones de hiperinsulinemia debemos considerar que el eje USF-LH se vería incrementado en condiciones de glucosa elevada y/o insulina tal como ocurre en el postprandio o en pacientes diabéticos, ya que estas condiciones incrementan la expresión del factor USF y se ha observado al mismo tiempo un aumento de la actividad sérica de la enzima LH [Katzel y cols., 1992; Wang y Sul, 1994; Vaulont y Kahn, 1995; Botma y cols., 2001]. No obstante, la presencia del alelo -514 T podría estar evitando la unión del USF a su elemento de respuesta y por lo tanto promovería la disminución del efecto indirecto que la insulina ejerce sobre el promotor del gen de la LH [Botma y cols., 2001].

2.5 El panorama epidemiológico de las dislipidemias y otras enfermedades metabólicas en México

Gracias a la Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición (ENSANUT) que se han realizado en México se cuenta con datos que ponen en evidencia la alta incidencia y prevalencia de enfermedades metabólicas dentro de las que destacan las dislipidemias, la DT2 y la obesidad. Por lo anterior se considera que México atraviesa por una transición donde las enfermedades metabólicas pasan a ser de las enfermedades más prevalentes descartando a las enfermedades infecciosas que eran de las más preocupantes en las décadas pasadas [Aguilar y cols., 2001; Villalpando y cols., 2010; Barquera y cols., 2013].

La ENSANUT 2006 es la última encuesta donde se analizaron las mediciones de química sanguínea en el suero de los encuestados además de las mediciones antropométricas y de los factores socioeconómicos. Lamentablemente en las siguientes encuestas (correspondientes al año 2012 y 2018)

no se realizó toma de muestra sanguínea; solo se preguntó a los entrevistados si se reconocían con algún padecimiento metabólico (colesterol alto, triglicéridos elevados, diabéticos, etc). Los datos que aportó la ENSANUT 2006 colocaban dentro de las enfermedades metabólicas más comunes a la DT2 (14.4%), el síndrome metabólico (36.8%), la hipertensión (30.7%), la hipercolesterolemia (43.6%), el colesterol LDL alto (46%), y las concentraciones bajas de C-HDL (63%). Algunas de estos padecimientos presentaban tendencias crecientes con respecto a los resultados reportados en la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC del 1993) [Aguilar y cols., 2001].

A la par de estas observaciones epidemiológicas también se ha logrado determinar que las enfermedades del corazón y la diabetes son de las primeras causas de muerte en nuestro país. [Secretaría de Salud 2002; Villalpando y cols., 2010; INEGI, 2021]. Lo anterior es importante de recalcarlo ya que se considera que las dislipidemias y la DT2 son un factor de riesgo independiente para las enfermedades cardiovasculares [Rodríguez y cols., 2019]. Estos datos en conjunto sugieren que estos padecimientos comparten un fondo genético y/o ambiental [Xu y cols., 2019]. Por lo tanto, en el mediano o corto plazo un paciente con alguna enfermedad metabólica se encuentra en alto riesgo de desarrollar otra comorbilidad. Por lo que es importante tener un adecuado control metabólico de estos pacientes. Las estrategias deben incluir no sólo tratamientos farmacológicos sino además estilos de vida saludable. (*e.j.* programas de reducción de peso corporal, estrategias nutricionales, disminución de los niveles de stress, etc.) [Huayanay-Espinoza y cols., 2016].

Por lo tanto existe una necesidad de desarrollar programas nacionales preventivos y eficaces para lograr frenar la incidencia de las enfermedades metabólicas, así como evitar muertes prematuras [Villalpando y cols., 2010].

2.6 La diabetes

La diabetes representa un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la elevación de glucosa en sangre que tienen una variación en la forma de presentación clínica y la progresión de la enfermedad. Tanto en la diabetes tipo 1 como tipo 2, distintos factores genéticos como ambientales pueden resultar en la pérdida progresiva de la masa de células β y/o su función que se manifiesta clínicamente como hiperglucemia. Una vez que se presenta la hiperglucemia, los pacientes se

encuentran en riesgo de desarrollar las mismas complicaciones crónicas; sin embargo el tiempo y grado de progresión pueden variar dependiendo del tipo de diabetes [ADA, 2021].

2.6.1 Clasificación de la diabetes

De acuerdo a la American Diabetes Association (ADA), la diabetes puede ser clasificada dentro de las siguientes categorías generales.

- a. Diabetes tipo 1. Debida a la destrucción autoinmune de las células β , usualmente conlleva a la deficiencia absoluta de insulina, incluyendo diabetes autoinmune latente del adulto.
- b. Diabetes tipo 2 (DT2). Se debe a la de resistencia a la insulina y en la mayoría de los pacientes se puede observar la pérdida progresiva de la secreción de insulina en la célula β durante el transcurso de la enfermedad.
- c. Otros tipos específicos de diabetes que se deben a diversas causas, como por ejemplo síndromes de diabetes monogénica que incluyen la diabetes neonatal y diabetes tipo MODY (maturity-onset diabetes of the young, por sus siglas en inglés), enfermedades del páncreas exocrino (fibrosis quística y pancreatitis), diabetes inducida por fármacos (*e.j.* uso de glucocorticoides, medicamentos para tratar el SIDA/VIH, trasplante de órganos).
- d. Diabetes Gestacional, que se caracteriza por hiperglucemia que se diagnostica en el segundo o tercer trimestre del embarazo, y que puede haber estado presente incluso antes del embarazo [ADA, 2021].

2.6.2 Fisiopatología de la DT2

La DT2, anteriormente conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente o diabetes del adulto se caracteriza por insulinoresistencia, deterioro de la función secretora de las células β pancreáticas e incremento en la producción hepática de glucosa. Desde el inicio y frecuentemente a lo largo del desarrollo de la enfermedad los individuos no requieren insulina para el tratamiento y control de la hiperglucemia [ADA, 2004].

La DT2 es un padecimiento complejo y multifactorial con un componente genético en el que participa un número indeterminado de genes (herencia poligénica) y un componente ambiental que se conforma por diferentes factores de riesgo que incluyen la obesidad, dislipidemia, hipertensión arterial, dieta rica

en carbohidratos, factores hormonales, estilo de vida sedentaria y un componente inflamatorio. Existen varias causas de insulinoresistencia entre las que se pueden destacar la glucotoxicidad, la lipotoxicidad y la inflamación. La DT2 a diferencia de la diabetes tipo 1 no se asocia con la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas [Sivitz, 2001; Diamond, 2003; Guzmán y Madrigal 2008].

Las concentraciones de insulina en los pacientes con DT2 pueden ser normales o elevadas. Algunos pacientes con DT2 pueden permanecer asintomáticos por muchos años y desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares después de algunos años o décadas. Sin embargo, algunos pacientes pueden desarrollar las complicaciones en forma más temprana [Reaveny y cols., 1976; Umpierrez y cols., 1995]. Además, existen variaciones en el desarrollo de las complicaciones dependiendo de cada individuo. Lo anterior demuestra la gran heterogeneidad clínica de la DT2 [Gúzman y Madrigal, 2008].

La biosíntesis de la insulina en estos pacientes puede estar disminuida debido a defectos en el procesamiento de la proinsulina, que es la forma inactiva de la insulina [Bano y cols., 2001]. La proinsulina es biotransformada a insulina debido a la acción de dos endoproteasas; la PC2 y PC1 que producen 2 rupturas proteolíticas liberando el péptido C y la insulina madura. En algunos pacientes con este tipo de diabetes los niveles de proinsulina están muy elevados tanto en condiciones basales y después de la estimulación con una carga de glucosa [ADA, 2004].

La obesidad probablemente es una de las comorbilidades más frecuentes de la DT2, esta surge como una consecuencia de la ingesta continua y excesiva de alimento rico en contenido energético que no es utilizado como consecuencia de una baja actividad metabólica y/o sedentarismo; por lo tanto, el exceso de energía se almacena en forma de triglicéridos en el tejido adiposo. El aumento de peso debido al aumento de grasa corporal está relacionado directamente con resistencia a la insulina. En este caso los pacientes presentan niveles elevados de glucosa y resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos [Diamond, 2003]. Bajo esta condición el páncreas incrementa la secreción de insulina debido a la concentración alta y mantenida de glucosa en sangre que se presenta por una ingesta energética alta y/o la resistencia a la insulina [Sharabi, 2012].

Las personas con células β sanas tienen capacidad de adaptarse a altas demandas de insulina (*e.j.* durante el embarazo, o elevadas concentraciones de cortisol) mediante el incremento en su función secretora [Maedler, 2008] y el aumento de la masa de células β [Donath y cols., 2005]. Sin embargo, los pacientes con DT2 presentan una deficiencia adaptativa de las células β , lo cual crónicamente produce un agotamiento celular y apoptosis de la célula β que se traduce finalmente en una reducción en las reservas de de insulina y su secreción [Donath y cols., 2005; Maedler, 2008].

Esta falta de adaptación al incremento en la demanda de insulina, se puede deber a mecanismos mediados por glucotoxicidad y/o lipotoxicidad [Sivitz, 2001; Roche, 2003; Donath y cols., 2005]. Esta condición puede empeorar en pacientes que además presentan la insulinoresistencia. Esto es, cuando el receptor a insulina o su vía de señalización presenta alteraciones en su función o respuesta [Le Roith y Zick, 2001]. La lipotoxicidad es el efecto diabetogénico del aumento de los ácidos grasos libres circulantes o del aumento contenido de grasa celular. Esta condición se manifiesta en varios tejidos, más notablemente el hígado, el músculo y los islotes pancreáticos. La glucotoxicidad es el efecto diabetogénico de concentraciones elevadas de glucosa en sangre que conducen a un aumento de la concentración de glucosa intracelular. Al igual que la lipotoxicidad los efectos tóxicos de la elevación de glucosa intracelular se manifiestan en tejidos importantes para el metabolismo de glucosa como son el hígado, el músculo e islotes pancreáticos [Sivitz, 2001]. Por tanto, los mecanismos de lipotoxicidad y glucotoxicidad pueden ser causa por igual de resistencia a la insulina y de disminución en la secreción de esta hormona [Sivitz, 2001; Roche, 2003; Donath y cols., 2005].

La insulina en condiciones normales se une a su receptor en sus células blanco. En el caso del músculo esquelético y el tejido adiposo permiten la translocación del transportador GLUT4 lo que aumenta la tasa de captación de glucosa en estos tejidos [Chen y cols., 2012]. Además de favorecer la captación de glucosa, la hormona insulina tiene otras acciones metabólicas tanto anabólicas que favorecen la utilización y almacenamiento de glucosa e inhibe las vías catabólicas que dan por resultado un aumento en su producción o liberación. En el hepatocito por ejemplo activa la glucogenogénesis a la par que la glucólisis e inhibe la glucogenólisis y la gluconeogénesis [Le Roith y Zick, 2001].

Debido a que la capacidad de almacenamiento de glucógeno es limitada, el exceso de glucosa que no se almacena en forma de este polímero se almacena en forma de triglicéridos. En este sentido la insulina también modifica el metabolismo de los lípidos aumentando su síntesis en el hígado; en el adipocito específicamente, induce la captación de ácidos grasos de las lipoproteínas circulantes mediante la estimulación de la actividad de la lipoproteína lipasa además de que disminuye la liberación de ácidos grasos y la lipólisis, favorece la diferenciación de los adipocitos además de estimula la lipogénesis y la síntesis de triglicéridos. [Kahn y Flier, 2000].

Todas estas acciones de la insulina en sus tejidos blanco a través de su receptor con actividad cinasa de tirosina disminuyen la concentración de la glucosa en sangre, sin embargo, en pacientes con resistencia a la insulina existe una menor translocación del transportador de glucosa en sus tejidos blanco, además que en el hepatocito persiste el catabolismo del glucógeno y la liberación de glucosa hepática aún durante el posprandio [Cline y cols., 1999;] En estos pacientes está disminuida la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos *de novo*, además de que en el adipocito la lipólisis incrementa la liberación de ácidos grasos libres y disminuye la disposición de glucosa [Sesti, 2006]. Lo anterior se traduce en niveles de glucosa elevados y persistentes que pueden deteriorar la función de algunos órganos al mantenerse esta condición de manera crónica [Kahn y Flier, 2000; Le Roith y Zick, 2001; Sesti, 2006].

En el músculo esquelético de pacientes diabéticos la disminución de la captación de glucosa estimulada por la insulina se debe a la alteración de la señalización de la insulina y a múltiples defectos intracelulares posteriores al receptor. Esto incluye una menor captación de glucosa (debido a la disminución de la traslocación del transportador GLUT4) y la disminución en la fosforilación y oxidación de este carbohidrato, además de la reducción de la síntesis de glucógeno. Se ha demostrado que un mayor contenido de grasa intramiocelular y los metabolitos de ácidos grasos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la resistencia a la insulina en el músculo esquelético. En pacientes con resistencia a la insulina se presentan una disminución de la fosforilación oxidativa mitocondrial en el músculo esquelético y este defecto mitocondrial contribuye al aumento del contenido de grasa intramiocelular; perpetuándose así las alteraciones del metabolismo de glucosa en el músculo esquelético [Abdul-Ghani y DeFronzo, 2010].

También se consideran dentro de los mecanismos fisiopatológicos de la DT2 a la inflamación. A este respecto se ha observado el incremento de algunas citosinas proinflamatorias entre las que destacan la IL-16 (interleucina-16) y el TNF α (factor de necrosis tumoral). Esta condición es causa de daño tisular así como de insulinoresistencia [Pickup y cols., 1997; Nilsson y cols., 1998; Miranda y cols., 2008]. Algunos estudios han logrado determinar que la inflamación en algunos pacientes es una condición que preexiste antes de que la glucosa se eleve; de tal forma que este estado inflamatorio es la causa del desarrollo de diabetes [Shmidt y cols., 1999; Freeman y cols., 2002]. En la figura 5 se enlistan las alteraciones fisiopatológicas de la DT2.

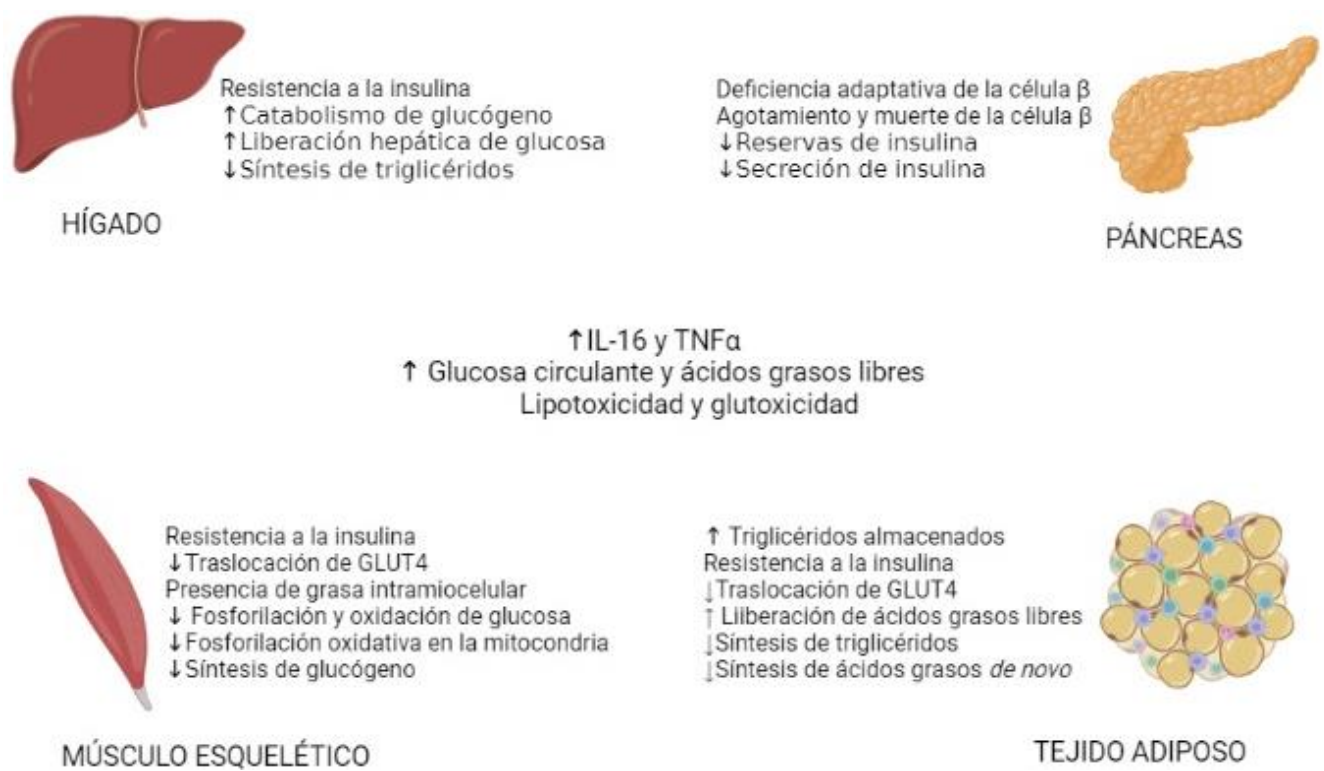


Figura 5. Alteraciones fisiopatológicas de la DT2. La DT2 puede deberse a diferentes mecanismos que se presentan en órganos o tejidos importantes para el metabolismo de la glucosa. La característica principal de la DT2 es la resistencia a la insulina que se manifiesta como una disminución de la acción de esta hormona en sus tejidos blanco. Adicionalmente, el páncreas no secreta la suficiente insulina para suplir esta deficiencia. Lo anterior se traduce fisiológicamente en un aumento persistente de los niveles circulantes de glucosa y de ácidos grasos libres. El aumento tanto de glucosa como de lípidos en el citosol de las células perpetúa la resistencia a la insulina y puede en el largo plazo conducir a efectos tóxicos y muerte de la célula β pancreática. Por otro lado, en algunos pacientes el aumento de citosinas proinflamatorias puede contribuir al daño tisular y la resistencia a la insulina. En la figura se enlistan las alteraciones que pueden presentarse en los diferentes órganos y tejidos bajo estas condiciones. La imagen fue realizada en el sitio *Biorender.com*

2.7 Análisis de mediación

En estadística, el modelo de mediación permite identificar y explicar los mecanismos o procesos que subyacen en la relación observada entre una variable independiente y una variable dependiente a través de una tercer variable hipotética, a la que se le conoce como mediador (también variable mediadora, variable intermediaria, o variable intermediadora). Antes que una relación causal directa entre la variable independiente y la variable dependiente, el modelo de mediación propone que la variable independiente influencia al mediador logrando de esta manera modificar la variable dependiente. De esta forma el mediador sirve para esclarecer la naturaleza de la relación entre la variable dependiente y la variable independiente. En otros términos, se puede entender la mediación como los efectos indirectos de una variable independiente sobre la variable dependiente que son transmitidos por la variable mediadora. La magnitud del efecto indirecto indica la proporción de la mediación a través de las variables mediadoras relevantes [Mackinnon, 2008].

De acuerdo con Mackinnon, 2008, existen tres posibilidades de combinación entre los efectos directos e indirectos de la variable independiente sobre la variable dependiente. En el caso que sólo se observen efectos indirectos de la variable independiente sobre la variable dependiente, se dice que la mediación es completa, en cambio si se observan tanto efectos directos como efectos indirectos sobre la variable dependiente se considera un mediación parcial, en el último caso si sólo se observa un efecto directo de la variable independiente sobre la variable dependiente se considera que no existe mediación. La mediación parcial sostiene que la variable mediadora explica algunas, pero no todas, las relaciones entre la variable independiente y la variable dependiente. Esto implica que no solo existe una relación significativa entre el mediador y la variable dependiente, sino también alguna relación directa entre la variable independiente y la dependiente.

Tal como lo expone Mackinnon un análisis de mediación tiene en cuenta las siguientes consideraciones

Paso 1: Se analiza que la variable independiente está correlacionada con la variable dependiente. En este análisis de regresión simple la variable independiente es el predictor y la variable dependiente es la variable resultado. En este paso se establece si existe un efecto que puede estar mediado. Es necesario controlar el análisis por la variable mediadora.

Paso 2: Analizar si la variable causal (independiente) está correlacionada con el mediador. En esta regresión simple la variable independiente es el predictor y la posible variable mediadora es el resultado. Este paso esencialmente implica analizar si la variable independiente tiene un efecto en la posible variable mediadora.

Paso 3: Mostrar que el mediador afecta la variable dependiente. Se realiza un análisis de regresión simple en el que el mediador es ahora el predictor y la variable dependiente es el resultado. En este paso es necesario controlar el análisis por la variable independiente, y sólo ver el efecto del mediador en la variable dependiente, sin la influencia de la variable independiente.

Paso 4. Se analiza si el efecto de la variable independiente está influenciado por la variable mediadora. Se realiza un análisis de regresión múltiple, donde se incluyen la variable independiente y el mediador como predictores de la variable dependiente. Si el efecto de la variable independiente sobre la variable dependiente desaparece por completo en este último análisis, se considera que el efecto de la variable independiente sobre la variable dependiente es posible solo a través del mediador y por lo tanto la mediación es completa (en otras palabras, no hay efectos directos de la variable independiente sobre la variable dependiente). En cambio, si en este análisis el efecto de la variable independiente sobre la variable dependiente sigue siendo significativo pero de una magnitud menor a la de la ecuación del paso 1, entonces se considera una mediación parcial, ya que existen efectos tanto directos como indirectos de la variable independiente que predicen el comportamiento de la variable dependiente [Mackinnon, 2008].

Si en cada uno de los tres primeros pasos hay correlación es muy probable que exista un efecto entre la variable independiente y la variable dependiente que está siendo mediado por una tercera variable. El cuarto paso permitirá definir si se trata de una mediación total y además en caso de no ser así, cuál es el porcentaje de mediación, es decir la varianza de la variable dependiente que es dada por la variable independiente y además es mediada por la variable mediadora [Baron y Kenny; 1986].

Para que se establezca una mediación total o parcial, la reducción en la varianza explicada por la variable independiente debe ser significativa y esto debe ser determinado por pruebas estadísticas como la prueba de Sobel y el bootstrap [Sobel, 1982]. El efecto de una variable independiente sobre la

variable dependiente puede volverse no significativo cuando se introduce el mediador simplemente porque se explica una cantidad trivial de varianza y no por una mediación verdadera. Por lo tanto, es imprescindible mostrar una reducción significativa en la varianza explicada por la variable independiente antes de afirmar la mediación total o parcial. Esto puede explicarse por la presencia de varias rutas de mediación que se cancelan entre sí y se vuelven notorias cuando se controla una de las variables. Esto implica que los términos mediación “parcial” y “completa” siempre deben interpretarse en relación con el conjunto de variables que están presentes en el modelo [Hayes y cols., 2009].

3. Planteamiento del problema

En un análisis inicial, en la búsqueda de variantes genéticas importantes para la modulación de los niveles de C-HDL secuenciamos el promotor del gen *LIPC* así como sus 9 exones en sujetos con C-HDL elevado y C-HDL bajo. Como resultado de este trabajo identificamos 5 variantes genéticas exclusivas del grupo con C-HDL alto (-480 C>T, -592 G>A, R135C, S289F y Q355R) y una variante común (-514 C>T) presente en ambos grupos. En un estudio realizado por otros investigadores la variante S289F se relacionó con deficiencia de enzima LH y la variante común -514 C>T se ha relacionado con niveles elevados de C-HDL y algunas dislipidemias en diferentes poblaciones. Por lo tanto, es probable que las variantes identificadas en nuestro estudio tengan un papel funcional importante en la modulación de los niveles de C-HDL en población mexicana así como algunas comorbilidades asociadas a dislipidemias. De estas 6 variantes en total 4 de ellas no han sido caracterizadas en trabajos previos. Adicionalmente, la variante R135C pudiera ser una variante exclusiva de poblaciones amerindias. Lo anterior justifica realizar una caracterización funcional de estas variantes 6 variantes en nuestra población.

4. Hipótesis

Las variantes alélicas -480 C>T, -514 C>T, -592 G>A, R135C, S289F y Q355R del gen *LIPC* modulan los niveles del colesterol HDL en población general y se relacionan con comorbilidades asociadas a dislipidemias.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto funcional *in vivo* e *in vitro* de las variantes del gen de la *LIPC* identificadas

5.1 Objetivos particulares

- 1) Evaluar el papel de cada una de las variantes en la modulación de los niveles plasmáticos de las HDL en población mexicana.
- 2) Analizar si estas variantes se relacionan con el desarrollo de obesidad central, diabetes o alguna otra dislipidemia.
- 3) Determinar el efecto *in silico* e *in vitro* de las variantes.

6. Sujetos de estudio y métodos

El proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y se ajusta a las pautas éticas de la Declaración de Helsinki de 1975 [Carlson y cols., 2004]. Se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los participantes (En el anexo 1 se encuentra en consentimiento que se utilizó).

6.1 Frecuencia de cada uno de los alelos en sujetos de la población abierta.

Considerando que *a priori* no se conocen las frecuencias alélicas de estas variantes en la población general; se secuenciaron 50 individuos de población abierta. Esto nos permitió inferir cuales de estas variantes son mutaciones y cuales son variantes comunes en la población mexicana. Las variantes con una frecuencia $\leq 5\%$ se analizaron como posibles mutaciones en las familias portadoras. En contraparte las variantes con una frecuencia mayor a la anterior se analizaron como variantes comunes en sujetos de la población abierta. Las 6 variantes que no han sido estudiadas tienen una frecuencia $< 5\%$, por lo que se estudiaron como posibles mutaciones, en contraparte la variante -514 C>T fue estudiada como una variante común ya que su frecuencia supera el 40% en los controles secuenciados.

6.2 Sujetos seleccionados para el estudio de las variantes

6.2.1 Población seleccionada para el análisis del efecto de la variante -514 C>T

Se incluyeron en el estudio individuos mestizos mexicanos de entre 18 y 70 años (con padres y abuelos nacidos en México). Fueron reclutados en el INCMNSZ en la Ciudad de México. En esta muestra originalmente se estudiaron los determinantes genéticos de la hipertrigliceridemia o DT2 utilizando estrategias de estudio del genoma completo o GWAS (GWAS-TG y GWAS-DT2) [Weissglas y cols., 2013, SIGMA, 2014; Arellano y cols., 2019]. Un total de 2105 sujetos con datos antropométricos y las mediciones bioquímicas necesarias constituyeron la población analítica de este estudio.

Se realizó un cuestionario para recabar datos acerca de su estatus socioeconómico, historia médica familiar, uso de fármacos, así como consumo de alcohol y tabaco (Anexo 2). Mediante exploración física se determinaron las mediciones antropométricas usando técnicas estándar: el peso se registró cuando los sujetos vestían ropa ligera, usando balanzas digitales; la altura se determinó en estadiómetro fijo después que se les pidió a los participantes que retiraran los zapatos. La presión sanguínea se tomó usando un esfigmomanómetro de mercurio calibrado. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como el peso (en kg) dividido por la altura al cuadrado (en m²), y se evaluó la relación cintura-talla (ICT) dividiendo el tamaño de la cintura (en cm) entre la altura (en cm).

Se excluyeron aquellas personas que no firmaron el consentimiento informado, o que acudieron a la toma de muestra sin el ayuno previo, y también aquellas que decidieron no participar en el estudio.

6.2.2 Muestra seleccionada para el análisis del efecto de las variantes identificadas como posibles mutaciones

Se analizó el mayor número posible de integrantes de cada una de las familias de los portadores de las variantes, teniendo especial interés en los familiares de primer grado. También se les aplicó un cuestionario para recabar datos, se les realizó exploración física y la toma de muestra sanguínea. Se excluyeron los familiares que no aceptaron participar en el estudio y aquellos menores de 15 años.

6.3 Parámetros bioquímicos y criterios utilizados para definir los fenotipos de los sujetos de estudio

Los individuos que aceptaron participar en el estudio acudieron con un ayuno de 8-12 horas y se les realizó una toma de muestra para determinar los perfiles bioquímicos. Estas mediciones se realizaron en el Departamento de Endocrinología del INCMNSZ usando para ello procedimientos comerciales estandarizados. La glucosa, el colesterol total, los triglicéridos y el colesterol HDL se determinaron por métodos enzimáticos. Los niveles séricos de C-LDL se calcularon utilizando la fórmula de Friedewald. Para los sujetos con triglicéridos > 400 mg/dL, no se calcularon los valores de C-LDL, ya que la ecuación de Friedewald no se puede utilizar de manera confiable con valores de TG tan altos [Friedewald y cols., 1972]. La concentración de insulina se midió por radioinmunoensayo.

6.4 Definición de algunos fenotipos y criterios diagnósticos

La diabetes mellitus se diagnosticó de acuerdo a los criterios de la American Diabetes Association [ADA, 2019]. En esta se considera que una persona es diabética cuando la glucosa en ayunas es > 126 mg/dL (7 mmol/L) o si existe un diagnóstico previo de diabetes. Se consideró Hipoalfalipoproteinemia (HA) cuando las mujeres tenían C-HDL < 45 mg/dL (1.16 mmol/L) y en los hombres C-HDL < 40 mg / dL (1.03 mmol/L). También se clasificó a los individuos hipertensos como aquellos con una presión diastólica \geq a 85 mmHg o una presión sistólica \geq a 130 mmHg [Alberti y cols., 2006].

6.5 Determinación de genotipos

6.5.1 Determinación de genotipos de la variante -514 C>T

Las muestras de sangre total para extracción de DNA se colocaron en tubos que contenían EDTA, el procedimiento se realizó utilizando el kit comercial QIAamp 96 DNA Blood kit. Las muestras de DNA fueron utilizadas para determinar cada uno de los genotipos por medio de Sondas TaqMan; la discriminación de los alelos se realizó en un equipo de tiempo real ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Al menos el 3% de los genotipos fueron corroborados por secuenciación automatizada.

6.5.2 Determinación de genotipos de las variantes identificadas como posibles mutaciones

La extracción del DNA se realizó con el mismo kit que en el punto 5.5.1, pero en este caso los genotipos fueron determinados por secuenciación capilar automatizada utilizando el kit DNA Sequencing BigDye Terminator v 3.0 de Applied Biosystems y el equipo de secuenciación de 16 capilares ABIPRISM modelo 3100 (Applied Biosystems).

6.6 Análisis del efecto funcional de las variantes *in vitro* e *in silico*

6.6.1 Variantes de la secuencia promotora

Para este análisis del efecto funcional *in vitro* se realizaron ensayos EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) y ensayos de gen reportero. Los análisis *in silico* así como EMSA se realizaron solo para las dos variantes que no existía evidencia de su efecto en ensayos funcionales *in vitro* (-480 C>T, y -592 G>A).

6.6.1.1 Análisis *in silico* para las variantes -480 C>T, y -592 G>A

Se realizó un análisis *in silico* para identificar posibles elementos de respuesta a factores de transcripción en las regiones donde se identificaron las variantes del promotor. Para este análisis se utilizaron los programas PATCH, Genomatix, y Alibaba 2.1. Para evitar resultados inespecíficos, se consideraron solo aquellos factores de transcripción cuyos elementos de respuesta consenso (core) tuvieran una similitud mayor al 85% con la secuencia del promotor del gen *LIPC*. Se realizó además una búsqueda bibliográfica para conocer si los factores de transcripción del resultado anterior se expresaban en hígado que es donde a su vez se expresa el gen *LIPC*.

6.6.1.2 Análisis del efecto funcional *in vitro* de las variantes de secuencia promotora

6.6.1.2.1 Ensayos EMSA de las variantes -480 C>T y -592 G>A

Se realizaron ensayos de retardo de movilidad electroforética o EMSA, para ello se extrajeron proteínas nucleares de 5×10^6 células de la línea celular HepG2. Las células que inicialmente se encontraban en cultivo se lavaron con PBS y se le mantuvieron en hielo, después se rasparon con gendarme y se recuperaron con 1 mL de PBS. Las células se lavaron y se obtuvo el agregado celular

para agregarle 100 μL de buffer hipotónico (HEPES y KCl 10 mM, MgCl_2 1.5 mM, suplementado con inhibidores de proteasa) y se dejaron en congelación 10 segundos. Se centrifugo a 3500 rpm por 10 min a 4°C . El sobrenadante o fracción citoplasmática se desechó. Se resuspendió la fracción nuclear en 50 μL de buffer hipertónico (HEPES 20 mM, NaCl 400mM, MgCl_2 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, glicerol 25%, suplementado con inhibidores de proteasa) y se incubó 30 min en frio en un agitador giratorio. Se centrifugo a 13,000 rpm en microcentrifuga a 4°C durante 15 min. El sobrenadante que contenía las proteínas nucleares en forma nativa se guardó en ultracongelador (-70°C).

Los pares de oligonucleótidos que se utilizaron para este análisis se encuentran en la tabla 2. Se tomaron 20ng de cada oligonucleótido y su oligonucleótido complementario y se colocaron en un tubo eppendorf. La formación del DNA de doble cadena se favoreció al dar un ciclo de desnaturalización con un enfriamiento gradual hasta alcanzar la temperatura ambiente. El DNA de doble cadena se marcó con fosforo radiactivo (γ ^{32}P , ATP, 2.5 μCi) gracias a la enzima T4 cinasa (2.5 U).

La mezcla de reacción se realizó en presencia del buffer comercial de la enzima (1X) y se mantuvo a 37°C por 30 min. Después se inactivo la enzima a 65°C . Esta reacción y los siguientes procedimientos se realizaron usando los equipos de protección personal además de un etiquetado adecuado para evitar exponerse con la radiación γ del ^{32}P . Este procedimiento se realizó por separado para cada uno de los 4 pares de oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 2, después de esto las mezclas se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

Tabla 2. Pares de oligonucleótidos utilizados para los ensayos EMSA

Variante	cadena	alelo	SECUENCIA
-592 G>A	+	nativo	5' CACAGAGGGGGAAGAA ^G TGTGT3'
-592 G>A	-	nativo	5' ACACA ^C TTCTTCCCCCTCTGTG 3'
-592 G>A	+	mutado	5' CACAGAGGGGGAAGAA ^A TGTGT 3'
-592 G>A	-	mutado	5' ACACA ^T TTCTTCCCCCTCTGTG 3'
-480 C>T	+	nativo	5' ACCACACTTTGAC ^C ACAAGCAT 3'
-480 C>T	-	nativo	5' ATGCTTGT ^G GTCAAAGTGTGGT 3'
-480 C>T	+	mutado	5' ACCACACTTTGAC ^T ACAAGCAT 3'
-480 C>T	-	mutado	5' ATGCTTGT ^A GTCAAAGTGTGGT 3'

Un total 500 pg de la mezcla de oligonucleótidos marcados se mezclaron con 5 o 10 µg de proteínas nucleares en presencia de HEPES 2.4 mM, KCl 5.9mM mM, EDTA 0.02mM, DTT 0.06mM, glicerol al 2.35%, así como 10 µg de albumina y 1 µg de polidC. La mezcla se incubo a temperatura ambiente por 20 min para favorecer las interacciones DNA proteína. Los complejos DNA-proteína se separaron en un gel nativo de poliacrilamida al 5%; se usó el amortiguador TBE 0.5X y un voltaje ajustado a 100V por 2 horas. Las imágenes de los complejos fueron escaneados en el equipo Typhoon de Amersham (Figura 6).

Figura. Proceso para los ensayos tipo EMSA

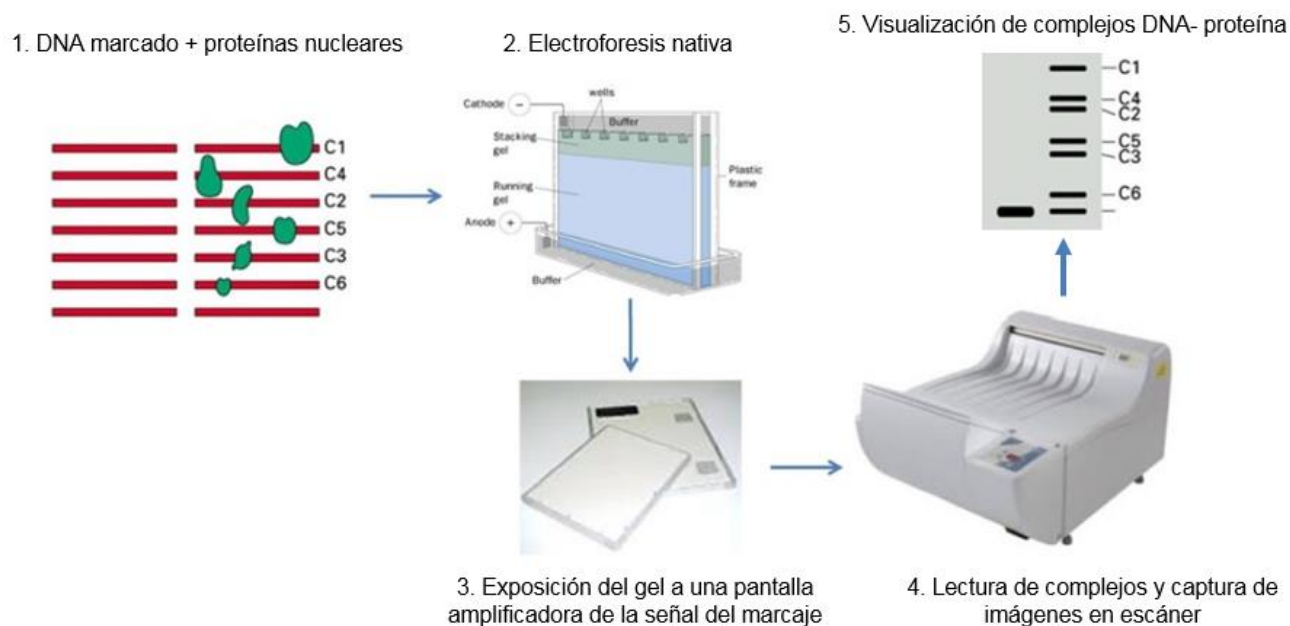


Figura 6. Procedimiento para realizar los ensayos EMSA y analizar las interacciones DNA-proteína; imagen modificada de <https://www.creativebiomart.net/resource/principle-protocol-protein-interaction-2-principle-and-protocol-of-emsa-359.htm>.

6.6.1.2.2 Ensayos de gen reportero para las variantes -480 C>T, -514 C>T y -592 G>A

Para los análisis de gen reportero se construyeron los vectores utilizando como base el plásmido pGL3-Basic (Figura 7) que codifica la luciferasa de luciérnaga (Promega, EE. UU.). Se amplificó por PCR la secuencia promotora del gen *LIPC* desde el nucleótido -639 a + 29; para ello se utilizaron dos oligonucleótidos que agregaban un sitio de restricción al fragmento de PCR para las enzimas KpI y HindIII (-639 KpI TCATGGTACCCAGTCCTCTACAC AGCTGGAAC y +29 HidIII TAGTAAGCTTCGGGGTCCAGGCTTTCTTGG. Este fragmento posteriormente se ligó al plásmido utilizando la enzima ligasa T4 de Promega [Deep, 2000]. De esta forma se logró que el promotor *LIPC* controlara la expresión del reportero luciferasa. Las variantes alélicas: -480 C>T, -514 C>T y -592 G>A se generaron por mutagénesis dirigida usando la enzima de alta fidelidad Phusion High-Fidelity DNA Polymerase y ProofStart DNA Polymerase (QIAGEN).

Las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran en la Tabla 3. Los plásmidos mutados se verificaron mediante secuenciación directa. Para este ensayo se transfectaron células HepG2 ya que estas son derivadas de una línea de hepatoma y por lo tanto expresan factores de

transcripción necesarios para la expresión de genes hepáticos. Las células HepG2 en el pasaje 20-35 (AddexBio, CA, EE. UU.) se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) equilibrado con 5% de CO₂ y 95% de aire. El medio se complementó con suero fetal de ternera al 15% (previamente inactivado con calor), L-glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich) y penicilina al 1% (Sigma-Aldrich).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para generar las variantes del promotor del gen *LIPC*

Variante	cadena	secuencia
-480 C>T	+	5' GCACCACACTTTGACTTACAAGCATCACCAA 3'
-480 C>T	-	5' TTGGTGATGCTTGTAGTCAAAGTGTGGTGC 3'
-514 C>T	+	5' GTCAGCTCCTTTTGACATGGGGGTGAAGGG 3'
-514 C>T	-	5' CCCTTCACCCCCATGTCAAAAGGAGCTGAC 3'
-592 G>A	+	5'GAGGGGGAAGAAATGTGTTTACTCTAGG 3'
-592 G>A	-	5'CCTAGAGTAAACACATTTCTTCCCCCTC 3'

Para la transfección se sembraron 3×10^5 células en placas de 6 pocillos en medio sin antibióticos y se cultivaron hasta una confluencia del 70-80%, luego se cotransfectaron por separado cada una de las construcciones que contenía el alelo con una de las variantes y el plásmido pRL-TK (Figura 7) que expresa la luciferasa de la renilla como control interno (Promega, EE. UU.) Las transfecciones fueron transitorias usando los lípidos catiónicos de la lipofectamina 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La mezcla de los lípidos catiónicos y 1,5 μ g de DNA se preparó en medio Opti-MEM I Reduced Serum Media (Thermo Fisher Scientific). Se completó el volumen a 1mL y se dejó la mezcla de transfección por 6 horas después de las cuales se les colocó a las células medio DMEM suplementado (figura 10).

Después de 24 horas de la transfección, las células se lisaron y se analizó la actividad de luciferasa (unidades de luz) gracias al ensayo Dual Luciferasa Assay System (Promega, EE. UU, Figura 8) Se midieron las unidades de luz en intervalos de 0.5 segundos por pozo usando un luminómetro BD Monolight 3010C (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) Los resultados se calcularon como la relación de la actividad luciferasa de luciérnaga sobre la actividad luciferasa de renilla y se expresaron como porcentajes de actividad promotora considerando el vector con el

promotor nativo. Los ensayos se realizaron en tres experimentos independientes cada uno por triplicado.

Figura. Vectores utilizados para el estudio de las variantes del promotor

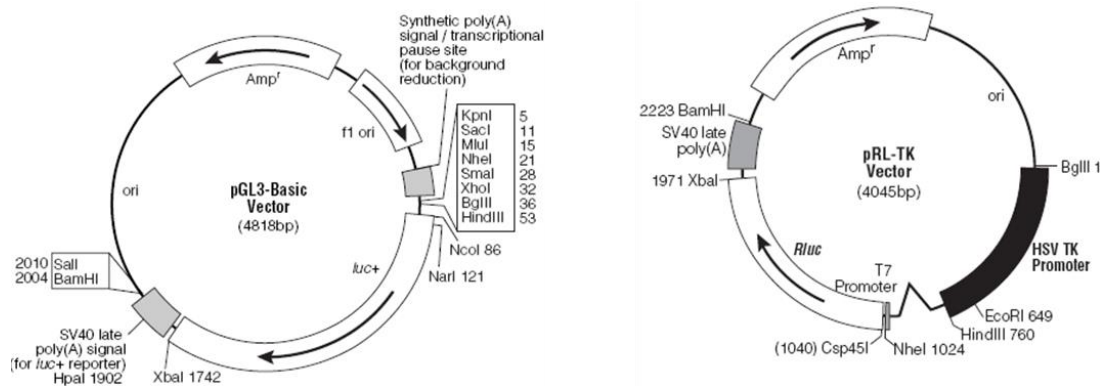


Figura 7. El vector PGL3-Basic expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga, el promotor del gen *LIPC* fue clonado en este vector para analizar su actividad en presencia de las variantes. El vector pRL-TK se utilizó para ajustar los ensayos de acuerdo con la eficiencia de transfección.

Figura. Ensayos de gen reportero mediante el plásmido que expresa el gen de luciferasa

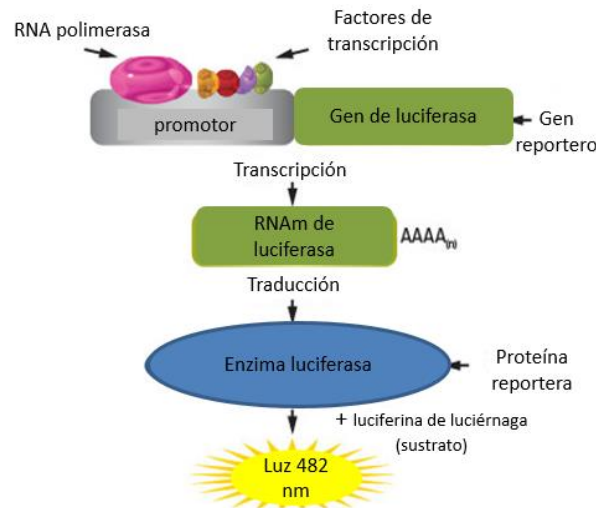


Figura 8. La medición del gen reportero se realizó en células transfectadas transitoriamente que expresaban el gen reportero de la luciferasa, que en contacto con su sustrato resulto en la emisión de luz, que se logró medir en un luminómetro. Se utilizó como control interno el gen de la renilla.

6.6.2 Variantes en secuencia codificante

Para el análisis del efecto funcional *in vitro* de las variantes se transfectaron células HEK-293T con un plásmido que genera la proteína LH fusionada a la GFP (LH-GFP). Los análisis *in silico* consistieron

en un modelado por homología, estos se realizaron solo para las dos variantes que no existía evidencia de su efecto en ensayos funcionales *in vitro* (R135C, y Q355R).

6.6.2.1 Análisis *in silico* para las variantes R135C y Q355R

Se realizó un análisis *in silico* de modelado por homología ya que no se conoce la estructura tridimensional de la proteína LH. Para este análisis se utilizó el programa MODELLER que es una herramienta computacional que permite a partir de la secuencia primaria de aminoácidos generar un modelo tridimensional de la proteína [Sali y Blundell, 1993; Fiser y Sali, 2000].

El primer paso es generar una secuencia templado a partir de un alineamiento múltiple de secuencias homólogas a la secuencia de interés. Para evitar resultados de baja calidad sólo se consideraron secuencias con una identidad $\geq 70\%$ con la secuencia primaria de aminoácidos de LH. A partir de este templado se buscó en la base del banco PDB (Protein Data Bank) estructuras tridimensionales que tuvieran homología con el templado y gracias a esto se generó el modelo tridimensional (3D) de la proteína LH. Para ser rigurosos en este modelado sólo se consideraron estructuras cuya cristalografía de Rayos X tuvieran una resolución $\leq 0.5 \text{ \AA}$ (Figura 9). Se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar si estas variantes se encontraban en algún dominio funcional de interés.

Figura. Flujo de trabajo para el análisis *in silico* de las variantes R135C y Q355R

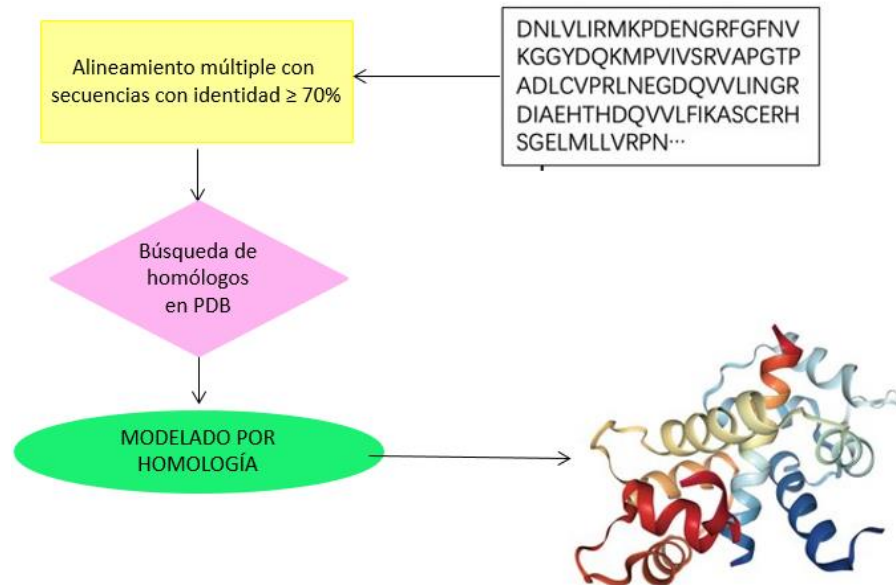


Figura 9. A partir de la secuencia primaria de aa de la LH se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con una similitud mayor al 70%; a partir de este y conociendo las estructuras tridimensionales de homólogos a estas secuencias se modeló la posible estructura de la LH gracias al programa MODELLER, Las mutaciones fueron sustituidas por separado en la secuencia nativa de LH para conocer el efecto en la estructura tridimensional.

6.6.2.2 Análisis del efecto funcional *in vitro* de las variantes de secuencia codificante

Para los ensayos *in vitro* de las variantes de secuencia codificante se utilizó el plásmido pReceiver M03-LH (GeneCopoeia) el cual expresa el gen *LIPC* bajo el control del promotor de citomegalovirus. El producto de este gen genera la proteína LH fusionada a la proteína verde fluorescente (LH-GFP). La autenticidad del inserto comercial fue verificada por análisis de restricción y secuenciación directa. A partir de este vector original se construyeron las clonas mutantes de proteína LH: R135C, S289F y Q355R. La técnica utilizada fue mutagénesis sitio dirigida, el proceso fue el mismo que en el punto 5.6.1.2.2, y las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para generar las variantes de secuencia codificante del gen *LIPC*

Variante	cadena	secuencia
R135C	+	5' CACCATCGCCGTC T GCAACACCCGCCTT 3'
R135C	-	5' AAGGCGGGTGT TGC A G ACGGCGATGGTG 3'
S289F	+	5' CTTTTCATCGACT T C T TTGCTGCACGCC 3'
S289F	-	5' GCGTGCAGCAAG A AGTCGATGAAAAG 3'
Q355R	+	5' TTATCATTAC C GTTAAAGATCCAGTTCATCAACC 3'
Q355R	-	5' GGTTGATGA A CTGGATCTTTAAC C GGTAATGATAA 3'

Los plásmidos recombinantes se verificaron mediante secuenciación directa. Se transfectaron las células renales embrionarias humanas HEK-293T ya que éstas no expresan el gen *LIPC*; además de que los genes bajo el control del promotor de citomegalovirus tienen una alta expresión en esta línea celular. Las células se cultivaron en las mismas condiciones y en el mismo medio que en el ensayo del punto 5.6.1.2.2. Para la transfección también se utilizaron los lípidos catiónicos, así como placas de 6 pocillos. Después de las 24 horas de la siembra una vez alcanzada la confluencia del 50-55% se transfectaron por separado cada una los vectores con una de las tres variantes, además del vector con la proteína nativa y el vector vacío (pReceiver M03). La proteína GFP nos permitió observar la localización celular de la LH en un microscopio confocal y además ajustar los estudios funcionales de acuerdo con la emisión de fluorescencia de las células pues esta estaba relacionada directamente con la eficiencia de transfección (Figura 11 y Figura 12).

Figura. Proceso para la transfección de las células utilizando lípidos catiónicos

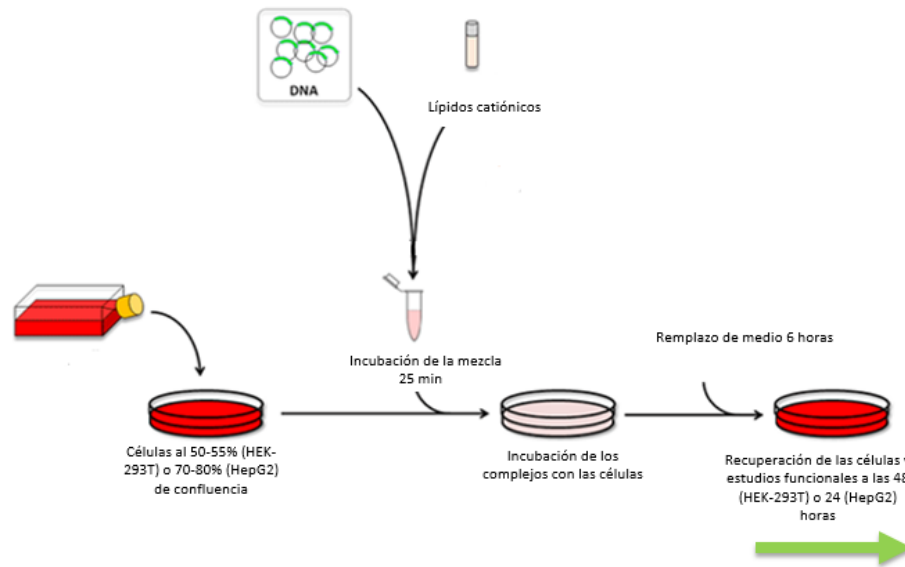


Figura 10. La transfección se realizó en células HepG2 para los ensayos de gen reportero que permitieron analizar el efecto de las variantes -480 C>T, -514 C>T y -592 G>A o en células HEK-293T para estudiar los efectos de las variantes R135C, S289F y Q355R.

Figura. Vector utilizado para el estudio de las variantes de secuencia codificante

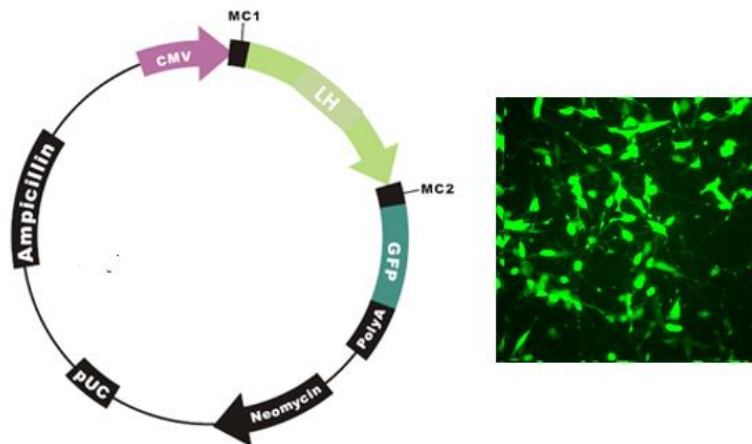


Figura 11. Este plásmido contiene un promotor viral que permite la sobre-expresión de la proteína LH en células de mamífero, la proteína LH está fusionada a la proteína GFP (LH-GFP) esto permitió la observación de la proteína bajo microscopio así como los ensayos de secreción.

6.6.2.2.1 Ensayos de secreción de la proteína LH

Después de 6 horas de la transfección se les cambio a las células el medio por medio DMEM suplementado y se les dejó hasta completar 24 horas para su recuperación. Al término de esta incubación las células se despegaron y se sembraron en medio DMEM suplementado. Aproximadamente el 25% se reservaron para ensayos de citometría de flujo sembrándose en placas con el formato de 6 pocillos, el otro 75% (4.0×10^5 células) se sembró en otras placas del mismo formato para obtener proteínas de lisado celular y de sobrenadantes.

Estas proteínas se utilizaron para realizar dos ensayos: el ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) y el inmunoblot. En conjunto estos análisis nos permitieron estimar la proteína LH intracelular y en sobrenadantes; mientras que la citometría de flujo nos permitió realizar una cuantificación indirecta de la secreción de la proteína LH. Una mínima cantidad de células (1×10^4) se sembró por duplicado por cada ensayo al centro de un cubreobjetos redondo de 1cm de diámetro que se dejó sumergido en los pozos de una placa de 12 para analizarse en microscopio confocal. Todos y cada uno de los análisis se realizaron por triplicado y tres repeticiones.

6.6.2.2.1.1 Citometría de flujo

Las células reservadas para este ensayo se despegaron después de 48 horas de transfección y se lavaron con PBS a temperatura de 37°C, después se resuspendieron en 500 μ L de PBS. Se leyeron 10,000 células en un citómetro de flujo FACScan de Beckton Dickinson. La emisión de fluorescencia de la LH-GFP fue captada en el canal FL1 que es en donde emite esta proteína. Se les colocó a las células 20U/mL de heparina durante 20 minutos para promover la secreción de la proteína fusionada LH-GFP y las células se leyeron nuevamente en citómetro (Figura 12).

6.6.2.2.1.2 Microscopia confocal

Después de 48 horas de la transfección a las células adheridas al cubreobjetos se les cambio el medio por medio DMEM completo, uno de los dos cubreobjetos fue tratado con heparina 20U/mL por 20 minutos. Al cabo de este tiempo los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos usando el reactivo Fluorescence Mounting Medium de abcam. Este reactivo evita la deshidratación de la muestra y la

pérdida de fluorescencia. Se tomaron imágenes en escaneo usando en el Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM. (Figura 12).

6.6.2.2.2 Recuperación de sobrenadantes y lisado celular

Se les cambió el medio a las células reservadas para este ensayo conforme a la figura 12 y después de 36 horas de la transfección se les volvió a remplazar por 600µL de medio RPMI sin rojo de fenol y sin suero de ternera. A este medio se le añadieron antibióticos y 20U/mL de heparina. Después de 12 horas se recolectaron los sobrenadantes y se centrifugaron en microcentrifuga por 5 minutos a una velocidad de 5000 rpm y una temperatura de 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes libres de células y se guardaron a -70 °C para los ensayos de ELISA y el inmunoblot. Las células se despegaron de los pozos con 1mL de PBS frío usando un gendarme. Se centrifugaron por 5 minutos a 5000 rpm y una temperatura de 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 50 µL de NH₃/NH₄Cl 50 mM (pH 8,1). Las células se lisaron en frío mediante sonicación con 5 pulsos de 4 segundos. El lisado proteico se recuperó después de centrifugar a 15000 rpm durante 10 min y una temperatura de 4°C. Este lisado se guardó a -70°C para su posterior análisis de ELISA y el inmunoblot (Figura 12).

6.6.2.2.2.1 Ensayos ELISA

Esta técnica nos permitió la cuantificación de la proteína en sobrenadantes y en los lisados intracelulares para esto se utilizó el kit Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit de USCN. Se preparó la curva patrón con un estándar de concentraciones entre los 200 ng/mL y 3.12 ng/mL. Se descongelaron las muestras y se cuantificaron, se diluyeron aquellas muestras que no estuvieron en el rango dinámico de la curva patrón.

El ensayo consistió en una serie de incubaciones a 37°C en las que las muestras y el estándar se colocaron en los pozos que contenían el anticuerpo primario adherido. Después el anticuerpo anti-LH de la fase móvil acoplado a biotina se unió en proporción a la cantidad de LH presente en las muestras. Se lavaron los pozos y se pusieron en contacto con la primera solución de revelado que contenía avidina acoplada a peroxidasa de rábano; la avidina se unió gracias a la presencia de la biotina. Por último después de los lavados, se colocó una solución de TMB (tetrametil-benzidina) que es el sustrato

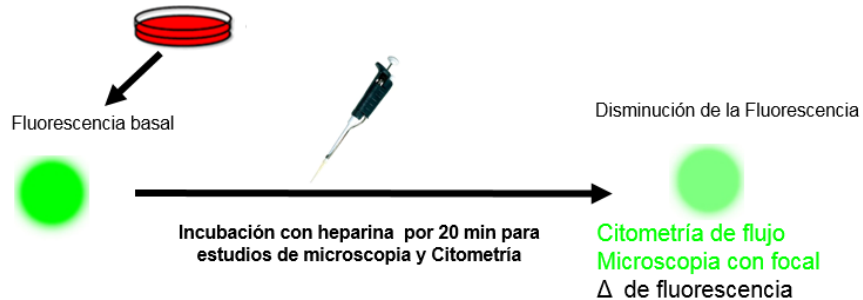
de la peroxidasa y que al transformarse produjo una molécula de color azul que se leyó a 450 nm. Los tiempos de lavados e incubaciones se realizaron conforme a las especificaciones del fabricante.

6.6.2.2.2 Inmunoblot

Se realizó un inmunoblot de extractos proteicos del lisado celular (2 μ g) y de los sobrenadantes (40 μ L) de células HEK293T transfectadas. La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% separado por 2.5 horas a 120 Volts. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF durante 12 horas a 50 volts y una temperatura de 4°C. El bloqueo se realizó por 1 hora con TBS-Tween (0.1%) y 5% de leche. El anticuerpo primario monoclonal anti-LH (Santa Cruz) se diluyó 1:2,000 y se incubó 4 horas en TBS-Tween más 3% de albúmina. El anticuerpo secundario anti IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz), se incubó por una hora y se preparó en una dilución 1:15,000 en TBS-Tween más 5% de leche. La membrana PVDF se puso en contacto con los reactivos GE Healthcare Amersham™ ECL Select los cuales mediante reacciones acopladas generan quimioluminiscencia en presencia de la peroxidasa de rábano. Para el revelado se utilizó una placa radiográfica, el revelador y el fijador de marca Kodak; esto permitió evidenciar la presencia de la proteína LH.

Figura. Diagrama de los ensayos para los estudios *in vitro* de las variantes de secuencia codificante R135C, S289F y Q355R del gen *LIPC*.

1. CELULAS COMPLETAS



2. ENSAYOS CON LA PROTEÍNA LH

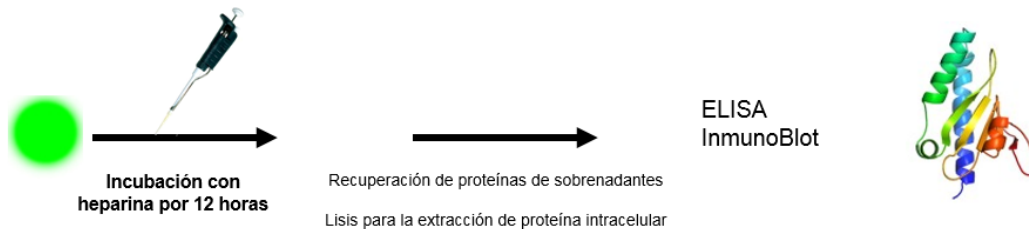


Figura 12. Para estos ensayos *in vitro* de las mutaciones R135C, S289F y Q355R se estudiaron células completas transfectadas con los vectores que producían las proteínas mutadas o los extractos proteicos de lisados celulares y los sobrenadantes de estas.

6.7 Análisis Estadístico

6.7.1 Análisis del efecto de la variante -514 C>T sobre los parámetros bioquímicos

Las variables cuantitativas (ejemplo C-HDL, glucosa plasmática, IMC, etc) fueron expresadas como medias y rango intercuartil (RIQ). Las variables categóricas (DT2, hipertensión y género) fueron expresadas como porcentajes. Para realizar comparaciones entre dos o tres grupos se realizaron prueba de T de Student o U de Mann–Whitney así como ANOVA o prueba de Kruskal–Wallis de acuerdo a lo que corresponde. Se utilizó el método post hoc de Dunn–Bonferroni para analizar diferencias significativas en comparaciones múltiples. La prueba de Chi cuadrada se usó para realizar comparación de variables nominales en análisis bivariados. El Equilibrio de Hardy-Weinberg fue determinado gracias a una prueba de Chi cuadrada en los controles no diabéticos. En todos los análisis donde se incluyó el polimorfismo -514 C>T se consideró un modelo genético aditivo.

6.7.1.1 Modelo de Mediación para evaluar el efecto de la variante -514 C>T

Para evaluar los efectos directos e indirectos entre la variable genética – 514 C>T y la DT2 se realizó un análisis de mediación utilizando el programa Mplus v.8.3 [Muthén y Muthén, 2017]. El análisis de mediación ya ha sido utilizado para evaluar el papel de variantes genéticas en rasgos metabólicos [Raghavan y cols., 2015; Singh y cols., 2015; Ochoa y cols., 2020]. Previo al análisis se realizó la transformación de los niveles de C-HDL a valores de su logaritmo (Log C-HDL) para considerarse como variable mediadora. También se incluyó el análisis del IMC como variable mediadora entre el polimorfismo -514 C>T y la DT2 o los niveles de C-HDL como posibles desenlaces. Todos los modelos fueron ajustados por las variables de ancestría, la edad, el género y el IMC. Los niveles de triglicéridos no fueron considerados como variable de ajuste independiente ya que en los modelos los triglicéridos y el IMC tenían una alta correlación. El genotipo se incluyó en un modelo genético aditivo ya que para esta variante ha mostrado ser el más adecuado.

También se removieron las rutas que no fueron significativas del modelo final. El C-HDL fue introducido al análisis como una variable cuantitativa y no como variable dicotómica por lo fue necesario realizar el enfoque ponderado por prevalencia sugerido por Venderweele y Vansteelandt [Vanderweele y Vansteelandt, 2010]. Debido al resultado binario, se utilizó una parametrización delta en la estimación de los parámetros. La bondad de ajuste de los modelos finales se evaluó mediante índices como el resumen estandarizado de los residuos de covarianza promedio [error cuadrático medio de aproximación (RMSEA, root mean square error of approximation)], el índice de ajuste comparativo (CFI, Comparative fit index) y el índice de Tucker-Lewis (TLI, Tucker–Lewis index).

6.7.1.2 Corrección de los análisis por estratificación de ancestría

Todos los participantes seleccionados para el estudio de la variante -514 C>T del gen *LIPC* habían participado previamente en alguno de dos estudios del genoma completo para analizar genes relacionados con la hipertrigliceridemia (GWAS-TG) o con el riesgo a la DT2 (GWAS-DT2). Por lo tanto para el ajuste de ancestría se consideró un índice basado en el primer componente principal de los estudios GWAS. Esto gracias a que en un modelo de regresión lineal la correlación del primer componente principal de los dos estudios GWAS fue del 0.83, además de que la correlación del primer componente principal del GWAS-DT2 con el porcentaje de ancestría nativa americana fue del 0.91.

Esto nos permitió una adecuada discriminación entre la ancestría americana y europea utilizando un solo índice de etnicidad. Para los participantes que solo tenían datos del GWAS-TG los valores del primer componente principal del GWAS-DT2 fueron imputados.

6.7.2 Análisis del efecto de las variantes que posiblemente son mutaciones sobre los parámetros bioquímicos

Se realizó una prueba de asociación intrafamiliar mediante una U de Mann-whitney se analizó si existen diferencias significativas entre los individuos que presenten las variantes y los no portadores. Esto nos permitió conocer el patrón de segregación de la posible mutación.

6.7.3 Determinación del efecto funcional *in vitro* de las variantes

6.7.3.1 Variantes de promotor

Las actividades de luciferasa leídas por el luminómetro en unidades relativas de luz se normalizarán de acuerdo a la eficiencia de transfección. Esto se realizó dividiendo cada actividad de luciferasa de luciérnaga entre la correspondiente actividad de luciferasa de renilla. Se consideró un 100% de actividad para el promotor nativo (sin ninguna de las variante) y de esta forma se expresó el porcentaje de actividad de cada una de las variantes. Se determinó si existen diferencias significativas en la actividad del promotor para las variantes -514 C>T, -480 C>T, -592 G> al comparadas con la actividad del promotor nativo mediante una prueba de ANOVA y se utilizó la prueba de Dunn-Bonferroni para el análisis pos hoc y cálculo de la p para las comparaciones de cada variante con el promotor nativo ($\alpha=0.05$).

6.7.3. Variantes de secuencia codificante

También en el caso de las variantes de la secuencia codificante se realizó la normalización de los experimentos de acuerdo a la eficiencia de transfección; y se determinó si existen diferencias significativas entre la cantidad de enzima secretada, e intracelular mediante diferentes métodos

experimentales. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron las mismas que en el caso de las variantes de promotor. También se hicieron las comparaciones de las proteínas mutantes con respecto a la proteína nativa, y se realizó el cálculo de la p para saber si las diferencias eran estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$).

Para obtener la eficiencia de transfección de las células, se registró el porcentaje basal de células fluorescentes de cada una de las transfecciones (LH nativa o LH con las mutaciones), este dato se multiplicó por la media de fluorescencia de su correspondiente población celular. El dato resultante se registró como índice de fluorescencia basal y fue el que se utilizó para ajustar los ensayos de acuerdo con la eficiencia de transfección.

Para el análisis de secreción por medio de citometría de flujo, una vez registrado el índice de fluorescencia basal se les colocó a las células 20U/mL de heparina durante 20 minutos para promover la secreción de la proteína fusionada LH-GFP. Se calculó el índice de fluorescencia después del estímulo. El porcentaje de secreción de la proteína LH se calculó como la diferencia entre el índice de fluorescencia inicial menos el índice de fluorescencia después del estímulo con heparina, dividido todo entre el índice de fluorescencia inicial. En este caso no fue necesario realizar un ajuste adicional de los valores por eficiencia de transfección.

7. Resultados

7.1 La variante -514 C>T incrementa los niveles de C-HDL e indirectamente disminuye el riesgo de desarrollar de DT2

Dado que la frecuencia de la variante -514 C>T en población general fue mayor al 5% esta se estudió en una cohorte de 2105 individuos para evidenciar sus posibles efectos. Los niveles de C-HDL fueron mayores entre los portadores del genotipo TT en comparación con los portadores del genotipo CC (concentraciones medias: 1,11 vs 1,06 mmol/L, $p < 0,027$, respectivamente). No se encontraron diferencias en otros lípidos entre los grupos. La glucosa en ayunas y la frecuencia de DT2 también fueron más altas en el grupo TT en comparación con los individuos CT y CC (5,1 vs 4,9 mmol/L, $p < 0,001$; 26.9%, 20% y 15.7%, $p < 0,001$, respectivamente, Tabla 5).

Para explicar las diferencias en la distribución de individuos con DT2 entre los genotipos se realizó un análisis de mediación para explorar el papel de la variante -514C> T sobre los niveles de C-HDL y su posible asociación con la DT2. En el análisis se consideró la edad, el sexo, la etnicidad y el IMC como variables independientes. Se encontró que la variante -514C>T está significativamente asociada a aumentar los niveles de C-HDL ($\beta = 0.03$; $p < 0,001$). Los niveles altos de C-HDL a su vez disminuyen el riesgo de desarrollar DT2 ($\beta = - 1,07$; $p < 0,001$). Por tanto, el efecto indirecto de la variante -514C>T protege contra el riesgo de DT2 al aumentar los niveles de C-HDL ($\beta = -0.03$; $p < 0,001$). [Figura 13 y tabla 6].

Además, las variables que afectan directamente el status de DT2 en nuestro modelo son la ancestría europea ($\beta = - 7,20$; $p < 0,001$), la edad ($\beta = 0,04$; $p < 0,001$), el sexo masculino ($\beta = - 0,15$; $p = 0,02$) y el C-HDL ($\beta = - 1,07$; $p < 0,001$). El C-HDL está afectado por otras variables: el IMC ($\beta = - 0.01$; $p < 0,001$), el sexo masculino ($\beta = - 0,19$; $p < 0,001$) y la ancestría europeo ($\beta = 0,67$; $p < 0,001$). En contraste, el IMC fue directamente influenciado por la ancestría europea ($\beta = - 7,61$; $p = 0,004$) y marginalmente por la variante -514C> T ($\beta = - 0,26$; $p = 0,06$). El papel del IMC como variable mediadora entre -514C> T y la DT2 no fue significativa ($p = 0,18$) ni entre -514C> T y el C-HDL ($p = 0,06$). La etnicidad fue la única variable con efectos significativos en todas las variables dependientes (DT2, C-HDL e IMC). Los resultados del estudio de la variante común -514 C>T del gen *LIPC* dieron origen a la publicación que es requisito para la obtención del grado y se encuentra en el anexo 4.

Figura. Representación gráfica de los efectos directos e indirectos entre el polimorfismo -514C>T *LIPC*, la DT2, el C-HDL, la edad, la etnicidad, el género y el IMC.

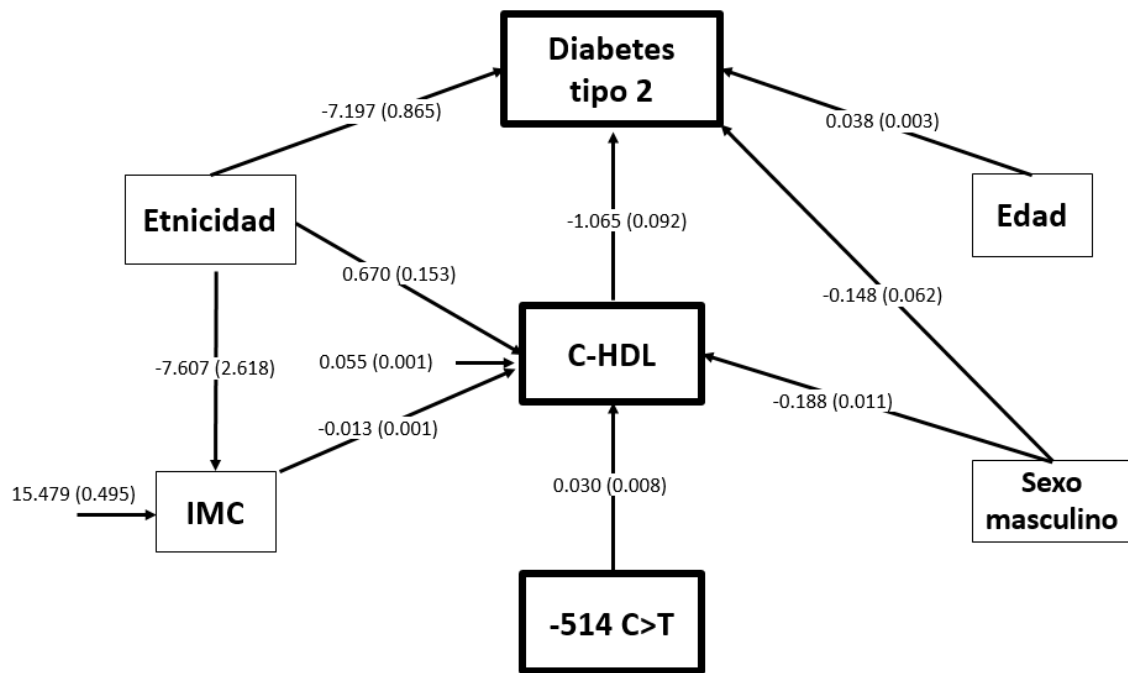


Figura 13. Modelo de mediación para explorar las relaciones entre el polimorfismo -514C>T del gen *LIPC*, la DT2, el C-HDL, la edad, la etnicidad, el sexo, y el IMC. Los valores en las flechas representan los valores del coeficiente beta no estandarizados y el error estándar que describen la relación entre las variables. El C-HDL actúa como un mediador a través del cual el polimorfismo -514 C>T ejerce sus efectos sobre el riesgo de DT2.

Tabla. Parámetros clínicos y bioquímicos de los participantes en estudio por genotipos del polimorfismo -514C>T del gen *LIPC*

Características	C/C (401)	C/T (943)	T/T (761)	valor p
Género masculino, n (%)	189 (47.1)	423 (44.9)	323 (42.4)	0.291
Edad (años)	48 (40-56)	48 (41-56)	48 (40-56)	0.591
C-Total (mmol/L)	5.3 (4.6-6.1)	5.3 (4.7-6.0)	5.4 (4.6-6.1)	0.861
C-HDL (mmol/L)	1.06 (0.91-1.24)	1.09 (0.93-1.29)	1.11 (0.93-1.32)	0.021^b
C-LDL (mmol/L)	3.1 (2.6-3.8)	3.2 (2.6-3.9)	3.1 (2.6-3.7)	0.228
Triglicéridos (mmol/L)	2.3 (1.3-3.2)	2.2 (1.3-3.2)	2.3 (1.4-3.1)	0.301
Glucosa en ayuno (mmol/L)	4.9 (4.5-5.4)	4.9 (4.5-5.5)	5.1 (4.6-5.9)	0.001^{c,d}
IMC (kg/m ²)	28.6 (26-31.2)	27.7 (25.3-30.7)	28 (25.5-30.9)	0.051
ICT	0.58 (0.53-0.62)	0.57 (0.53-0.62)	0.58 (0.53-0.62)	0.419
Presión sistólica (mmHg ^a)	120 (110-130)	120 (110-130)	120 (110-130)	0.349
Presión diastólica (mmHg ^a)	80 (70-82)	80 (70-82)	80 (70-80)	0.346
Hipertensión, n (%) ^a	110 (38.1)	223 (33.1)	180 (30.9)	0.109
Niveles normales de C-HDL, n (%)	197 (49.1)	453 (48.0)	402 (52.8)	0.135
DT2, n (%)	63 (15.7)	189 (20.0)	205 (26.9)	<0.001

Tabla 5. De cada parámetro o variable cuantitativa se muestran los valores de mediana y el Rango Intercuartil en paréntesis; de las variables nominales se muestra el número de sujetos que cumplen con el criterio y el porcentaje que representan entre paréntesis. C-total, colesterol total; C-HDL, colesterol HDL; C-LDL, colesterol LDL; IMC, Índice de masa corporal; ICT, Índice de cintura talla; DT2, diabetes tipo 2. Los Niveles normales de C-HDL fueron considerados en hombres con C-HDL ≥ 1.03 mmol/L y mujeres con un C-HDL ≥ 1.16 mmol/L. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar variables cuantitativas entre los tres grupos y el método post hoc Dunn-Bonferroni para realizar comparaciones múltiples. La prueba de Chi cuadrada se usó para realizar comparaciones de variables nominales entre los grupos. ^an=1545; ^bCC vs. TT, p=0.027; ^cCC vs. TT, p<0.001; ^dCC vs. CT, p=0.013. En letras negritas se muestran las variables que fueron estadísticamente diferentes entre los grupos.

Tabla. Efectos directos e indirectos entre el polimorfismo -514C>T del gen *LIPC*, la DT2, el C-HDL, la edad, la etnicidad, el género y el IMC.

Variables Dependiente	Independiente	Efectos Directos			Efectos Indirectos		
		Coefficiente beta estandarizado	Coefficiente beta no estandarizado (error estándar)	valor <i>p</i>	Coefficiente beta estandarizado	Coefficiente beta no estandarizado (error estándar)	valor <i>p</i>
DT2	Etnicidad	-0.232	-7.197 (0.865)	<0.001			
	Edad	0.352	0.038 (0.003)	<0.001			
	C-HDL	-0.246	-1.065 (0.092)	<0.001			
	Género	-0.066	-0.148 (0.062)	0.017			
	IMC	-0.043	-0.012 (0.007)	0.064			
	-514C>T	0.055	0.084 (0.045)	0.062			
					-514C>T-> C-HDL-> DT2	-0.021	-0.032 (0.009)
				-514C>T-> IMC -> C-HDL-> DT2	-0.002	-0.003 (0.002)	0.066
C-HDL	Etnicidad	0.094	0.670 (0.153)	<0.001			
	Género	-0.363	-0.188 (0.011)	<0.001			
	IMC	-0.194	-0.013 (0.001)	<0.001			
	-514C>T	0.094	0.030 (0.008)	<0.001			
IMC	Etnicidad	-0.069	-7.607 (2.618)	0.004			
	-514C>T	-0.047	-0.257 (0.136)	0.058			

Tabla 6. En esta tabla se enlistan las variables que tienen un efecto directo o indirecto sobre la DT2, el C-HDL o el IMC. El análisis de mediación se realizó considerando al polimorfismo -514C>T en un modelo genético aditivo. Se consideró que un efecto era significativo cuando el valor *p* <0.05. Los componentes principales de dos estudios GWAS se utilizaron para estimar la etnicidad, discriminando entre la ascendencia nativa Americana y la ascendencia Europea. En letras negritas se muestran las variables que tenían algún efecto estadísticamente significativo en los modelos. DT2, diabetes tipo 2; C-HDL; IMC, Índice de masa corporal.

7.2 La variante Q355R se comporta como una mutación de alta penetrancia que incrementa los niveles de C-HDL.

Dado que la frecuencia de las variantes exclusivas de grupo en la población general es menor al 3% se decidió estudiarlas como posibles mutaciones y se invitó a familiares de los portadores a participar en el estudio para identificar los patrones de segregación. Se genotificaron 2 familias con la variante Q355R (Figuras 14 y 15). Un total de 17 individuos entre ambas familias aceptaron participar en el estudio; de ellos 8 portaban la variante en forma heterocigota. Se lograron medir varios parámetros bioquímicos y antropométricos, se agruparon los individuos por genotipos AA y AG se calcularon las medias de cada grupo como se aprecian en la tabla 7.

Figura. Estructura de la familia AL que porta la variante Q355R del gen *LIPC*

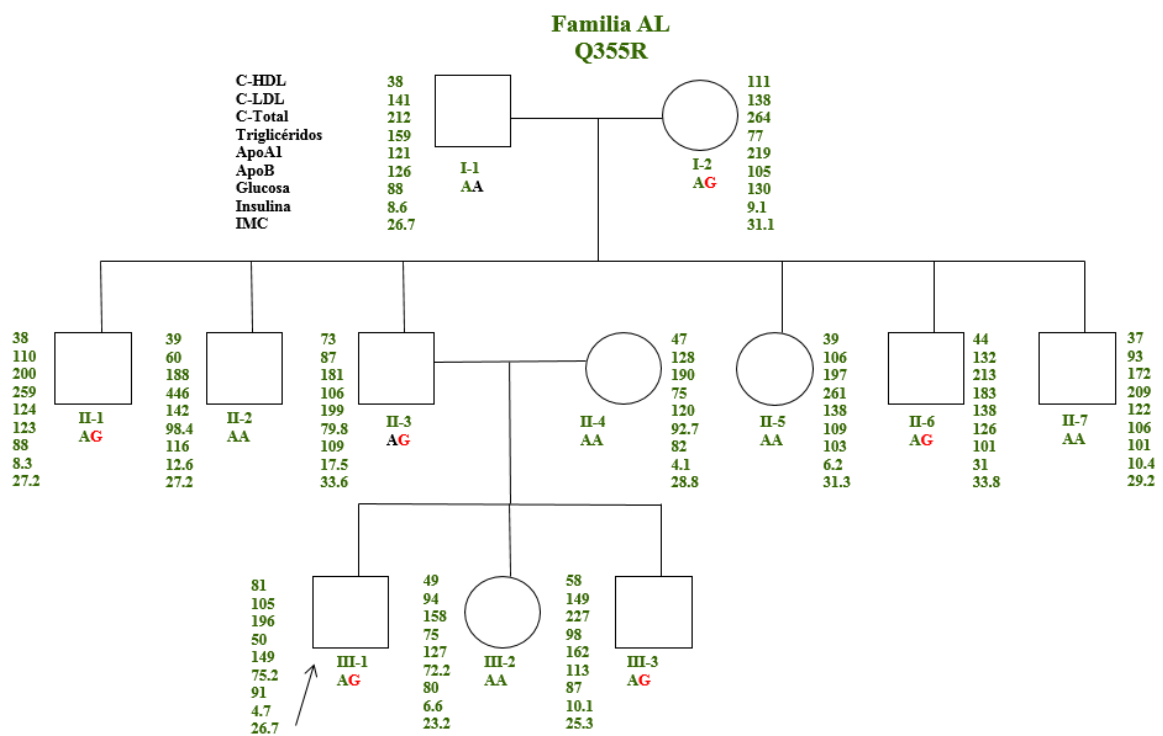


Figura 14. En esta familia los portadores del alelo R355 (nucleótido G) se encuentran en color rojo. El sujeto índice está indicado con una flecha, C-HDL, colesterol de alta densidad; C-LDL, colesterol de baja densidad; C-Total, colesterol total; ApoA1, apolipoproteína A1; ApoB, apolipoproteína B; IMC, índice de masa corporal. Las unidades de los lípidos, apolipoproteínas y glucosa se encuentran en mg/dL, las unidades de la insulina son $\mu\text{U}/\text{mL}$, y las del IMC, Kg/m^2 . Se logra apreciar un patrón de cosegregación de niveles elevados de C-HDL con el alelo G.

Figura 15. Estructura de la familia HG portadora de la variante Q355R del gen *LIPC*

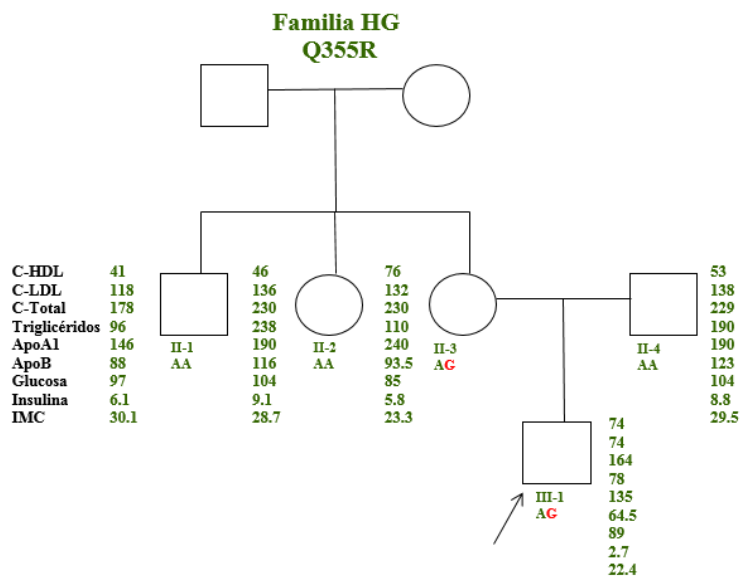


Tabla. Parámetros clínicos de los portadores de la variante Q355R por genotipos

Características	A/G (n=8)	AA (n=9)	valor <i>p</i>
C-Total (mg/dL)	206.5 (184.7-229.2)	190 (175.0-220.5)	0.321
C-HDL (mg/dL)	73.5 (47.1-79.7)	41 (38.5-48.0)	0.015
C-LDL (mg/dL)	121.0 (91.5-136.5)	118.0 (93.5-137.0)	0.888
Triglicéridos (mg/dL)	101.9 (77.2-161.1)	190.0 (84.8-242.2)	0.277
Glucosa en ayuno (mg/dL)	90.0 (87.2-107.0)	101.0 (85.0-104.0)	0.888
Insulina (μU/mL)	8.7 (4.9-15.2)	8.6 (6.1-9.7)	0.888
ApoA1(mg/dL)	155.4 (135.7-213.8)	138.0 (121.5-166.5)	0.114
ApoB (mg/dL)	99.2 (76.4-120.5)	106.0 (90.4-119.5)	0.673
IMC (kg/m ²)	26.9 (23.8-33.0)	28.8 (26.9-29.8)	0.743
Presión sistólica (mmHg)	125 (120-137.5)	140.0 (119.0-160.0)	0.321
Presión diastólica (mmHg)	80.0 (75-97.5)	82.0 (80.0-95.0)	0.606
Cintura (cm)	93.4 (84.0-111.5)	98.0 (92.5-110.5)	0.41
Cadera (cm)	102.5 (97.9-109.0)	105.0 (101.0-109.0)	0.815

Tabla 7. Considerando las dos familias se logra ver que los portadores de la variante tienen mayores niveles de C-HDL ($p=0.015$). Ningún otro parámetro fue significativo en la prueba de U de Mann Whitney. C-HDL, colesterol de alta densidad; C-LDL, colesterol de baja densidad; C-Total, colesterol total; ApoA1, apolipoproteína A1; ApoB, apolipoproteína B; IMC, índice de masa corporal. Las unidades de los lípidos, apolipoproteínas y glucosa se encuentran en mg/dL, las unidades de la insulina son μU/mL, y las del IMC, Kg/m².

Se realizaron pruebas de comparación no paramétricas mediante la U de Mann-Whitney de cada uno de los parámetros clínicos y bioquímicos diferenciando los grupos entre portadores y no portadores de la variante; se observó que los portadores de la variante presentan niveles elevados de C-HDL ($p = 0.015$). En estas familias la variante no se relacionó con otros rasgos metabólicos (Tabla 7 y figura 16). Esta variante parece comportarse como una mutación de alta penetrancia con un efecto importante en la modulación de los niveles séricos de C-HDL, ya que el C-HDL del grupo de portadores de la variante es 30 unidades mayor que los no portadores.

Figura. Gráfico que muestra la mediana de C-HDL de las familias con la Q355R agrupados por genotipos

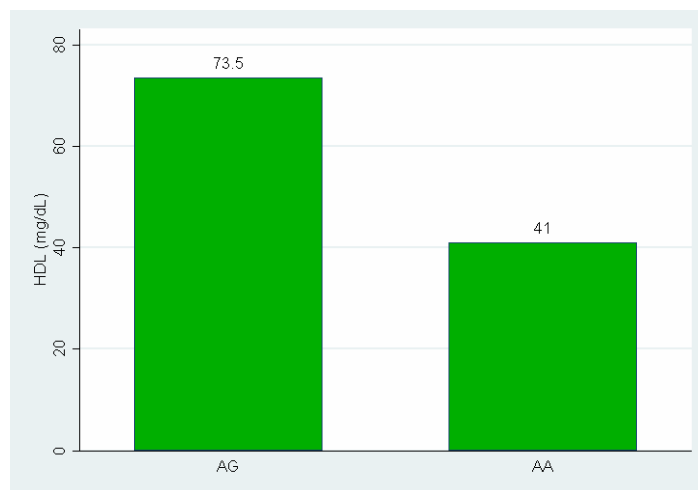


Figura 16. Valores de C-HDL (mg/dL) agrupados por genotipo AA o AG de la variante Q355R del gen de la *LIPC*. Los valores C-HDL son 30 unidades mayores en los portadores del alelo menor G de acuerdo con una prueba estadística U de Mann-Whitney ($p = 0.015$).

Se analizó una familia más con una de las variantes de promotor la -480 C>T; mediante estadística no paramétrica se observó que el alelo T de la variante en -480 muestra una tendencia a niveles elevados de C-HDL ($p = 0.0641$). Sin embargo, se debe considerar que el número de miembros con cada uno de los genotipos es muy pequeño, por lo que se debe invitar a otros familiares a participar en el estudio. No se observó asociación a otros rasgos metabólicos (Figura 17 y 18).

Figura. Estructura de la familia QM portadora de la variante -480 C>T del gen *LIPC*

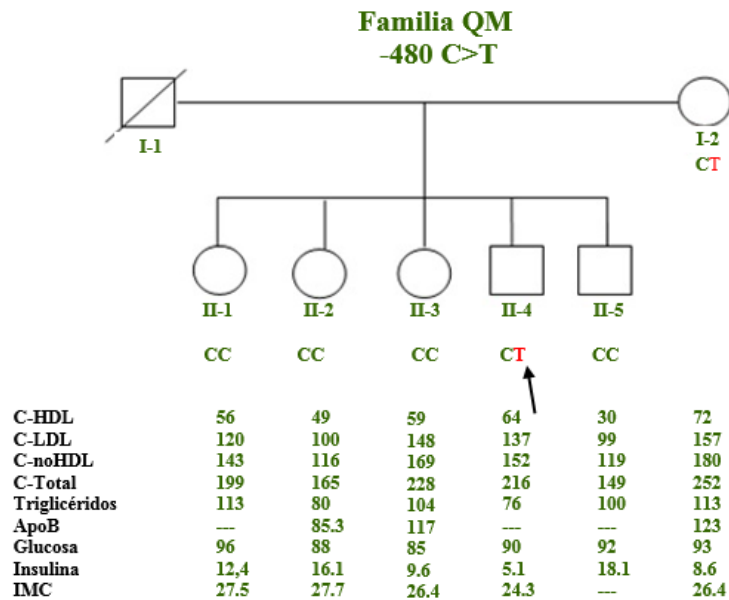
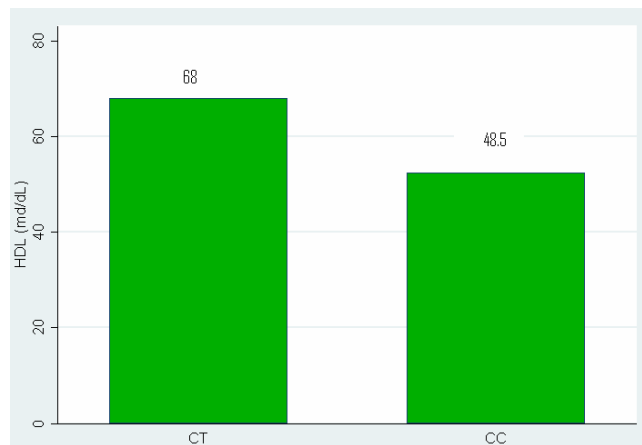


Figura 17. Los portadores de la variante -480 C>T tienen mayores niveles de C-HDL, debido al pequeño número de muestras esta diferencia no alcanzó significancia estadística ($p=0.0641$). Las unidades de los lípidos, apolipoproteínas y glucosa se encuentran en mg/dL, las unidades de la insulina son $\mu\text{U}/\text{mL}$, y las del IMC, Kg/m^2 . C-HDL, colesterol de alta densidad; C-LDL, colesterol de baja densidad; CnoHDL, es = C-Total - C-HDL; C-Total, colesterol total; ApoB, apolipoproteína B; IMC, índice de masa corporal.

Figura 18. Gráfico que muestra la mediana de C-HDL de la familia portadora de la variante -480 C>T agrupados por genotipos



7.3 Análisis del efecto funcional de las variantes *in vitro* e *in silico*

7.3.1 Mediante un análisis *in silico* se determinó que el alelo menor de las variantes -480 C>T y -592 G>A pueden modificar la unión de factores de transcripción

Se realizó un análisis *in silico* para identificar posibles elementos de respuesta en las secuencias donde se identificaron las variantes del promotor -592 G>A y -480 C>T. Se utilizaron los programas PATCH, Genomatix, y Alibaba 2.1 y se consideraron solo los elementos de respuestas con una similitud mayor al 85% con la secuencia del promotor del gen *LIPC*. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla. Elementos de respuesta identificados en el análisis *in silico*

Variante	Factor de transcripción	cadena	Similitud con el core	secuencia
-592 G>A	PU.1 (PATCH)	+	0.875	GGASGAAGT
-592 G>A	Proteína con dedos de zinc (Genomatix)	+	1.0	aggggAAGAagt
-480 C>T	RE (Alibaba 2.1)	+		Ctttgaccac
-480 C>T	RXR α , RAR $\alpha\beta$, RE α (PATCH)	+	1.0	TGACC

Tabla 8. Elementos de respuesta a los factores de transcripción identificados en las secuencias alrededor de la posición -592 y -480 del gen de la *LIPC*. Se consideraron solo aquellos elementos de respuesta en los que la presencia del alelo menor de la variante analizada interrumpiera la unión del factor de transcripción. Cadena, indica el sentido de la cadena (+, sentido 5' a 3'); Similitud con el core, indica el porcentaje de identidad del promotor del gen *LIPC* con la secuencia consenso del elemento de respuesta. En color rojo se encuentra la variante de interés.

Para la selección de estos factores de transcripción se consideraron solo aquellos en que los que la presencia del alelo menor de la variante analizada interrumpiera por completo su unión, además solo seleccionamos los factores de transcripción que se expresan en el hígado humano adulto, por lo cual potencialmente podrían estar modificando la expresión del gen *LIPC*. Tanto el factor de transcripción

PU.1 como la proteína con dedos de zinc humana podrían unirse a una secuencia que incluye el nucleótido en la posición -592. Se sabe que el PU.1 forma heterodímeros con C/EBP α y modifica la expresión de genes que participan en hematopoyesis, sin embargo, al igual que la proteína con dedos de zinc no se ha observado que incida en la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de lípidos [McKnight y cols., 1989].

De acuerdo con la predicción realizada con 2 programas bioinformáticos (AliBaba y PATCH), el receptor de estrógeno α (RE α) probablemente modifica la expresión del gen *LIPC*, a través de un elemento de respuesta que incluye el nucleótido C de la posición -480. El RE α modifica la expresión de genes que participan en el metabolismo de lípidos, incluyendo a la ApoA1 y el receptor de LDL (LDLR). Además modifica la expresión del gen *LIPC* a través de un elemento de respuesta ubicado entre los nucleótidos -1557 a -1175 (Parini y cols., 1997; Jones y cols., 2002; Rufibach y cols., 2006). Aunque la secuencia anterior incluye casi 400 nucleótidos y no se ha podido identificar la secuencia puntual se sabe que este receptor disminuye la expresión del gen *LIPC* de manera muy importante, no se descarta que otro elemento de respuesta se encuentre en la secuencia que indica el análisis *in silico*.

7.3.2 Los alelos menores de la variante -480 C>T y la variante -592 G>A disminuyen la unión de proteínas nucleares.

Para entender los efectos que pudieran tener las variantes -480 C>T, y -592 G>A en la expresión del gen *LIPC* se realizaron ensayos EMSA. Se usaron 5 y 10 μ g de proteínas nucleares de las células HepG2. Considerando los resultados *in silico* para el estudio de la variante -480 C>T se estimularon las células HepG2 con estradiol (E2) por 30' y 60' minutos y después se obtuvieron las proteínas nucleares. En la figura 19 los carriles 1 a 3 corresponden a una sonda de 22 nucleótidos con la secuencia del promotor del gen *LIPC* que incluyen alelo -480C y los carriles 4 a 6 corresponden a la sonda con el alelo T. La presencia de estradiol no parece tener ningún efecto en la modificación de los complejos, sin embargo, se puede observar que en los 3 carriles donde se encuentran la sonda con el alelo menor -480 T los complejos son menos abundantes que en la presencia del alelo -480 C (Figura 19).

Figura. Ensayo EMSA de la variante -480C>T y -592G>A

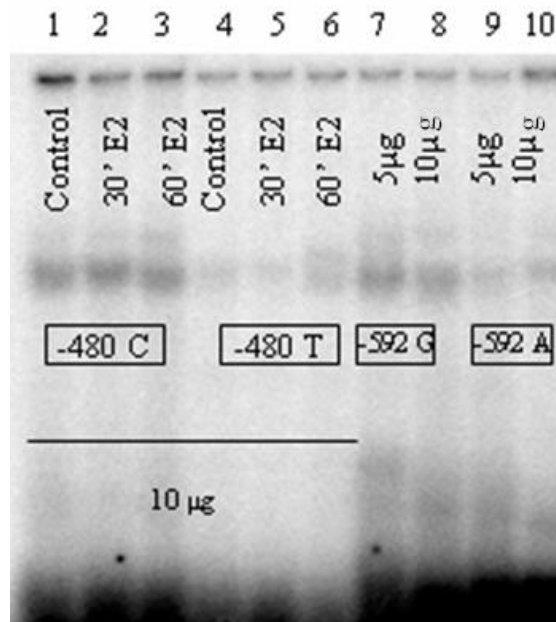


Figura 19. El alelo menor de la variante -480 C>T, y la variante -592 G>A disminuyen la unión de proteínas nucleares. Los carriles 1 a 3 corresponden a la sonda con el alelo C en la posición -480 y de los carriles 4 a 6 corresponden a la sonda con el alelo -480T. En los carriles 7 a 8 se tiene la sonda con el alelo -592 G y los carriles 9 y 10 corresponden a la sonda con el alelo -592 A. La cantidad de proteína utilizada para las reacciones de los carriles 1 a 6, 8 y 10 fue 10 µg. En las reacciones de los carriles 7 y 9 se utilizaron 5µg de proteínas nucleares. 30' y 60' indica el tiempo en minutos que se estimuló a las células HepG2 con Estradiol.

En la figura 19 se observan también los resultados de los alelos -592 G y -592 A. En los carriles 7 y 8 que corresponden al alelo -592 G los complejos son más abundantes que en los carriles 9 y 10 que corresponden a los complejos de la sonda -592 A; utilizando las concentraciones de proteínas de 5 y 10 µg respectivamente. Los resultados anteriores demuestran que estas variantes pueden tener un efecto importante en la expresión del gen de la *LIPC* por lo que los análisis de gen reportero fueron muy decisivos en este estudio.

7.3.3. Las variantes del promotor -480 C>T, -514 C>T y -592 G>A disminuyen la actividad transcripcional del gen *LIPC*.

Para comprobar el posible efecto de funcional de las variantes de promotor del gen *LIPC* se realizaron ensayos de gen reportero de las 3 variantes identificadas (480 C>T, -514 C>T y -592 G>A). Se observó que todas ellas modifican negativamente la expresión del gen de forma estadísticamente significativa ($p<0.001$). En la gráfica de la figura 20 se muestran la media de actividad relativa de cada una de las variantes considerando 100% de actividad del promotor nativo. Todos los resultados fueron normalizados con respecto al gen reportero de la luciferasa de renilla. Las medias de la actividad relativa del promotor con las variante fueron 54.8%, 10%, y 31.6% para -480C>T, -514 C>T y -592 G>A respectivamente.

Figura. Gráfico de la actividad relativa del promotor del gen *LIPC*

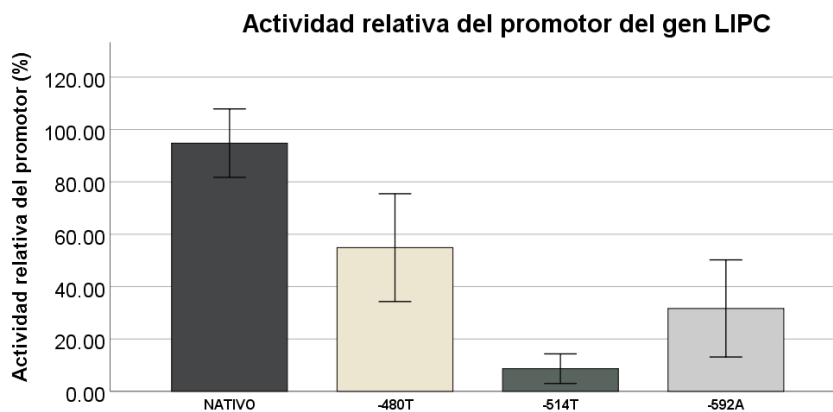


Figura 20. Las variantes del promotor -480 C>T, -514 C>T y -592 G>A disminuyen la actividad transcripcional del gen *LIPC*. Las barras representan la actividad relativa del promotor del gen *LIPC* en células HepG2 transfectadas con el vector que expresa el reportero de la luciferasa de luciérnaga. Se muestran los valores de la media y los bigotes correspondientes a la desviación estándar de la media para un $\alpha=0.05$. Datos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La prueba de Dunn-Bonferroni demostró que en todos los casos la media de la actividad del promotor con alguna de las variantes es diferente al compararlo con el promotor nativo ($p<0.001$, para cualquier comparación). La variante con mayor efecto en disminuir la actividad del promotor es la variante común -514 C>T la cual disminuye al 10% la actividad del promotor nativo ($p<0.00001$).

Las 3 variantes de promotor estudiadas mediante ensayos de gen reportero disminuyen de manera importante la expresión del gen *LIPC*. La variante -514 C>T es la que tiene un mayor efecto al reducir al 10% la transcripción. Estos resultados concuerdan con lo observado en la cohorte de 2105 individuos pues sabemos que la actividad de LH y los niveles de C-HDL guardan una relación inversa y en este estudio la variante aumenta los niveles de C-HDL. Por otro lado, de acuerdo a un análisis

EMSA los alelos menores de las variantes -480 C>T y -592 G>A disminuyen la unión de proteínas nucleares

7.3.4 Efectos de las variantes de la secuencia codificante R135C, S289F y Q355R

7.3.4.1 Las variantes de la secuencia codificante R135C y Q355R modifican la distribución de carga de la proteína LH y la variante S289F se encuentra muy cercana al sitio activo de la enzima LH

Para conocer cuál puede ser efecto de las variantes R135C y Q355R en la estructura tridimensional de la proteína LH se realizó un análisis *in silico*. Este análisis se realizó gracias al uso del programa MODELLER que nos permitió realizar un modelado por homología. Los resultados se muestran en la figura 21.

Figura. Distribución de carga de las proteínas LH R135 y LH C1355

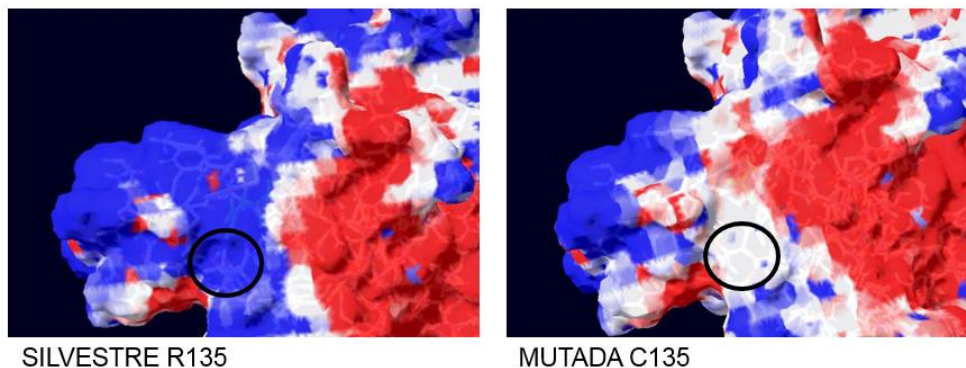


Figura 21. Imágenes tridimensionales de la proteína LH nativa y LH mutada R135C. El templado se construyó incluyendo estructuras tridimensionales de Rayos X con una resolución ≤ 0.5 Å y una estructura primaria con una identidad $\geq 70\%$ con la secuencia primaria de aminoácidos de la LH. Los colores en la imagen representan la carga superficial de la proteína: el color blanco corresponde a carga neutra, el azul a carga positiva y el rojo a carga negativa.

En este modelo tridimensional se aprecia la distribución de carga de acuerdo con un código de colores: el color blanco corresponde a carga neutra, el azul a carga positiva y el rojo a carga negativa. El aminoácido que se modifica se encuentra en un círculo, la proteína mutada tiene una región con carga superficial neutra que se extiende más allá de la posición 135, mientras que en la proteína nativa se aprecia una carga superficial positiva en esta zona. Estos resultados nos permiten presumir que esta mutación afecta a distancia la densidad electrónica de la proteína LH. Se realizó el mismo análisis para

la variante Q355R, los resultados se muestran en la figura 22.

Figura. Distribución de carga de las proteínas LH Q355 y LH R355

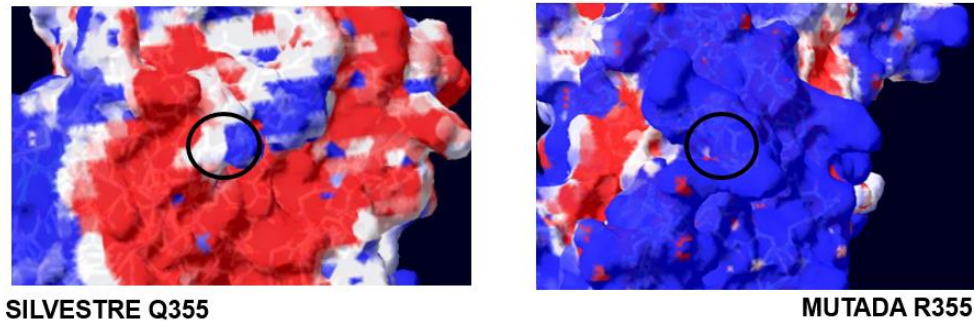


Figura 22. Imágenes tridimensionales de la proteína LH nativa y LH mutada Q355R. El templado se construyó incluyendo estructuras tridimensionales de Rayos X con una resolución ≤ 0.5 Å y una estructura primaria con una identidad $\geq 70\%$ con la secuencia primaria de aminoácidos de la LH. Los colores en la imagen representa la carga superficial de la proteína: el color blanco corresponde a carga neutra, el azul a carga positiva y el rojo a carga negativa.

Al igual que en los modelos anteriores, en el círculo se denota al aminoácido modificado por la mutación. En los patrones de carga superficial de la vecinidad observamos en la proteína nativa una extensa región con carga negativa y pequeñas secciones neutras y positivas; en cambio en la proteína mutada la carga superficial es predominantemente positiva. Además de los efectos en la carga también observamos cambios en los patrones de crestas y surcos en la superficie de la proteína. Con respecto al cambio R135C podemos considerar que los efectos de la mutante Q355R son más evidentes.

También se construyó gracias al sitio UniProt la estructura tridimensional de la proteína LH para identificar en ella los residuos mutados (R135, S289 y Q355) y de esta manera considerar en términos de estructura secundaria y terciaria que efectos podrían tener estas sustituciones [The UniProt Consortium, 2019]. En la figura 23 se observa la imagen generada de la proteína nativa, en color rosa se identifican los tres residuos que con las mutaciones son sustituidos.

Figura. Estructura tridimensional nativa de la lipasa hepática

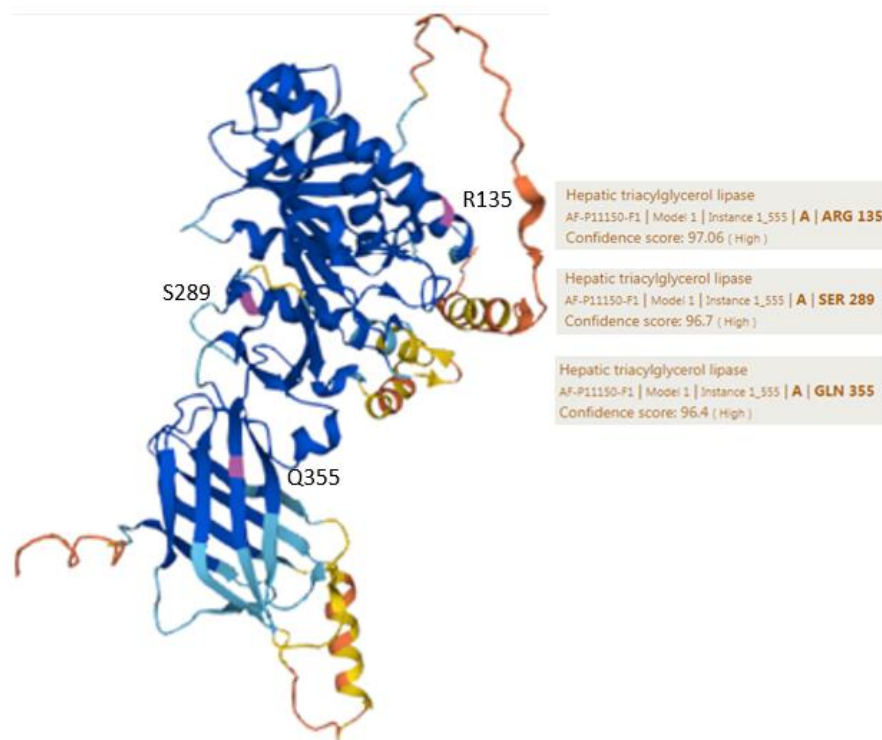


Figura 23. Estructura tridimensional de la proteína LH nativa, se muestran enmarcados en color rosa los residuos que son modificados R135, S289 y Q355. En las cajas que se encuentran a los lados se observa que con una alta posibilidad estas son las posiciones que ocupan estos residuos.

Se puede observar que tanto los residuos R135 como S289 se encuentran dentro de una hélice alfa y el residuo Q355 se encuentra en una hoja β plegada. Interesantemente el aminoácido serina 289 se encuentra a solo 10 aminoácidos de la histidina que forma parte del sitio catalítico y que además se encuentra dentro de la misma hélice alfa. Podemos considerar por tanto que este cambio se localiza a tan solo 15 Å del sitio catalítico o lo que son 3 vueltas de la hélice alfa (en una hélice alfa los $C\alpha$ de dos aminoácidos contiguos están separados por 1,5Å y existen aproximadamente 3,6 aminoácidos por vuelta). [The UniProt Consortium, 2019].

Por último, la glutamina de la posición 355 se encuentra en una hoja β plegada que forma parte del dominio PLAT (Policesteina-1, Lipoxigenasa, Alfa-Toxina); este dominio está muy conservado dentro de las familias de proteínas que se asocian a lípidos o a la membrana plasmática [The UniProt Consortium, 2019].

7.3.4.2 Las variantes R135C, S289F Y Q355R disminuyen la secreción de la proteína LH así como su contenido intracelular

Para realizar una caracterización de la funcionalidad de las variantes de secuencia codificante se realizaron diferentes ensayos *in vitro*. Uno de los ensayos fue analizar la secreción de la proteína en células completas; para ello se realizaron ensayos de citometría de flujo para medir el índice de fluorescencia de las células HEK-293 transfectadas con el vector que permitía la expresión de la proteína de fusión LH-GFP. El índice de fluorescencia fue calculado antes y después de que las células recibieran un estímulo de heparina que promueve su secreción. Al índice de fluorescencia inicial se le restó el índice de fluorescencia final y el resultado se dividió entre el índice de fluorescencia inicial. Lo anterior nos permitió calcular de manera indirecta el porcentaje de secreción de cada población celular. Se compararon los resultados de las proteínas mutadas con la proteína nativa. Los resultados se muestran en la figura 24.

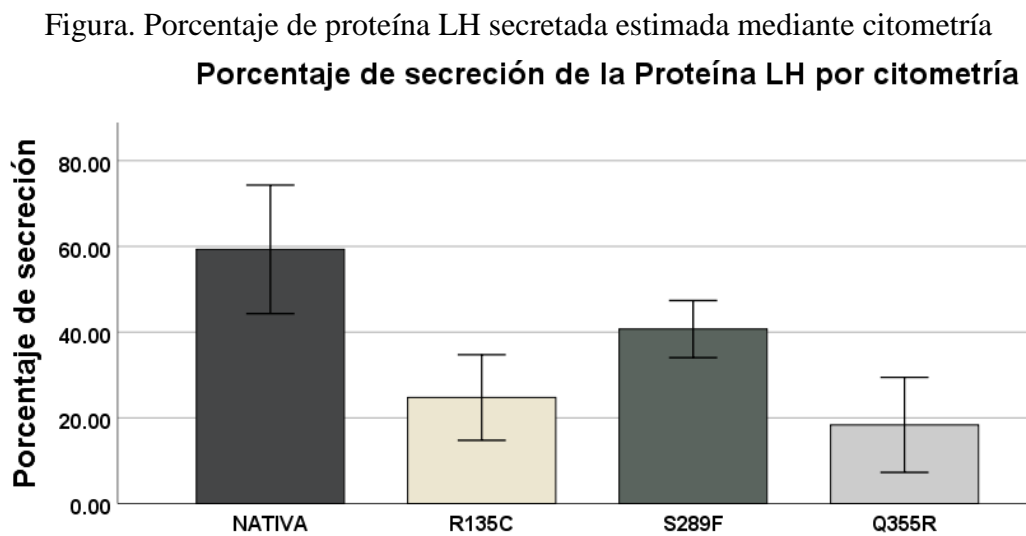


Figura 24. Las mutantes de secuencia codificantes disminuyen la secreción de la LH. Porcentaje de secreción de la proteína de fusión LH-GFP medido mediante citometría de flujo. Se muestran los valores de la media y los bigotes correspondientes a la desviación estándar de la media para un $\alpha=0.05$. Datos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La prueba de Dunn-Bonferroni demostró que en todos los casos la secreción es diferente al compararlo con la proteína nativa ($p<0.001$), entre las mutantes R135C y LH Q355R no hay diferencias en la secreción de ($p>0.05$), la secreción de la mutante S289F es más elevada que las otras dos mutantes ($p<0.001$). Datos de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Todas las mutaciones afectaron negativamente la secreción de la proteína LH, dos de ellas se

encuentran por debajo de la mitad con respecto al valor de la proteína nativa (LH R135C y LH Q355R). Los valores medios de secreción de la proteína LH-GFP fueron específicamente: 59.31%, 24.74%, 40.71% y 18.36% para la proteínas LH nativa, LH R135C, LH S289F y LH Q355R, respectivamente. Las medias de secreción de las mutantes son estadísticamente menores con respecto a la proteína silvestre ($p < 0.001$), entre las mutantes R135C y LH Q355R no hay diferencias en la secreción ($p > 0.05$), la secreción de la mutante S289F es más elevada que las otras dos mutantes ($p < 0.001$).

Para identificar cual podría ser la alteración a nivel celular que disminuye la secreción de las proteínas mutantes se realizaron microscopías confocal de las células que expresaban estas mutantes. Al igual que en los estudios de citometría las células se estimularon con heparina (20U/mL). Se fijaron células no estimuladas y células después de recibir el estímulo por 20 min los resultados se muestran en la figura 25.

Figura. Panel de las células HEK-293T transfectadas con el vector que expresa la proteína LH nativa o alguna de sus mutantes.

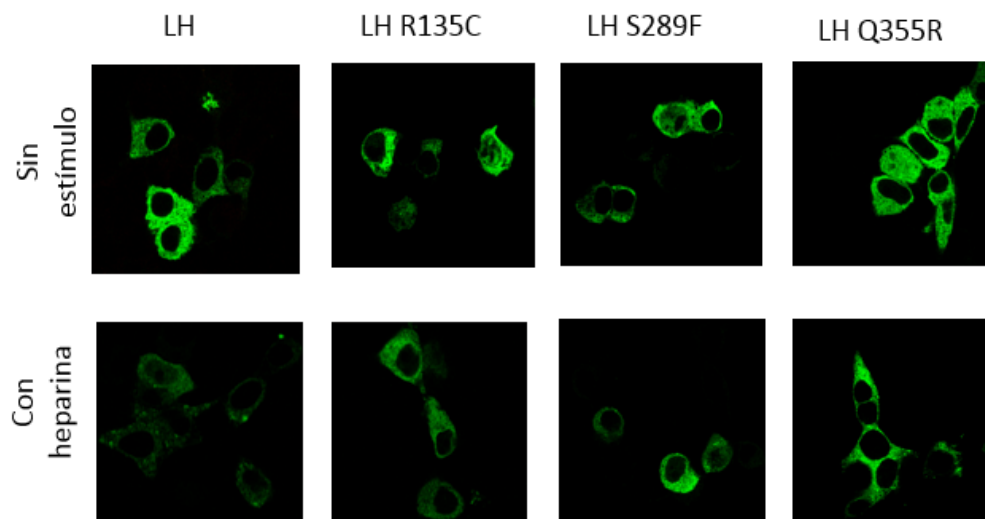


Figura 25. Se muestran imágenes representativas de las células que expresan la proteína nativa o las mutantes incubadas con heparina o sin el estímulo.

Aunque en este caso no realizamos un análisis estadístico de estas imágenes consideramos que las células que expresan la proteína LH nativa (en el panel identificado como LH) presentan diferencias muy importantes entre las células que se incubaron con heparina y las que no se estimularon. En las células estimuladas se observa una pérdida importante de la fluorescencia. En los paneles siguientes visualmente no se aprecian diferencias entre las células estimuladas y sin estimular. Esto probablemente se deba a que las proteínas mutadas tienen alteraciones en su secreción. Sin embargo, idealmente se debe realizar la captura de un número adecuado de imágenes y un análisis estadístico de estas imágenes para poder realizar un análisis cuantitativo.

Además de la secreción de la proteína LH también nos interesaba conocer la cantidad de proteína LH intracelular para inferir si además de la disminución en la secreción pudiera existir una modificación en la síntesis o el procesamiento de las proteínas mutadas. Para ello se estimaron la cantidad de la proteína LH mediante ELISA e inmunoblot. Se recuperaron las proteínas intracelulares y proteínas de los sobrenadantes de células HEK-293T transfectadas con que el vector que expresaba la LH nativa o mutadas. Las células se estimularon por 12 horas con heparina (20U/mL). Los resultados de la cuantificación por ELISA se presentan en las figuras 26 y 27.

Figura. Cuantificación de la proteína LH intracelular mediante ensayos de ELISA

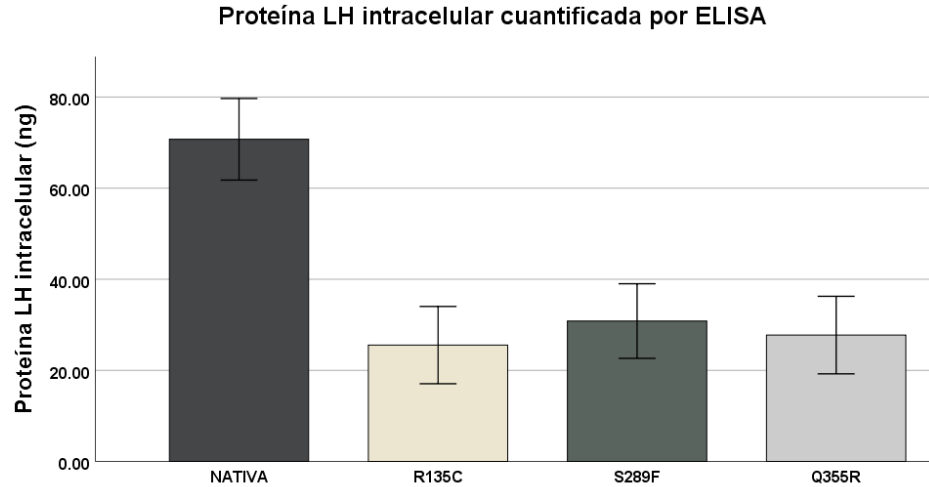


Figura 26. Las mutantes de secuencia codificante disminuyen el contenido de proteína intracelular. Se muestran los valores de la media y los bigotes correspondientes a la desviación de la media para un $\alpha=0.05$. Datos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La prueba de Dunn-Bonferroni demostró que en todos los casos el valor medio del contenido de proteína intracelular es menor al compararlo con la proteína nativa ($p<0.001$), además de que no existen diferencias entre las mutantes ($p>0.05$).

Figura. Cuantificación de la proteína LH en sobrenadantes mediante ensayos de ELISA

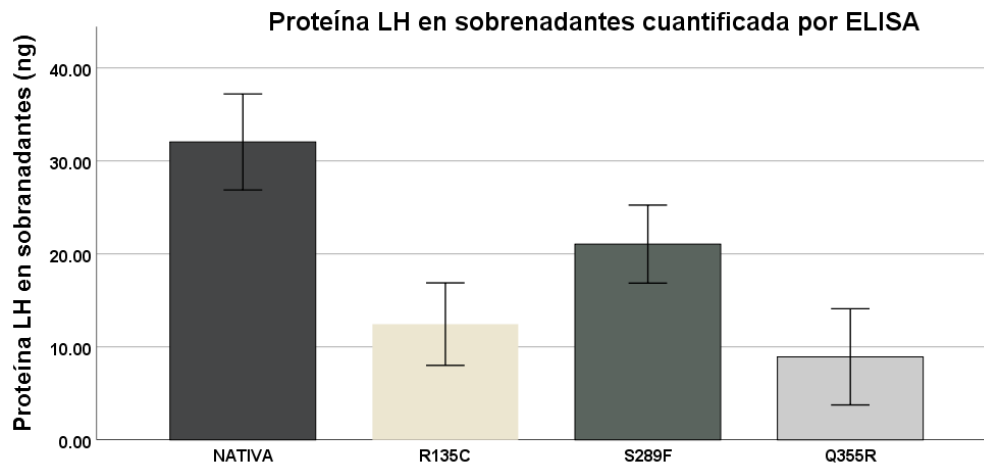


Figura 27. Las mutantes de secuencia codificante disminuyen el contenido de proteína en sobrenadantes. Se muestran los valores de la media y los bigotes correspondientes a la desviación estándar de la media para un $\alpha=0.05$. Datos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La prueba de Dunn-Bonferroni evidenció que el contenido de las proteínas mutantes en sobrenadantes es menor al compararlo con la proteína nativa ($p<0.001$).

Se puede observar que las mutantes estudiadas disminuyen la cantidad de proteína tanto intracelular como extracelular. En cuanto a la proteína en el interior de la célula básicamente todas las mutantes disminuyen la proteína LH muy por debajo del 50% de la cantidad cuantificada para proteína silvestre ($p < 0.001$); además entre ellas el contenido es similar ($p > 0.05$ de las comparaciones entre mutantes). Los valores de la media de la cuantificación de LH intracelular en ng son: 70.72, 25.55, 30.82, y 27.74 para las células que expresan las proteínas LH nativa, LH R135C, LH S289F y LH Q355R, respectivamente.

Con respecto a la proteína en el sobrenadante, las mutantes R135C y Q355R disminuyen el contenido por debajo de 40% ($p < 0.001$) y la mutante S289F disminuye al 65% ($p < 0.001$) considerando el 100% para el valor medio del contenido de la proteína nativa. Los valores del contenido de proteína LH en sobrenadantes expresado en ng son: 32.03, 12.44, 21.04 y 8.92 para las células que expresan las proteínas LH nativa, LH R135C, LH S289F y LH Q355R, respectivamente. Entre las mutantes R135C y Q355R no hay diferencias en el contenido de la proteína LH en sobrenadantes ($p > 0.05$), el contenido de la mutante S289F es mayor que las otras dos mutantes ($p < 0.001$).

Debido a que no contábamos con información suficiente de la especificidad del kit utilizado para el ensayo ELISA realizamos además un inmunoblot para la estimación del contenido de estas proteínas. En este caso las figuras 28, 29 y 30 demuestran los resultados encontrados.

Figura. Autorradiografía que revela la presencia de la proteína LH intracelular y en sobrenadante mediante inmunoblot

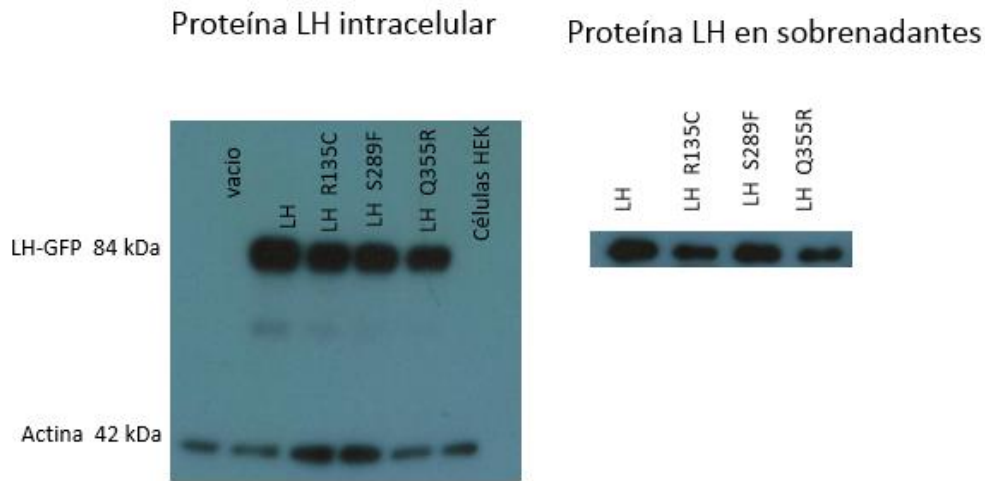


Figura 28. Las mutantes de secuencia codificante disminuyen el contenido de proteína intracelular y en sobrenadantes. Autorradiografía representativa para evidenciar la presencia de la proteína LH; después de 48 horas de la transfección, las células fueron incubadas por 12h con heparina 20U/mL. Se utilizaron 2 μ g de proteínas del lisado celular y 40 μ L del sobrenadante. Para el análisis se utilizó la actina como control interno.

Figura. Cuantificación de la proteína LH intracelular mediante inmunoblot

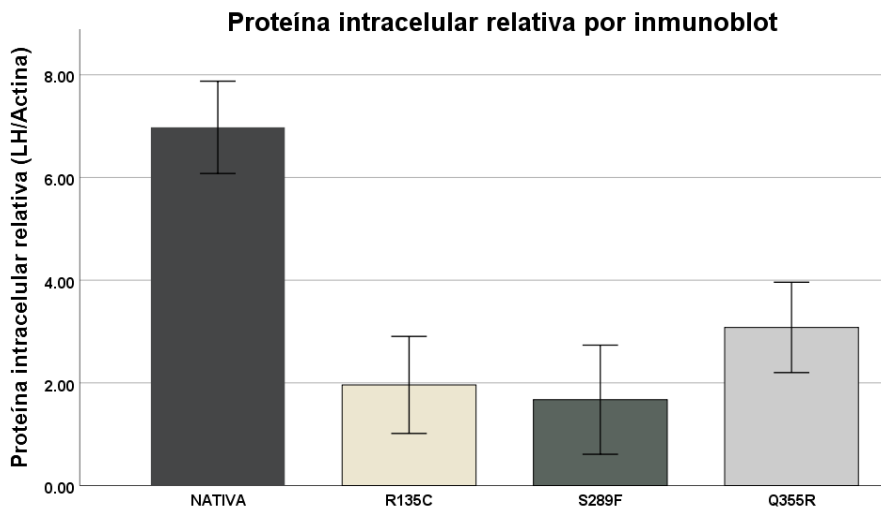


Figura 29. Las mutantes de secuencia codificante disminuyen el contenido de proteína intracelular. Se muestran los valores de la media considerando la expresión relativa de la proteína LH dividida entre la proteína actina. Los bigotes corresponden a la desviación estándar de la media para un $\alpha=0.05$. Datos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La prueba de Dunn-Bonferroni evidenció que las proteínas mutantes presentan un contenido intracelular menor al compararlo con la proteína nativa ($p<0.001$).

Figura. Cuantificación de la proteína LH en sobrenadantes mediante inmunoblot

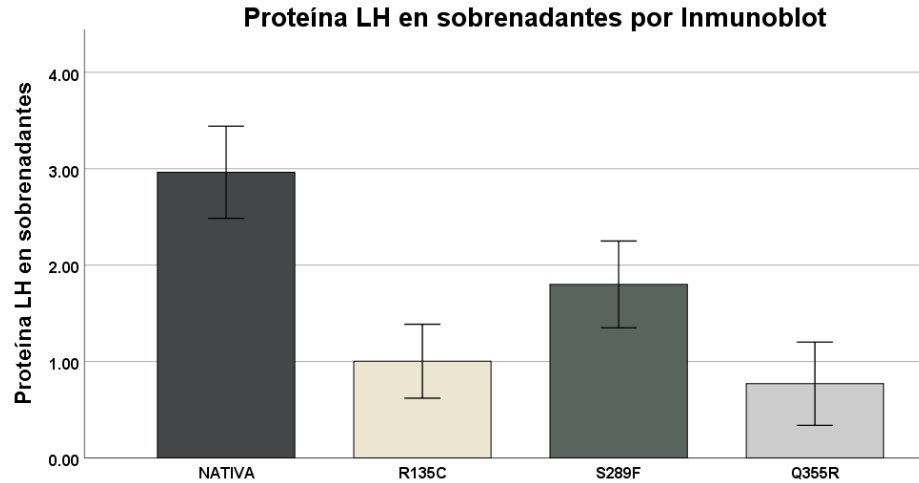


Figura 30. Las mutantes de secuencia codificante disminuyen el contenido de proteína en sobrenadantes. Se muestran los valores de la media de la expresión de la proteína LH. Los bigotes corresponden a la desviación estándar de la media para un $\alpha=0.05$. Datos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La prueba de Dunn-Bonferroni demostró que en todos los casos el contenido de proteína en sobrenadantes es menor al compararlo con la proteína nativa ($p<0.001$).

Al igual que en la cuantificación de las proteínas por el método de ELISA en el inmunoblot también se aprecia una reducción del contenido intracelular y extracelular de las proteínas mutadas comparadas con la proteína nativa. La disminución más dramática es para el contenido de proteína intracelular donde todas las mutantes presentan valores por debajo del 45% con respecto a la proteína nativa ($p<0.001$). El contenido relativo de LH/Actina es: 6.97, 1.96, 1.67, y 3.08 para las células que expresan las proteínas LH nativa, LH R135C, LH S289F y LH Q355R, respectivamente. Entre las mutantes R135C y S289F no hay diferencias en el contenido de la proteína LH intracelular ($p>0.05$), el contenido de la mutante Q355R es más elevada que en las otras dos mutantes ($p<0.001$).

En relación a la proteína en el sobrenadante, las mutantes R135C y Q355R disminuyen el contenido por debajo de 33% ($p<0.001$); mientras que la mutante S289F lo reduce al 60% ($p<0.001$) con respecto al contenido de la proteína nativa. Los valores medios de contenido de proteína LH extracelular son: 2.96, 1.0, 1.8 y 0.77 para las células que expresan las proteínas LH nativa, LH R135C, LH S289F y LH Q355R, respectivamente. En todos los casos el contenido de proteína en sobrenadantes es menor al

compararlo con la proteína nativa ($p < 0.001$); entre las mutantes LH R135C y LH Q355R el contenido es similar ($p > 0.05$), mientras que en la mutante S289F el contenido es más elevado ($p < 0.001$).

En estos estudios funcionales de las proteínas LH mutadas se observó que las mutantes LH R135C, LH S289F y LH Q355R disminuyen el contenido de proteína intracelular de manera importante así como el contenido de proteína en sobrenadantes. El análisis de células completas nos permitió determinar que las proteínas mutadas se secretan en menos del 50% con respecto a la proteína nativa. Por lo anterior, se debe realizar una caracterización más completa del defecto en la secreción de las proteínas mutadas así como de los mecanismos que modifican su contenido intracelular

8. Discusión

8.1 Estudio de la variante -514 C>T del gen *LIPC* en una cohorte de la población mexicana

En el estudio en población abierta observamos que el grupo con el genotipo TT de la variante -514 C>T del gen *LIPC* tiene niveles más elevados de C-HDL. Esta variante ya ha sido estudiada en otras poblaciones, pero los resultados han sido inconsistentes ya que algunos autores han encontrado este mismo resultado [PiLHajamäki y cols., 2000; Isaacs y cols., 2004; Teran-García y cols., 2005; Brinkley y cols., 2011] mientras que otros autores no encontraron esta asociación [Hegele y cols., 1999; Fang y cols., 2000], y otros autores han publicaron resultados opuestos [Lu y cols., 2016]. Estas diferencias pueden residir en las poblaciones estudiadas, y en los valores de corte para definir los niveles plasmáticos de C-HDL normales. Cabe señalar que la población mexicana tiene una alta prevalencia de hipoalfalipoproteinemia y que en este estudio la variable C-HDL se consideró como una variable continua para evitar considerar puntos de corte definidos en otras poblaciones. Probablemente el estudio más robusto en términos de estadística sea el estudio realizado por Isaacs y cols., 2004 quienes determinaron por medio de un metanálisis que la variante -514 C>T se relacionaba con niveles elevados de colesterol HDL y una baja actividad de la enzima LH.

Al respecto de la asociación de la variante del promotor -514C>T con el riesgo de DT2, Costa-Urrutia y cols., 2018 encontraron que esta variante genética no se asoció con prediabetes en mexicanos después de ajustar el modelo por etnicidad y otros factores incluyendo edad, IMC, sexo y actividad física. Consistente con esto en el presente estudio solo se observó una asociación marginal entre la variante -514C>T y el riesgo de DT2. Contrastando con los resultados anteriores; Posadas-Sánchez y cols., 2015 encontraron que dicha variante se asociaba con un mayor riesgo de DT2 en mexicanos. Cabe destacar que la principal diferencia con respecto al estudio posterior es que incluimos la ancestría como un factor de confusión, ya que se ha demostrado que es un requisito para evitar encontrar asociaciones falsas en poblaciones mezcladas como la población mexicana. Siendo además que específicamente el riesgo de desarrollar DT2 correlaciona positivamente con la ancestría nativa americana [Carulli y cols., 2005; Villalpando y cols., 2010a; SIGMA, 2014;].

Pihlajamäki y cols., 2000 reportaron en población finlandesa que los portadores del genotipo AA del polimorfismo del gen -250G>A tenían niveles elevados de insulina en ayunas, colesterol de muy baja densidad (VLDL-C) y triglicéridos, lo que sugiere que los portadores homocigotos de AA son resistentes a la insulina y, en consecuencia, más propensos a desarrollar hiperglucemia. Por el contrario, en un estudio prospectivo realizado por Todorova y cols, 2004 encontraron que las personas que portan el genotipo GG eran las más propensas a desarrollar DT2. Esto pone en evidencia que existen aparentes conflictos sobre el papel que juegan los genotipos de la variante -250G>A en los diferentes rasgos relacionados con la glucosa. Es posible que el papel de la variante promotora -250G>A (o cualquiera de las variantes vinculadas: -514C>T, -710T>C, y -763A>G) está mediado por el efecto de diferentes factores de confusión como el género o el IMC. También es posible que estas variantes juegue un doble papel ya sea incrementando o disminuyendo el riesgo de DT2 dependiendo de la presencia de factores genéticos o ambientales adicionales.

En el presente estudio también se mostró que la variante del promotor -514C>T tiene un efecto indirecto y un papel protector para el desarrollo de DT2 gracias a que aumenta los niveles de C-HDL. Para descartar una posible causalidad inversa dado, que también hay evidencia de que la DT2 es un factor de riesgo para reducir los niveles de C-HDL [Rohrer y cols., 2004; Gatti y cols., 2009; Vollenweider y cols., 2015], se realizó un ajuste del modelo donde la variable dependiente fue el C-

HDL y la variable mediadora fue la DT2. Encontramos que la DT2 afecta negativamente los niveles de C-HDL ($\beta = -0,058$; $p < 0,001$); sin embargo, la variante genética no tiene efecto en el riesgo DT2. Mediante estos resultados se descartó la causalidad inversa y se demostró contundentemente que el efecto de la variante -514C>T del gen *LIPC* es a través del aumento del C-HDL, esta condición a su vez representa un efecto protector que disminuye el riesgo de DT2.

Para tratar de explicar cómo es que esta variante modifica el riesgo de desarrollar DT2 debemos considerar que esta variante eleva los niveles de colesterol HDL; ya se ha observado en estudios prospectivos que niveles bajos de C-HDL son un factor de riesgo para el desarrollo de DT2 [Mykkänen y cols., 1993; Wilson y cols., 2007], en esta misma línea, también se ha observado que niveles elevados de C-HDL son un factor protector independiente para el desarrollo de DT2 [Abbasi y cols., 2013]. A nivel celular podemos considerar que las HDLs son un factor que protege a los tejidos de la lipotoxicidad (efectos perjudiciales de los metabolitos lipídicos en los tejidos no adiposos: hígado, el músculo esquelético las células β pancreáticas, etc.) debido a que estas lipoproteínas tienen la propiedad de captar colesterol y triglicéridos de los tejidos periféricos disminuyendo así el contenido o la posibilidad de acumulación de lípidos que generan efectos perjudiciales [Pétremand y cols., 2012; Risheng y cols., 2019].

En cuanto a otros fenotipos relacionados con la LH, sabemos que en ratones y el humano la sobreexpresión del gen *LIPC* así como incremento de la actividad de LH se relaciona con obesidad [Després y cols., 1989; Carr y cols., 1999; Cedó y cols., 2017]. Es importante destacar que no encontramos una asociación significativa entre el IMC y la variante, esto concuerda con el estudio de Juo y colaboradores [Juo y cols., 2001]. Se debe considerar además que la asociación observada en humanos se debió a la grasa intraabdominal [Després y cols., 1989; Carr y cols., 1999], un rasgo que no necesariamente está directamente correlacionado con el IMC [Ashwell y cols., 2012]. Por lo tanto, realizar la medición de la grasa intraabdominal mediante técnicas de tomografía computarizada en un pequeño grupo (una mínima muestra para alcanzar un poder estadístico del 80%) podría habernos permitido descartar el papel de esta variante y su relación con la obesidad central.

8.2 Caracterización de las variantes de secuencia promotora – 480 C>T, -514 C>T y -592 G>A del gen *LIPC*

En cuanto a los resultados *in vitro* de la variante -514 C>T del gen *LIPC* hay resultados inconsistentes pues Deeb y cols., 2000 encontraron que el alelo T disminuyó al 70% la actividad del promotor a utilizar un vector con el reportero CAT y transfectar células hepáticas murinas. No obstante, en otro estudio Botma y cols., 2001 reportaron que el alelo T no modifica la actividad del promotor, y que es necesaria la presencia del alelo A de la variante ligada -250G>A para lograr ver este efecto en células HepG2 transfectadas. Cabe destacar que en estos dos estudios se clonaron segmentos distintos del gen *LIPC* (- 639 a +29 en el estudio de Deeb vs. - 684 a + 14 en el estudio de Botma; considerando el sitio principal de inicio de transcripción), además de que se usaron genes reporteros y líneas celulares distintos; todas estas diferencias pueden ser los motivos de controversia en los resultados.

Dadas estas inconsistencias en los estudios *in vitro* de la variante -514 C>T y las evidencias importantes de sus efectos en algunos rasgos humanos; nos dimos a la tarea de realizar estudios funcionales de esta variante considerando los resultados anteriores para seleccionar el mejor diseño. Cabe mencionar que se seleccionaron las células HepG2 ya que en un inmunoblot observamos que estas células expresaba proteína LH y asumimos que nos proporcionarían el contexto de factores de transcripción necesarios para realizar los análisis de gen reportero y los ensayos EMSA (los resultados de este inmunoblot se muestran en el Anexo 3).

Solo estudiamos la variante -514C>T de las 4 variantes que forman el haplotipo ya que los estudios *in silico* e *in vitro* anteriores apuntaban a que esta variante podría interrumpir un elemento de respuesta para el factor de transcripción USF [Botma y cols., 2001; Kent, 2002]. Además de la variante común - 514 C>T se realizaron análisis *in vitro* para las variantes que se comportaban como mutaciones (-480 C>T, rs35511894 y -592 G>A, rs36041167). En nuestros análisis de gen reportero observamos que tanto la variante -514 C>T como las variantes que se comportan como posibles mutaciones disminuyen la actividad del gen de la *LIPC*, esto es consistente con la información que conocemos de estas variantes.

Debido a que la variante -514 C>T se encuentra en un haplotipo y que nosotros la estudiamos de manera aislada, debemos tomar en cuenta que las tres variantes adicionales pueden contribuir a la regulación de la actividad transcripcional del promotor, y que esto puede representar una limitación del presente estudio. Sin embargo, existe suficiente evidencia para apoyar la noción de que el polimorfismo -514C>T del promotor del gen *LIPC* tiene consecuencias funcionales por sí mismo.

Podemos considerar por tanto que los estudios *in vitro* del polimorfismo -514C>T, así como la evidencia de modelos animales, están en línea con observaciones epidemiológicas en humanos. Generalmente, estos estudios establecen una correlación negativa entre la actividad de la lipasa hepática y los niveles de C-HDL [Breckenridge y cols., 1982; Mezdour y cols., 1997]. Por otro lado los animales que sobreexpresan la LH tienen los niveles más bajos de C-HDL [Dichek y cols., 1998]. Por lo tanto, se espera que el alelo -514T disminuya la transcripción del gen *LIPC in vivo*, y que los individuos con genotipo TT muestren lo menores niveles de actividad de la enzima LH así como los niveles plasmáticos más altos de C-HDL [Isaacs y cols., 2004].

En cuanto a las dos variantes del promotor que se comportaban como mutaciones sabemos que estas se identificaron inicialmente en un grupo con C-HDL elevado y además los integrantes de la familia que portaba la variante -480 C>T también tenían elevado el C-HDL, aunque por ahora estadísticamente solo se muestra una tendencia ($p= 0.0641$), por el pequeño número de muestras. Hasta hoy, no es de nuestro conocimiento que alguna de estas dos variantes se hayan relacionado con algún fenotipo adicional a lo que nosotros observamos; ya que en la base CiVar del NCBI que contiene una gran colección de variantes y los rasgos con los que estas se relacionan, no existe algún reporte de ellas [Landrum y cols., 2014].

Por otra parte, gracias a estudios de secuenciación masiva de genomas se han podido localizar estas dos variantes en algunas poblaciones humanas. Esto ha permitido asignarles un identificador rs además de que se les ha calculado una frecuencia muy baja en diferentes poblaciones (menor al 2,5%). En población latina la frecuencia calculada es menor al 1% (0,98% y 0,81% para -480C>T y -592G>A, respectivamente) [Karczewski y cols., 2020].

Cabe destacar que los resultados de los estudios *in vitro* que nosotros realizamos para estas dos variantes (-480C>T y -592G>A) son concordantes entre ellos; ya que en el análisis EMSA observamos que la presencia de los alelos mutados se relacionaba con una menor formación de complejos DNA-proteína, además pudimos observar una menor actividad transcripcional en los ensayos de promotor. Por lo anterior podemos considerar que en las secuencias contiguas a estas variantes se unen factores de transcripción que promueven la actividad transcripcional de este gen y que la presencia de estas variantes disminuye de forma importante su unión al interrumpir su secuencia.

Otros de los hallazgos publicados que podemos considerar apoyan esta consideración es que mediante ensayos de footprinting realizados por Oka y cols., 1996 determinaron que la secuencia -595 a -577 es protegida de la digestión con DNAasa 1, además a solo 6 nucleótidos de donde se localiza esta variante se encuentra la variante -586 T>C, identificada en población china; en estudios funcionales se observó que el alelo C disminuye al 56% la transcripción del gen [Su y cols., 2002].

Se debe considerar realizar ensayos EMSA de superretardo (o idealmente de inmunoprecipitación de cromatina) utilizando anticuerpos que reconozcan los factores de transcripción que se identificaron en el análisis *in silico* de las variantes -592 G>A y -480 C>T, pues de acuerdo con este análisis estas variantes modifican la unión de estos factores de transcripción a tal grado que la presencia del alelo menor interrumpe totalmente el elemento de respuesta.

También se debe realizar una mejor caracterización *in vivo* de estas variantes (-480C>T y -592G>A) en los portadores; ya sea midiendo actividad de la enzima LH o valorando las diferentes subfracciones de C-HDL, así como el contenido de lípidos en estas lipoproteínas. Debido a las evidencias que tenemos, esperamos que estas variantes tengan un efecto importante en la expresión del gen LH *in vivo*, y que los portadores tengan elevado el C-HDL o que presenten algún otro subfenotipo que explique la disminución en la actividad transcripcional del gen *LIPC*.

8.3 Estudio funcional de las variantes de secuencia codificante R135C, S289F y Q355R

Con respecto a la caracterización funcional de las 3 variantes de secuencia codificante no sinónimas que identificamos, observamos que la variante Q355R incrementa de manera importante el C-HDL en los portadores de 2 familias, esto concuerda con los hallazgos en la base de ClinVar donde se reporta que esta variante está relacionada con deficiencia de lipasa hepática [Landrum y cols., 2014], ya que se sabe que estos pacientes presentan como característica C-HDL elevado [Breckenridge y cols., 1982; Carlson y cols., 1986; Little y Connelly, 1986]. La variante S289F también se encuentra reportada en una familia con deficiencia en LH [Durstensfeld y cols., 1994], mientras que de la variante R135C no cuenta con identificadores, y tampoco se ha identificado en otras poblaciones por lo que podríamos considerar que esta variante es privativa de poblaciones amerindias y que su frecuencia es muy baja (frecuencia <0.01% o presencia del alelo menor < a 1:10000 individuos) tal que no ha podido ser identificada en los estudios de genomas y exomas hasta hoy reportados (pues en estas las poblaciones amerindias no se encuentran bien representados) [Karczewski y cols., 2019].

Referente a los estudios *in silico* de estas variantes no sinónimas encontramos que estas se localizan en sitios que pudieran ser de importancia para la función de la proteína. La variante R135C se encuentra en una hélice alfa; la presencia del alelo C135 tiene efectos locales en la densidad electrónica que se caracteriza por pequeñas regiones con carga superficial neutra y otras regiones con carga negativa que sustituyen a una superficie predominantemente con carga positiva en la proteína nativa. Debemos considerar que en esta mutación se intercambian dos aminoácidos con naturaleza y tamaños distintos pues se sustituye un grupo guanidino (con carga positiva) de la arginina por un grupo tiol de la cisteína (pequeño y polar). Gracias a estas evidencias suponemos que la proteína mutada LH R135C puede estar modificando las interacciones de la LH con otras proteínas debido a que los efectos en esta sustitución podrían extenderse en una región que más allá de la modificación de un solo aminoácido.

Esta mutación al igual que la mutación S289F se encuentra en el dominio de lipasa, el cual es un dominio que está presente en todas las triacilglicerol lipasas (EC 3.1.1.3) [The UniProt Consortium, 2019]. Las lipasas son enzimas lipolíticas que hidrolizan los enlaces éster de los triglicéridos. Estas

enzimas están ampliamente distribuidas en el reino animal así como en plantas y procariotes; además de que están muy relacionadas entre ellas [Chapus y cols., 1988; Persson y cols., 1989].

La variante no sinónima S289F es el cambio de una serina por una fenilalanina, es decir, un aminoácido que tiene un cadena lateral pequeña y polar del hidroximetilo por un aminoácido con un grupo R de mayor tamaño e hidrofóbico debido al anillo bencénico. Esta serina se encuentra en una hélice alfa sobre la que además se localiza uno de los aminoácidos que forman parte de la triada catalítica de esta enzima (Histidina 279, se calcula que se encuentra a 15 Å de la posición 289) [The UniProt Consortium, 2019]. Por lo tanto, podemos considerar que esta mutación muy probablemente está afectando la actividad enzimática de la LH debido a efectos a distancia generados por esta sustitución. Durstenfeld y cols., 1994 encontraron que esta mutación depletaba por completo la actividad la enzima LH y que solo era capaz de secretarse en un 12% al estimar mediante inmunoprecipitación e inmunoblot la masa presente en sobrenadantes, mientras que el contenido intracelular de esta proteína no se afectaba.

Por su parte la variante Q355R da por resultado el cambio de una glutamina que tiene como cadena R una amida que es polar por un aminoácido arginina que tiene un grupo guanidino con una carga positiva y que supera en 2 átomos de carbono la cadena lateral de la glutamina. Esta glutamina se encuentra en una hoja β plegada que forma parte del dominio PLAT, este dominio está muy conservado dentro de las familias de proteínas que se asocian a lípidos o a la membrana plasmática [The UniProt Consortium, 2019]. El modelado por homología nos permitió observar que esta mutación generaba una redistribución de la carga superficial de los aminoácidos de la vecindad donde se observó predominancia de superficies con carga positiva a diferencia la proteína nativa que se caracteriza por una extensa región con carga negativa y una pequeña sección neutra.

En este mismo análisis pudimos observar que esta mutación no sinónima modificaba la topología local de la proteína generando patrones diferentes de surcos y crestas, lo cual nos permite considerar que los efectos de esta mutación son aún más dramáticos que la mutación R135C. Sabemos que la proteína LH se encuentra principalmente unida a la membrana plasmática del hepatocito (interacciona con los

proteoglucanos de heparán sulfato) y que interacciona con diferentes lipoproteínas circulantes sobre las que lleva a cabo su función enzimática [Rao y cols., 1982; Kinnunen, 1984; Doolittle y cols., 1987; Ji y cols., 1994; Sanan y cols., 1997]; por lo tanto, las modificaciones en el dominio PLAT (dominio clave para la interacción con las membranas celulares y los lípidos) debido a la mutación Q355R probablemente afecten la localización de la proteína LH, o su interacción con las lipoproteínas.

Los resultados *in vitro* de estas variantes permitieron de alguna manera comprobar estas hipótesis pues observamos claras diferencias entre la proteína nativa y las proteínas mutadas. Se analizó la secreción de las proteínas mutantes en células completas utilizando la técnica de citometría de flujo. Estudiando 10,000 células observamos que las tres mutaciones incluidas en este reporte disminuían dramáticamente la secreción de la proteína LH. La secreción calculada para la proteína nativa es cercana al 60%; dos de las proteínas mutantes (LH R135C y LH Q355R) tiene valores que se encuentran muy por debajo de la mitad.

También realizamos la captura de imágenes de las células completas mediante microscopía con focal. En este caso no realizamos un análisis estadístico pero visualmente logramos ver que en el caso de la proteína nativa las células al ser estimulados con la heparina presentaban una menor fluorescencia lo cual nos permite considerar que esto se debía a que la proteína LH que esta fusionada a la GFP (LH-GFP) era secretada. En el caso de las proteínas mutadas no logramos ver este efecto.

En conjunto los resultados de microscopía con los resultados robustos (en términos de estadística) de citometría de flujo nos permiten considerar que las tres mutaciones estudiadas generan modificaciones en la proteína LH tal que se ve afectada su secreción. Una mejor caracterización de la biología de estas mutantes podría incluir repetir los análisis de microscopía con focal y citometría tiñendo además proteínas de membrana y/o marcadores del aparato de Golgi o retículo endoplásmico (cuyo marcador fluorescente difiera en la longitud de onda de emisión de la GFP). En este caso una cuantificación de la colocalización de la proteína LH y las proteínas en estos organelos nos permitiría acotar donde es que se encuentra el defecto secretorio. A este respecto se conoce un reporte de algunas de las proteínas que interaccionan directamente con la proteína LH (de las 18 proteínas identificadas en este reporte, 5 son

del retículo endoplásmico y fueron corroboradas por inmunoblot) se podrían incluir algunas de las que por su papel en la secreción o procesamiento de las proteínas resultaran más interesantes [Doolittle y cols., 2009].

Los resultados de porcentaje de secreción de la proteína mutada S289F difieren con los resultados reportados por Durstenfeld y cols., 1994 ya que ellos reportan un 12% de secreción de la proteína mutada mientras que nosotros encontramos un 68% con respecto a la proteína nativa. Se debe considerar que ellos realizaron estas estimaciones en base a técnicas de inmunoprecipitación e inmunoblot, mientras que nosotros realizamos estos análisis en la célula completa estimando gracias a la proteína de fusión LH-GFP el índice de fluorescencia inicial y final; para calcular el porcentaje de secreción como la diferencia entre los índices de fluorescencia inicial y final dividiendo este resultado entre el índice de fluorescencia inicial. Los análisis de inmunoblot e inmunoprecipitación están sustentados en la afinidad que los anticuerpos tienen directamente con sus proteínas blanco, en la mayoría de los casos aunque se trate de anticuerpos monoclonales no se conoce la secuencia específica que reconocen, así que no podemos saber si los hallazgos reportados por Durstenfeld son más un efecto de afinidad de los anticuerpos utilizados con la secuencia que incluye el residuo 289.

Otra justificación es que la técnica de inmunoblot es un método semicuantitativo a diferencia de la citometría de flujo es un método cuantitativo y que se utilizaron diferentes células para expresar la proteína LH; (células COS en los ensayos de Durstenfeld y células HEK-293T en nuestro ensayo) por lo tanto, la comparación entre ambos métodos no necesariamente tendría que ser concordante. Lo que debemos destacar es que mediante los dos ensayos podemos observar una disminución de la secreción de la proteína LH.

En este estudio también realizamos la caracterización de la funcionalidad de las proteínas mutantes en base a la cuantificación de la proteína intracelular y en sobrenadantes mediante dos técnicas: ELISA e inmunoblot. Logramos ver resultados similares para las mutantes pues las dos técnicas nos permitieron estimar una menor cantidad de las proteínas mutantes tanto en el interior de la célula como en el sobrenadante lo cual es un reflejo de probables defectos en la síntesis, procesamiento o tráfico de las

proteínas mutantes. Es importante remarcar que en los sobrenadantes logramos ver la proteína que se acumuló durante 12 horas gracias a la secreción estimulada por la heparina y además se sumaba la síntesis de nueva proteína ya que se sabe la heparina también estimula de forma indirecta la expresión del RNAm (12 horas superan en mucho el tiempo para poder analizar efectos en la expresión de mensajero) [Bush y cols., 1989; Ragab y cols., 1995].

De acuerdo a nuestros resultados podemos considerar que la mutante LH Q355R es la que presenta un mayor efecto en la secreción ya que mediante las dos técnicas utilizadas es la que tiene una menor masa en los sobrenadantes (masa que representa el 27.8 % y 26% de la proteína nativa para la técnica de ELISA e inmunoblot, respectivamente) pero en cambio presenta uno de los contenidos de proteína intracelular LH mayores (masa que representa el 39.2 % y 44.1% de la proteína nativa para la técnica de ELISA e inmunoblot, respectivamente). Esto nos permite considerar que el poco contenido extracelular no se justifica solo con la baja síntesis o defectos en el procesamiento, además esta proteína no se está secretando apropiadamente. Estos resultados son concordantes con la técnica de citometría donde observamos que esta mutante es la que tiene una menor secreción pues representa sólo el 18.36% de secreción con respecto a la LH nativa.

Realizando un análisis similar podemos considerar que la proteína mutada LH R135C es la que presenta los mayores defectos en la síntesis y/o procesamiento intracelular ya que en las dos técnicas realizadas su contenido intracelular representan menos del 36% de la masa de la proteína nativa y esto no se corresponde con una mayor secreción con respecto a las otras dos mutantes, ya que presenta un valor intermedio en la masa de proteína LH extracelular (contenido que represente menos del 39% de la proteína LH nativa para ambas técnicas).

Una limitante importante de este estudio es que nosotros no realizamos una caracterización de estas mutantes mediante la medición de actividad enzimática o parámetros cinéticos, por lo que realizar la caracterización de las dos mutantes para las que no se conoce la actividad será importante para tener un panorama más completo de su funcionalidad. En ellos se puede considerar utilizar como control de nuestros ensayos a la mutante S289F la cual se considera anula por completo la actividad enzimática

(ya que se encuentra muy cercana al sitio catalítico) [Durstefeld y cols., 1994, The UniProt Consortium, 2019].

Al igual que para las variantes de promotor también se debe considerar una mejor caracterización de los efectos de las variantes de secuencia codificante *in vivo*; midiendo la actividad LH en el suero de los portadores así como las subfracciones de lipoproteínas HDL.

En conjunto los resultados de este estudio nos permiten considerar que existe heterogeneidad en lo que respecta al tipo y número de variantes del gen *LIPC* capaces de modular los niveles séricos de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el humano.

9. Conclusiones

- Se confirmó el papel de la variante -514 C>T del gen *LIPC* como un modulador genético importante de los niveles de C-HDL en la población mexicana.
- Esta variante (-514 C>T) además disminuye el riesgo del desarrollo de DT2 a través de un incremento de los niveles de C-HDL en población mexicana.
- Las variantes Q355R y -480 C>T se comportan como mutaciones de alta penetrancia, aumentando las HDL en al menos 20mg/dL.
- Las variantes -480 C>T, -514 C>T y -592 G>A disminuyen la actividad transcripcional del gen *LIPC*.
- Las variantes R135C, S289F y Q355R comprometen la secreción y disminuyen el contenido intracelular de la proteína lipasa hepática.
- En conjunto nuestros resultados sugieren una gran heterogeneidad respecto al tipo y número de variantes del gen *LIPC* capaces de modular los niveles séricos de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el humano.

10. Perspectivas

- Redacción de un manuscrito reportando los resultados del estudio de las variantes *in vitro*.
- Estudiar más ampliamente cuales son los defectos en la secreción de las proteínas LH mutadas. Mediante técnicas de microscopia y proteómica.
- Estimar los parámetros cinéticos de las proteínas LH mutadas.
- Estudiar cuales son los factores de transcripción a través de los cuales las variantes de promotor -480 C>T, y -592 G>A ejercen su acción.
- Realizar los ensayos para medir la actividad de LH en los portadores de las variantes.

- Realizar una caracterización de las subfracciones de C-HDL y otros subfenotipos de los portadores de las variantes.
- Se requieren más estudios para explorar posibles interacciones gen-gen y gen-ambiente sobre las dislipidemias y el riesgo de DT2 en nuestra población.

11. Bibliografía

1. Abbasi A, Corpeleijn E, Gansevoort RT, Gans RO, Hillege HL, Stolck RP, Navis G, Bakker SJ, Dullaart RP. Role of HDL cholesterol and estimates of HDL particle composition in future development of type 2 diabetes in the general population: the PREVEND study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(8):E1352–E1359.
2. Abdul-Ghani M A, DeFronzo R A. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:1-19
3. Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Pérez FJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepulveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 2001; 42 (8): 1298-1307.
4. Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P.; Shaw, J. Metabolic syndrome a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine* 2006; 23: 469–480.
5. Ameis, D., G. Stahnke, J. Kobayashi, J. McLean, G. Lee, M. Buscher M. C. Schotz, and H. Will. Isolation and characterization of the human hepatic lipase gene. *J. Biol. Chem* 1990; 265: 6552–6555.
6. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care* 2021; 44(Suppl. 1):S15–S33
7. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27 (Suppl. 1) S5-S10.
8. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2019. *Diabetes Care* 2019; 42 (Supplement 1): S13-S28.
9. Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC: High-density lipoprotein function: recent advances. *J Am Coll Cardiol* 2005, 46:1792-1798.
10. Applebaum, D. Lipases and lecithin: cholesterol acyltransferase in the control of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1995; 6: 130–135.
11. Arellano-Campos O, Gómez-Velasco DV, Bello-Chavolla OY, Cruz-Bautista I, Melgarejo-Hernandez MA, Muñoz-Hernandez L et al. Development and validation of a predictive model for incident type 2 diabetes in middle-aged Mexican adults: the metabolic syndrome cohort. *BMC Endocr Disord* 2019; 19(1):41.
12. Ashwell M, Gunn P, Gibson S. Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2012; 13(3):275–286.
13. Bamberger, M., J. M. Glick, and G. H. Rothblat. Hepatic lipase stimulates the uptake of high density lipoprotein cholesterol by hepatoma cells. *J Lipid Res* 1983; 24: 869-876.
14. Bano G, Rodin D A, White A, O'Rahilly S, and Nussey S S. Is the defect in pro-hormone processing in Type 2 diabetes mellitus restricted to the b cell? *Diabetic Medicine* 2001; 18: 17-21.
15. Baron, R. M., & Kenny, D. A. The moderator–mediator variable distinction in social psychological research: Conceptual, strategic, and statistical considerations. *Journal of Personality and Social Psychology* 1986; 5: 1173-1182.
16. Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Pedroza-Tobías A, Rivera-Dommarco JA. Prevalence of obesity in Mexican adults 2000-2012. *Salud Púb Mex* 2013; 55: S151-60.
17. Benoit P, Emmanuel F, Caillaud JM, Bassinet L, Castro G, Gallix P, Fruchart JC, Branellec D, Deneffe P, Duverger N. Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation* 1999; 99 (1): 105-110.
18. Bhopal R, Unwin N, White M, Yallop J, Walker L, Alberti KG, Harland J, Patel S, Ahmad N, Turner C, Watson B, Kaur D, Kulkarni A, Laker M, Tavridou A. Heterogeneity of coronary heart disease risk factors in Indian, Pakistani, Bangladeshi, and European origin populations: cross sectional study. *BMJ* 1999; 319 (7204): 215-220.
19. Botma GJ, Verhoeven AJ, Jansen H. Hepatic lipase promoter activity is reduced by the C-480T and G-216A substitutions present in the common LIPC gene variant, and is increased by Upstream Stimulatory Factor. *Atherosclerosis* 2001; 154(3):625–632.
20. Breckenridge WC, Little JA, Alaupovic P, Wang CS, Kuksis A, Kakis G, Lindgren F, Gardiner G. Lipoprotein abnormalities associated with a familial deficiency of hepatic lipase. *Atherosclerosis* 1982; 45(2):161–179.
21. Brinkley TE, Halverstadt A, Phares DA, Ferrell RE, Prigeon RL, Hagberg JM, Goldberg AP. Hepatic lipase gene -514C >T variant is associated with exercise training-induced changes in VLDL and HDL by lipoprotein lipase. *J Appl Physiol* 2001; 111(6):1871–1876.

22. Buller, AR; Townsend, CA. Intrinsic evolutionary constraints on protease structure, enzyme acylation, and the identity of the catalytic triad. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110 (8): E653-E661.
23. Bush, S. J., G. A. Martin, R. L. Barnhart, and R. L. Jackson. Heparin induces the expression of hepatic triglyceride lipase in a human hepatoma cell line. *J Biol Chem* 1989; 264: 22474–22479.
24. Carlson, L. A., L. Holmquist, P. Nilsson-Ehle. Deficiency of hepatic-lipase activity in post-heparin plasma in familial hyper-beta-triglyceridemia. *Acta Med Scand* 1986; 219: 435-447.
25. Carlson, R.V., Boyd, K.M., Webb, D.J. The revision of the Declaration of Helsinki: past, present and future. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57: 695–713.
26. Carr MC, Hokanson JE, Deeb SS, Purnell JQ, Mitchell ES, Brunzell JD. A hepatic lipase gene promoter polymorphism attenuates the increase in hepatic lipase activity with increasing intra-abdominal fat in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(11):2701–2707.
27. Carulli L, Rondinella S, Lombardini S, Canedi I, Loria P, Carulli N. Review article: diabetes, genetics and ethnicity. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(Suppl 2):16–19.
28. Cedó L, Santos D, Roglans N, Julve J, Pallarès V, Rivas-Urbina A, Llorente-Cortes V, Laguna JC, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC. Human hepatic lipase overexpression in mice induces hepatic steatosis and obesity through promoting hepatic lipogenesis and white adipose tissue lipolysis and fatty acid uptake. *PLoS One* 2017; 12(12):e0189834.
29. Chang S F, Scharf J G and Will H. Structural analysis of promoter of the hepatic lipase gene. *Eur J Biochem* 1997; 247: 148-159.
30. Chapus, C., M. Rovey, L. Sarda, R. Verger. Minireview on pancreatic lipase and colipase. *Biochimie* 1988; 70: 1223-1234.
31. Chen Y, Wang Y, Zhang J, Deng Y, Jiang L, Song, Wu XS, Hammer JA, Xu T, Lippincott-Schwartz J: Rab10 and myosin-Va mediate insulin-stimulated GLUT4 storage vesicle translocation in adipocytes. *J Cell Biol.* 2012; 198: 545-560.
32. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI: Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 199; 341:240–246.
33. Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004; 305: 869-872.
34. Costa-Urrutia P, Abud C, Franco-Trecu V, Colistro V, Rodríguez-Arellano ME, Granados J, Seelaender M. Genetic susceptibility to pre diabetes mellitus and related association with obesity and physical fitness components in Mexican-Mestizos. *Prim Care Diabetes* 2018; 12(5):416–424.
35. Cui Y, Gavrilova O, Sun R, Zhao H, Gao Bin, and Hennighausen L. Inactivation of hepatic Stat5 results in hepatosteatosis and impaired glucose tolerance. *AACR Meeting Abstracts*, Apr 2006; 2006: 637 - 638.
36. Deeb S S. and Peng R. The C-514T polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter diminishes its activity *J. Lipid Res.* 2000; 41: 155–158
37. Després JP, Ferland M, Moorjani S, Nadeau A, Tremblay A, Lupien PJ, Thériault G, Bouchard C. Role of hepatic-triglyceride lipase activity in the association between intra-abdominal fat and plasma HDL cholesterol in obese women. *Arteriosclerosis* 1989; 9(4):485–492.
38. Dichek LH, Brecht W, Fan J, Ji ZS, McCormick SP, Akeefe H, Conzo L, Sanan DA, Weisgraber KH, Young SG, Taylor JM, MaLHey RW. Overexpression of hepatic lipase in transgenic mice decreases apolipoprotein B-containing and high density lipoproteins. Evidence that hepatic lipase acts as a ligand for lipoprotein uptake. *J Biol Chem* 1998; 273(4):1896–1903.
39. Dichek, H. L., W. Brecht, J. Fan, Z. S. Ji, S. P. McCormick, H. Akeefe, L. Conzo, D. A. Sanan, K. H. Weisgraber, S. G. Young, J. M. Taylor, and R. W. Mahley. Overexpression of hepatic lipase in transgenic mice decreases apolipoprotein B-containing and high density lipoproteins. Evidence that hepatic lipase acts as a ligand for lipoprotein uptake. *J Biol Chem* 1998; 273:1896–1903
40. Dodson, G; Wlodawer, A. Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biochemical Sciences* 1998; 23 (9): 347-352.
41. Donath MY, Ehses JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, Reinecke M: Mechanisms of β -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005; 54: S108-S113.
42. Doolittle, M H; Ben-Zeev, O; Bassilian, S; Whitelegge, J P; Péterfy M, and Wong H. Hepatic lipase maturation: a partial proteome of interacting factors. *J Lipid Res* 2009; 50 (6): 1173-1184.
43. Doolittle, M. H., H. Wong, R. C. Davis, and M. C. Schotz. Synthesis of hepatic lipase in liver and extrahepatic tissues. *J Lipid Res* 1987; 28: 1326-1334.

44. Dugi K.A., Dichek H.L., Santamarina-Fojo S. Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *J Biol. Chem.* 1995; 270:25396-25401.
45. Durstenfeld A, Ben-Zeev O, Reue K, Stahnke, Doolittle M H. Molecular Characterization of Human Hepatic Lipase Deficiency In Vitro Expression of Two Naturally Occurring Mutations. *Heart Association. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1994; 14; 381-385.
46. Duverger N, Viglietta C, Berthou L, Emmanuel F, Tailleux A, Parmentier-Nihoul L, Laine B, Fievet C, Castro G, Fruchart JC, Houbebine LM, Deneffe P. Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein A-I in the liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16 (12): 1424-1429.
47. Edelstein C., F. Kezdy, A. M. Scanu; B. W. Shen. Apolipoproteins and the structural organization of plasma lipoproteins: Human plasma high-density lipoprotein-3. *J Lipid Res* 1979; 20: 143-153.
48. Fang DZ, Liu BW. Polymorphism of LH +1075C, but not -480T, is associated with plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein AI in men of a Chinese population. *Atherosclerosis* 2000; 161(2):417-424.
49. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36 (2): 211-228.
50. Fiser A, Do R.K.G, Sali A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Sci* 2000; 9 (9) 1753-1773.
51. Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, et al. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 2002; 51: 1596-1600.
52. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6):499-502.
53. Gatti A, Maranghi M, Bacci S et al. Poor glycemic control is an independent risk factor for low HDL cholesterol in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32(8):1550-1552.
54. Genest J Jr, Marcil M, Denis M, Yu L. High density lipoproteins in health and in disease. *J Investig Med* 1999; 47 (1): 31-42.
55. Genetic and Environmental Influences on the Correlations between Traits of Metabolic Syndrome and CKD. *CJASN* 2019; 14 (11): 1590-1596.
56. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP et al., High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989a; 79: 8-15.
57. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989b; 321 (19): 1311-1316.
58. Gotto A. M., H. R: Pownall, R. J. Havel. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986; 128: 3-41.
59. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999; 100 (13): 1481-1492.
60. Grundy, S. M., H. B. Brewer, J I Cleeman, S. C. Smith, C.Lenfant and for the Conference Participants Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation* 2004; 109: 433-438.
61. Guerra-García MT, 2008. Identificación de variantes alélicas con posible efecto funcional en el gen de la lipasa hepática como moduladoras de los niveles de colesterol HDL en individuos mexicanos. UNAM
62. Guerra R, Wang J, Grundy SM, Cohen JC. A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(9):4532-4537.
63. Guzmán JN, Madrigal BE: Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 2003; 28: 14-23.
64. Hadzopoulou-Cladaras, M. and P. Cardot. Identification of a cis-acting negative DNA element which modulates human hepatic triglyceride lipase gene expression. *Biochemistry* 1993; 32: 9657-9667.
65. Hayes, A. F. Beyond Baron and Kenny: Statistical mediation analysis in the new millennium. *Communication Monographs* 2009; 76 (4): 408-420.
66. Hegele RA, Harris SB, Brunt JH, Young TK, Hanley AJ, Zinman B, Connelly PW. Absence of association between genetic variation in the LIPC gene promoter and plasma lipoproteins in three Canadian populations. *Atherosclerosis* 1999; 146(1):153-160.
67. Heller DA, de Faire U, Pedersen NL, Dahlen G, McClearn GE. Genetic and environmental influences on serum lipid levels in twins. *N Engl J Med* 1993; 328 (16): 1150-1156.

68. Hoffer M J. V., Sniederb H, Brediec S J. H., Demackerc P N. M., J J. P. Kasteleind, Frants R R. and Stalenhoef A F. H. The V73M mutation in the hepatic lipase gene is associated with elevated cholesterol levels in four Dutch pedigrees with familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2000; 151 (2): 443-450.
69. Huayanay-Espinoza, I E; Guerra-Castañon, F; Lazo-Porras, M; Castaneda-Guarderas A; Thomas N; Garcia-Guarniz A-L; Valdivia-Bustamante A A; and Málaga G; Metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus in a public hospital in Peru: a cross-sectional study in a low-middle income country. *PeerJ*. 2016; 4: e2577.
70. INEGI. Comunica de prensa Num. 61/21. 27 de Enero del 2021.
71. Isaacs, A., F. A. Sayed-Tabatabaei, O. T. Njajou, J. C. M. Witteman and C. M. van Duijn. The -514 C→T hepatic lipase promoter region polymorphism and plasma lipids: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3858-3863.
72. ENSANUT, 2018. Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), "Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. Disponible en https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf.
73. Iverin PH and Brunzell JD. Human adipose tissue lipoprotein lipase changes with feeding and relation to post-heparin enzyme. *Am J Physiol* 1985; 249: E107-E114.
74. Jackerott Malene, Annette Møldrup, Peter Thams, Elisabeth D. Galsgaard, Jakob Knudsen, Ying C. Lee, and Jens Høiriis Nielsen. STAT5 Activity in Pancreatic β -Cells Influences the Severity of Diabetes in Animal Models of Type 1 and 2 Diabetes. *Diabetes*, Oct 2006; 55: 2705 - 2712.
75. Jackson, R. L. (1983) Lipoprotein lipase and hepatic lipase. In: Boyer, P. D. (Ed.), *The Enzymes*, 3rd ed., vol. 16. Academic Press, New York, pp.141-181.
76. Jansen, H., A. J. Verhoeven, L. Weeks, J. J. Kastelein, D. J. Halley, A. van den Ouweland, J. W. Jukema, J. C. Seidell, J. C. Birkenhäger. Common C-to-T substitution at position -480 of the hepatic lipase promoter associated with a lowered lipase activity in coronary artery disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2837–2842.
77. Jansen, H., A. van Tol, and W. C. Hülsmann. On the metabolic function of heparin releasable liver lipase. *Biochem biophys Res Commun* 1980; 92: 53-59.
78. Jensen, G. L., B. Daggy, and A. Bensadoun. Triacylglycerol lipase, monoacylglycerol lipase and phospholipase activities of highly purified rat hepatic lipase. *Biochim Biophys Acta* 1982; 710: 464-470.
79. Ji, Z-S., S. J. Lauer, S. Fazio, A. Bensadoun, J. M. Taylor, and R. W. Mahley. Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipase-secreting hepatoma cells in culture. *J Biol Chem* 1994; 269: 13429–13436.
80. Jones, D. R., R. J. Schmidt, R. T. Pickard, P. S. Foxworthy, and P. I. Eacho. Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *J Lipid Res*. 2002; 43: 383-391.
81. Juo SH, Han Z, Smith JD, Colangelo L, Liu K. Promoter polymorphisms of hepatic lipase gene influence HDL(2) but not HDL(3) in African American men: CARDIA study. *J Lipid Res* 2001; 42(2):258–264.
82. Kahn, B. B., & Flier, J. S. Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; 106 (4), 473–481.
83. Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., ... MacArthur, D. G. (2019). Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. In *bioRxiv* (p. 531210)
84. Karczewski, K.J., Francioli, L.C., Tiao, G. et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020; 581: 434–443.
85. Katzel LI, Coon PJ, Busby MJ, Gottlieb SO, Krauss RM, Goldberg AP. Reduced HDL2 cholesterol subspecies and elevated postheparin hepatic lipase activity in older men with abdominal obesity and asymptomatic myocardial ischemia. *Arterioscler Thromb* 1992;12:814–823.
86. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, ZaLHer AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002; 12(6):996–1006.
87. Kinnunen, P. K. 1984. Hepatic endothelial lipase: isolation, some characteristics, and physiological role. *In Lipases*. B. Borgstrom and H. L. Brockman, Editors. Elsevier Scientific Publishers, New York, 307-382.
88. Knoblauch H, Bauerfeind A, Toliat MR, Becker C, Luganskaja T, Günther UP, Rohde K, Schuster H, Junghans C, Luft FC, Nürnberg P and Reich JG. Haplotypes and SNPs in 13 lipid-relevant genes explain most of the genetic variance in high density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol. *Hum Mol Gen* 2004; 13: 993-1004.
89. Kuusi, T., E. A. Nikkilä, M. R. Taskinen, P. Somerharju and C. Ehnholm. Human postheparin plasma hepatic lipase activity against triacylglycerol and phospholipid substrates. *Clin Chim Acta* 1982; 122: 39-45.

90. Kuusi, T., P. Saarinen, and E. A. Nikkilä. Evidence for the role of hepatic endothelial lipase in the metabolism of plasma high density lipoprotein₂ in man. *Atherosclerosis*. 1980; 36: 589–593.
91. Kuusi, T., Y. A. Kesaniemi, M. Vuoristo, T. A. Miettinen, and M. Koskenvuo. Inheritance of high density lipoprotein and lipoprotein lipase and hepatic lipase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1987; 7: 421–425.
92. Lambert, G., M. B. Chase, K. Dugi, A. Bensadoun, H. B. Brewer, Jr., and S. Santamarina-Fojo. Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. *J. Lipid Res*. 1999; 40: 1294–1303.
93. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, Maglott DR. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res*. 2014; 1: 42(1):D980–D985.
94. Le Roith D and Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 2001; 24 (3) 71–82.
95. Lewis, G.F., and D. J. Rader. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005; 96: 1221–32.
96. Little, J. A., and P. W. Connelly. Familial hepatic lipase deficiency. *Adv Exp Med Biol* 1986; 201: 253–260.
97. Lu X, Huang J, Mo Z, He J, Wang L, Yang X et al. Genetic susceptibility to lipid levels and lipid change over time and risk of incident hyperlipidemia in Chinese populations. *Circ Cardiovasc Genet* 2016; 9(1):37–44.
98. MacKinnon, D. P. (2008). *Introduction to Statistical Mediation Analysis*. New York: Erlbaum.
99. Maedler K: Beta cells in type 2 diabetes –a crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes Obes Metab*. 2008; 10: 408–420.
100. Mahley RW, Palaoglu KE, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois AM, Cheung V, Onat H, Fulks P, Mahley LL, Vakar F, et al. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1995; 36 (4): 839–859.
101. McKnight S L, M D Lane, and S Gluecksohn-Waelsch. Is CCAAT/enhancer-binding protein a central regulator of energy metabolism? *Genes & Dev.*, Dec 1989; 3: 2021 - 2024.
102. Mezdour H, Jones R, Dengremont C, Castro G, Maeda N. Hepatic lipase deficiency increases plasma cholesterol but reduces susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Biol Chem* 1997; 272(21):13570–13575.
103. Miranda-Garduño LM y Reza-Albarrán A. Obesidad, inflamación y diabetes. *Gac Méd Méx* 2008 144 (1): 39–46.
104. Muthén LK, Muthén BO (2017) *Mplus user's guide*, 8th edition. Muthén & Muthén, Los Angeles, USA.
105. Mykkänen L, Kuusisto J, Pyörälä K, Laakso M. Cardiovascular disease risk factors as predictors of type 2 (non-insulindependent) diabetes mellitus in elderly subjects. *Diabetologia* 1993; 13; 36(6):553–559.
106. Nilsson J, Jovinge S, Niemann A, Reneland R, Lithell H. Relation between plasma tumor necrosis factor- α and insulin sensitivity in elderly men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Biol* 1998 ; 18 : 1199 – 1202.
107. Ochoa-Guzmán A, Moreno-Macías H, Guillén-Quintero D, Chávez-Talavera O, Ordoñez-Sánchez ML, Segura-Kato Y, Ortíz V et al. R230C but not -565C/T variant of the ABCA1 gene is associated with type 2 diabetes in Mexicans through an effect on lowering HDL-cholesterol levels. *J Endocrinol Investig* 2020; 43(8):1061–1071.
108. Oka, K., K. Ishimura-Oka, M. J. Chu, and L. Chan. Transcription of the human hepatic lipase gene is modulated by multiple negative elements in HepG2 cells. *Gene* 1996; 180: 69–80.
109. Parini P; Bo Angelin; ; Mats Rudling Arteriosclerosis. Importance of Estrogen Receptors in Hepatic LDL Receptor Regulation. , *Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997; 17: 1800–1805.
110. Perret, Laurence Mabile, Laurent Martinez, François Tercé, Ronald Barbaras, and Xavier Collet Hepatic lipase: structure/function relationship, synthesis, and regulation Bertrand. *J. Lipid Res*. 2002; 43: 1163–1169.
111. Persson, B., G. Bengtsson-Olivecrona, S. Enerback, T. Olivecrona, H. Jornvall. Structural features of lipoprotein lipase. Lipase family relationships, binding interactions, non-equivalence of lipase cofactors, vitellogenin similarities and functional subdivision of lipoprotein lipase. *Eur J Biochem* 1989; 179:39–45.
112. Pétremand J, Puyal J, Chatton J-Y, Duprez J, Allagnat F, Frias M, James RW, Waeber G, Jonas J-C, Widmann C. HDLs protect pancreatic β -cells against ER stress by restoring protein folding and trafficking. *Diabetes*. 2012; 61 (5):1100–1111.
113. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 1997; 40 :1286 – 1292.
114. Pihlajamäki J, Karjalainen L, Karhapää P, Vauhkonen I, Taskinen MR, Deeb SS, Laakso M. G-250A substitution in promoter of hepatic lipase gene is associated with dyslipidemia and insulin resistance in healthy control subjects and in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(7):1789–1795.
115. Posadas-Sánchez R, Ocampo-Arcos WA, López-Urbe ÁR, Posadas-Romero C, Villarreal-Molina T, León EÁ, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Cardoso-Saldaña G, Medina-Urrutia A, Vargas-Alarcón G (2015)

- Hepatic lipase (LIPC) C-514T gene polymorphism is associated with cardiometabolic parameters and cardiovascular risk factors but not with fatty liver in Mexican population. *Exp Mol Pathol* 2015; 98(1):93–98.
116. Ragab, A., U. Rittner, C. Danet, J. Ragab, H. Chap, and B. P. Perret. Competitive PCR as a tool to study hepatic lipase regulation in Hep G2 cells. *Bull Mol Biol and Med* 1995; 20: 19–21.
 117. Raghavan S, Porneala B, McKeown N, Fox CS, Dupuis J, Meigs JB. Metabolic factors and genetic risk mediate familial type 2 diabetes risk in the Framingham Heart Study. *Diabetologia* 2015; 58(5):988–996.
 118. Rao, S. N., C. Cortese, N. E. Miller, Y. Levy, and B. Lewis. Effects of heparin infusion on plasma lipoproteins in subjects with lipoprotein lipase deficiency. Evidence for a role of hepatic endothelial lipase in metabolism of high-density lipoprotein subfractions in man. *FEBS Lett* 1982; 150: 255-259.
 119. Reaven GM, Bernstein R, Davis B, Olefsky JM. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? *American Journal of Medicine* 1976; 60: 80–8. Diamond J. The double puzzle of diabetes. *Nature* 2003; 423 599-602.
 120. Risheng Ye, Toshiharu Onodera, Philipp E Scherer. Lipotoxicity and β Cell Maintenance in Obesity and Type 2 Diabetes. *Journal of the Endocrine Society* 2019; 3 (3): 617–631.
 121. Roche E. Type 2 diabetes: gluco-lipo-toxicity and pancreatic β -cell dysfunction. *Ars Pharmaceutica* 2003; 44: (4) 313-332.
 122. Rodríguez B Y; Ramírez L; Alvarado T; Cruz M; Peralta J. Prevalence of Dyslipidemia and Cardiovascular Risk in Patients with Diabetes Mellitus type 2. *Aten Fam.* 2019; 26 (3): 81-84.
 123. Rohrer L, Hersberger M, von Eckardstein A. High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15(3):269–278.
 124. Rufibach L E., Duncan Stephen A., Battle Michele, and Deeb Samir S. Transcriptional regulation of the human hepatic lipase (LIPC) gene promoter. *J. Lipid Res.* 2006; 47: 1463 - 1477.
 125. Sali A, Blundell T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993; 234 (3) 779-815.
 126. Sanan, D. A., J. Fan, A. Bensadoun, and J. M. Taylor. Hepatic lipase is abundant on both hepatocyte and endothelial cell surfaces in the liver. *J Lipid Res* 1997; 38: 1002–1013.
 127. Sriver, C. R., A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle, B. Childs, K. W. Kinzler, B. Vogelstein. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill USA, 2001; V II pp 2706, 2709, 2915- 2918, 2925.
 128. Secretaría de Salud. *Salud pública de México* 2002; 44 (6): noviembre-diciembre.
 129. Sensel, M. G., A. Legrand-Lorans, M. E. Wang, and A. Bensadoun. Isolation and characterization of clones for the rat hepatic lipase gene upstream regulatory region. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1048: 297–302.
 130. Sesti, G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; 20 (4) 665-679.
 131. Sharabi Y: Management of the unholy trinity diabetesobesity-hypertension (diabetesotension). *Diabetes Metab Res Rev.* 2012; In press.
 132. Schmidt MI. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (atherosclerosis risk in communities study): a cohort study. *Lancet* 1999;353:1649-1652.
 133. SIGMA Type 2 Diabetes Consortium, Estrada K, Aukrust I, Bjørkhaug L, Burt NP, Mercader JM, García-Ortiz H et al. Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a Latino population. *JAMA* 2014; 311(22):2305–2314.
 134. Sigrist CJA, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Le Saux V, Bairoch A, Hulo N. ProRule: a new database containing functional and structural information on PROSITE profiles. *Bioinformatics* 2005; 21 (21):4060-4066.
 135. Singh A, Babyak MA, Nolan DK, Brummett BH, Jiang R, Siegler IC, Kraus WE, Shah SH, Williams RB, Hauser ER. Gene by stress genome-wide interaction analysis and path analysis identify EBF1 as a cardiovascular and metabolic risk gene. *Eur J Hum Genet* 2015; 23(6):854–862
 136. Sirvent, A., A. J. M. Verhoeven, H. Jansen, V. Kosykh, R. Darteil, D. W. Hum, J.-C. Fruchart, and B. Staels. Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *J. Lipid Res* 2004; 45: 2110-2115.
 137. Sivitz, W. Lipotoxicity and glucotoxicity in type 2 diabetes, Effects on development and progression. *Postgraduate Medicine* 2001; 109(4): 55 –64.
 138. Sobel, M. E. Asymptotic confidence intervals for indirect effects in structural equation models. *Sociological Methodology* 1982; 13: 290–312.
 139. Su Zhiguang, Zhang Sizhong, Nebert Daniel W., Zhang Li, Huang Dejia, Hou Yiping, Liao Linchuan, and Xiao Cuiying. A novel allele in the promoter of the hepatic lipase is associated with increased concentration of HDL-C and decreased promoter activity. *J. Lipid Res.* 2002; 43:1595–1601.
 140. Tall Alan R., Wang Nan, and Mucksavage Phillip. Is it time to modify the reverse cholesterol transport model? *J. Clin. Invest.* 2001; 108: 1273-1275.

141. Teran-Garcia Margarita, Santoro Nicola, Rankinen Tuomo, Bergeron Jean, Rice Treva, Leon Arthur S., Rao D.C., Skinner James S., Bergman Richard N., Després Jean-Pierre, and Bouchard Claude. Hepatic Lipase Gene Variant -514C>T Is Associated With Lipoprotein and Insulin Sensitivity Response to Regular Exercise: The HERITAGE Family Study. *Diabetes* 2005; 54: 2251 - 2255.
142. The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 2019; 47:D506-D515.
143. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49:D1.
144. Todorova Boryana, Kubaszek Agata, Pihlajamäki Jussi, Lindström Jaana, Eriksson Johan, Valle Timo T., Hämmäläinen Helena, Ilanne-Parikka Pirjo, Keinänen-Kiukaanniemi Sirkka, Tuomilehto Jaakko, Uusitupa Matti, and Laakso Markku. The G-250A Promoter Polymorphism of the Hepatic Lipase Gene Predicts the Conversion from Impaired Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes Mellitus: The Finnish Diabetes Prevention Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: 2019 - 2023.
145. Umpierrez GE, Casals MMC, Gebhart SSP, Mizon PS, Clark WS, Phillips LS: Diabetic ketoacidosis in obese African-Americans. *Diabetes* 1995; 44: 79-85.
146. van't Hooft, F. M., B. Lundahl, F. Ragona, F. Karpe, G. Olivecrona, A. Hamsten Functional Characterization of 4 Polymorphisms in Promoter Region of Hepatic Lipase Gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1335-1339.
147. Vanderweele TJ, Vansteelandt S. Odds ratios for mediation analysis for a dichotomous outcome. *Am J Epidemiol* 2010; 172(12):1339-1348.
148. Vaulont, S., A. Kahn. Transcriptional regulation of metabolic regulation genes by carbohydrates. *FASEB J* 1994; 8: 28-35.
149. Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, Shamah-Levy T, Avila MA, Gaona B, Rebollar R, Hernández L. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud Publica Mex* 2010a; 52(Suppl 1):S19-S26.
150. Villalpando, S., Shamah-Levy, T., & Rojas, R. Trends for type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors in Mexico from 1993-2006. *Salud Pública De México* 2010; 52, S72-S79.
151. Vollenweider P, von Eckardstein A, Widmann C. HDLs, diabetes, and metabolic syndrome. *Handb Exp Pharmacol* 2015; 224:405-421.
152. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21 (1): 13-27.
153. Wang, D., and H. S. Sul. Upstream stimulatory factors bind to insulin response sequence of the fatty acid synthase promoter. USF1 is regulated. *J Biol Chem* 1995; 270: 28716-28722.
154. Weissglas-Volkov D, Aguilar-Salinas CA, Nikkola E, Deere KA, Cruz-Bautista I, Arellano-Campos O, Muñoz-Hernandez LL, Gomez-Munguia L, Ordoñez-Sánchez ML, Reddy PM, Lusi AJ, Matikainen N, Taskinen MR, Riba L, Cantor RM, Sinsheimer JS, Tusie-Luna T, Pajukanta P. Genomic study in Mexicans identifies a new locus for triglycerides and refines European lipid loci. *J Med Genet* 2013; 50(5):298-308.
155. Whitfield JB, Martin NG. Plasma lipids in twins. Environmental and genetic influences. *Atherosclerosis* 1983; 48 (3): 265-277.
156. Wilson PW, Meigs JB, Sullivan L, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB Sr. Prediction of incident diabetes mellitus in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study. *Arch Intern Med* 2007; 167(10):1068-1074.
157. Xu Chen, Istiak Bhuiyan, Ralf Kuja-Halkola, Patrik K. E. Magnusson and Per Svensson
158. Zambon, A., S. S. Deeb, A. Bensadoun, K. E. Foster, and J. D. Brunzell. In vivo evidence of a role for hepatic lipase in human apoB-containing lipoprotein metabolism, independent of its lipolytic activity. *J. Lipid Res.* 2000; 41: 2094-2099.

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Registro Comité de Ética REF. 1518)

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

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

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

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

Firma del Paciente _____

Firma del Investigador _____

Testigo 1 (firma) _____

Testigo 2 (firma) _____

CDMX. ____ de _____ del _____ .

Investigador Responsable **Dra. María Teresa Tusié Luna**

ANEXO 2

CUESTIONARIO

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Fecha: ____/____/____				Pariente:				Clasif: _____		No.Exp.		
Fecha nacimiento ____/____/____				Edad				Estado civil				
Nombre:								Teléfono				
Domicilio:								E-mail				
Lugar de nacimiento:								Nivel socioeconómico calculado:				
ANTROPOMETRIA												
Peso	Talla	IMC	C. Abd	C Cadera	Indice Cintura/Cadera		P. Sistólica	P. Diastólica				
kg	cm		cm	cm								
ESTUDIOS DE LABORATORIO											FECHA: _____	
TG	CT	HDL	LDL	Glu	Cre	INS	HBA1	ApoA1	Apo B	Leptin	adiponec	PCR
CONSUMO DE TABACO Y ALCOHOL												
¿Actualmente fuma?						Sí (1) NUNCA (0)			_____			
						No (2)						
¿Cuántos cigarrillos fuma (fumaba) y con qué frecuencia?						Diario (1)			_____			
						Semanal (2)			Frecuencia			
						Mensual (3)			_____			
						Ocasional(4)			Cantidad			
¿Durante cuánto tiempo ha fumado regularmente?						Menos de un mes (0)			Años _____			
¿Actualmente toma alcohol?						Nunca (0)			_____			
						Si (1)			_____			
						No (2)			_____			
Aproximadamente, ¿cuántas copas toma (tomaba), con que frecuencia, durante cuánto tiempo?						Diario (1)			Frecuencia _____			
						Semanal (2)			Cantidad _____			
						Mensual (3)			Meses _____			
						Ocasional (4)			Años _____			
ACTIVIDAD FÍSICA						SI		NO		¿Cuál?		
# VECES A LA SEMANA								¿Tiene alguna incapacidad para moverse?				
DURACIÓN												
ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES												
	¿Vive? (Si/No)	Edad (años)	Causa	DM (Si/no)	C. I (Si/no)	Nefrop. diabética (Si/no)	Dislipidemia (Si/no)	Obesidad (Sí/No)	Otra			
Padre												
Abo p	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Aba p	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Madre												

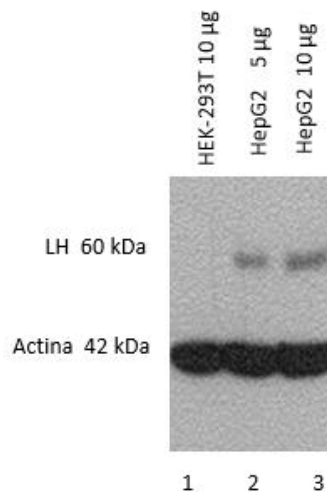
Abo m									
Aba m									
Hermanos									
Otros									
LUGAR DE NACIMIENTO					ESCOLARIDAD				
Padre									
Madre									
Abuelo Paterno									
Abuela paterna									
Abuelo materno									
Abuela materna									
ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS									
ANT. GINECO-OBSTETRICOS			Menarca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

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

ANEXO 3

Se realizó un inmunoblot para identificar la proteína LH en la línea celular HepG2.

La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% separado por 2.5 horas a 120 Volts. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF por 12 horas a 50 volts y una temperatura de 4°C. El bloqueo se realizó por 1 hora con TBS-Tween (0.1%) y 5% de leche. El anticuerpo primario monoclonal anti-LH (Santa Cruz) se diluyó 1:2,000 y se incubó 4 horas en TBS-Tween más 3% de albúmina. El anticuerpo secundario anti IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz), se incubó por una hora y se preparó en una dilución 1:15,000 en TBS-Tween más 5% de leche. La membrana PVDF se puso en contacto con los reactivos GE Healthcare Amersham™ ECL Select los cuales mediante reacciones acopladas generan quimioluminiscencia en presencia de la peroxidasa de rábano. Para el revelado se utilizó una placa radiográfica, el revelador y el fijador de marca Kodak.



Auto radiografía del inmunoblot contra la LH humana. En el primer carril se observan 10 µg de proteínas de la línea celular HEK-293T que se usaron como control negativo y el carril 2 y 3 representan las proteínas endógenas de la línea HepG2. La línea 2 corresponde a 5µg de proteínas totales y la línea 3 corresponde a 10µg de proteínas.

En la línea celular HepG2 la proteína LH fue observable en ambas masas, y en la línea HEK-293T no se observó la proteína. Por lo cual consideramos que la línea HepG2 podía ser utilizada para los estudios *in vitro* de las variantes de promotor, ya que contiene el contexto necesario de factores de transcripción para la expresión del gen *LIPC*.



The -514C>T polymorphism in the *LIPC* gene modifies type 2 diabetes risk through modulation of HDL-cholesterol levels in Mexicans

M. T. Guerra-García¹ · H. Moreno-Macías^{1,2} · A. Ochoa-Guzmán¹ · M. L. Ordoñez-Sánchez¹ · R. Rodríguez-Guillen¹ · P. Vázquez-Cárdenas³ · V. M. Ortiz-Ortega⁴ · M. Peimbert-Torres⁵ · C. A. Aguilar-Salinas⁶ · M. T. Tusié-Luna^{1,7}

Received: 6 March 2020 / Accepted: 25 June 2020
© Italian Society of Endocrinology (SIE) 2020

Abstract

Purpose Both type 2 diabetes (T2D) and low levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) are very prevalent conditions among Mexicans. Genetic variants in the *LIPC* gene have been associated with both conditions. This study aimed to evaluate the association of the -514C > T (rs1800588) *LIPC* gene polymorphism with different metabolic traits, particularly the effects of this polymorphism on HDL-C plasma levels and T2D risk.

Methods Mediation analysis was used to assess the direct and indirect effects of the -514C>T *LIPC* gene variant on HDL-C levels, T2D risk, and body mass index (BMI), in 2105 Mexican mestizo participants. We also assessed the functional effect of the -514C>T *LIPC* variant on the promoter activity of a reporter gene in the HepG2 cell line.

Results Direct effects show that the -514C>T *LIPC* polymorphism is significantly associated with increased HDL-C plasma levels ($\beta = 0.03$; $p < 0.001$). The -514C>T variant resulted in an indirect protective effect on T2D risk through increasing HDL-C levels ($\beta = -0.03$; $p < 0.001$). Marginal direct association between -514C>T and T2D was found ($\beta = 0.08$; $p = 0.06$). Variables directly influencing T2D status were European ethnicity ($\beta = -7.20$; $p < 0.001$), age ($\beta = 0.04$; $p < 0.001$), gender ($\beta = -0.15$; $p = 0.017$) and HDL-C ($\beta = -1.07$; $p < 0.001$). In addition, we found that the -514C>T variant decreases the activity of *LIPC* promoter by 90% ($p < 0.001$).

Conclusions The -514C>T polymorphism was not directly associated with T2D risk. HDL-C acts as a mediator between -514C>T *LIPC* gene variant and T2D risk in the Mexican population.

Keywords HDL · HDL-C · *LIPC* · Type 2 diabetes · rs1800588

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s40618-020-01346-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ M. T. Tusié-Luna
mttusie@gmail.com

¹ Unit of Molecular Biology and Genomic Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga #15, Belisario Domínguez, Sección XVI, Tlalpan, 14080 Mexico City, Mexico

² Economy Department, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

³ Obesity Clinic, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Mexico City, Mexico

Introduction

Type 2 diabetes represents a group of conditions characterized by chronically increased glucose levels having both environmental and genetic underlying causes [1–3]. According to a population-based national survey performed in 2006, the prevalence of type 2 diabetes (T2D) in the Mexican adult

⁴ Department of Physiology of Nutrition, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

⁵ Nature Sciences Department, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

⁶ Division of Nutrition, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

⁷ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

population was 14.4% [4]. In addition, hypoalphalipoproteinemia (HA) or low plasma levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) is one of the most common dyslipidemias in Mexicans, with an estimated prevalence of 50% in the adult population [5]. In some prospective studies, low HDL-C plasma levels are recognized as an important risk factor for T2D [6, 7]. In contrast, higher levels of HDL-C are strongly and independently associated to a lower risk of future T2D [8].

More than 40 genes are known to influence HDL-C levels; among those, the *LIPC* gene accounts for a substantial fraction (~ 25%) of the variation of the plasma concentrations of this lipoprotein [9]. The Lipase C, hepatic type (*LIPC*) gene encodes for the hepatic lipase (HL), an enzyme catalyzing the hydrolysis of triacylglycerides and phospholipids in chylomicron remnants, intermediate density lipoproteins and HDLs (high-density lipoprotein) [10]. The -514C>T (rs1800588) promoter variant of the *LIPC* gene is common in Mexicans, and it is part of a haplotype comprising three additional genetic variants (-250G>A, -710T>C, and -763A>G), all in complete linkage disequilibrium, as it has been previously reported [9]. The -514C>T variant of the *LIPC* gene has been associated with low hepatic lipase activity and elevated HDL-C plasma levels [11–13]. In addition, the -250G>A variant was linked with T2D conversion in Finnish individuals with impaired glucose tolerance [14] and with other T2D-related phenotypes, such as insulin resistance and metabolic syndrome [15, 16].

In the present study, we aim to analyze the effect of the -514C>T *LIPC* variant on HDL-C plasma levels and its possible association to different metabolic traits, including T2D-related phenotypes, through mediation analysis, a powerful tool to uncover causality and the relationship among different variables [17] in a sample of 2105 Mexican-mestizos.

Methods

Study population

Mexican-mestizo individuals between 18 and 70 years old (with parents and grandparents born in Mexico) were selected from a population-based cohort. Selection criteria as well as clinical and biochemical characteristics of the entire cohort were previously published [18]. The studied subjects participated in one or both GWAS, namely GWAS-TG [19] and GWAS-T2D [20]. A total of 2105 subjects having both *LIPC* genotype and relevant clinical phenotypes were included.

The local Research and Ethics Committees approved this study. The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki [21]. All individuals provided written informed consent.

Population stratification correction

Given the participants in this study had participated in one or two GWAS studies: GWAS-T2D [20] and GWAS-TG [19], the principal components (PCs) were available. The correlation between the first PCs of GWAS-T2D (PC-T2D) and GWAS-TG (PC-TG) was calculated; because the strong correlation between them, using a linear regression model, the values of the first PC-T2D was imputed for those participants that only had PC-TG. Therefore, a single index of ethnicity was used for adjusting for population stratification.

Clinical and laboratory analyses

Anthropometric measurements were taken using standard techniques: weight with light clothing using digital scales and height without shoes using fixed stadiometer. Blood pressure was measured using calibrated mercury sphygmomanometer. Body mass index (BMI) was calculated as weight (in kg) divided by height squared (in m²), and waist-to-height ratio (WHtR) was assessed dividing waist size by height (both of them measured in cm). Venous blood samples were taken after a 12 h fasting, samples for DNA extraction were put into EDTA-vacutainer tubes. Measurement of fasting lipid levels and glucose were performed with commercially available standardized methods. Serum low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels were calculated using the Friedewald formula [22]. However, for subjects with triglycerides (TG)>400 mg/dL, LDL-C values were not calculated, as the Friedewald equation cannot be reliably utilized with such high TG values [22].

Diagnosis of type 2 diabetes (T2D) was considered when fasting glucose was ≥ 7 mmol/L (≥ 126 mg/dL) or previous diagnosis of diabetes [23]. Hypertension status was taken into account when systolic blood pressure was ≥ 130 mm/Hg or diastolic blood pressure was ≥ 85 mm/Hg [24].

Genomic DNA was extracted from total blood samples using a QIAamp 96 DNA Blood kit, Qiagen®. The -514C>T polymorphism (rs1800588) was genotyped in all individuals using Taqman probe on an ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR system, according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA). In addition, about 2.5% of the individuals were sequenced using direct DNA sequencing method, 100% of the genotypes correlated to those obtained through a Taqman probe.

Cell culture

HepG2 cells at the passage 20–35 were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) with 5% CO₂ and 95% air. The medium

was supplemented with 10% fetal calf serum (previously inactivated with heat), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin (Sigma-Aldrich).

Reporter assays

The human *LIPC* promoter region spanning from nucleotide – 639 to + 29 bp from the main transcription start site [12] was PCR-amplified and was ligated into the pGL3 plasmid that encodes firefly luciferase (Promega, USA), using KpI and HindIII restriction enzymes. The promoter activity was analyzed using two sets of reporter gene constructs. The first one contains -514C allele and site-directed mutagenesis was used to introduce a T allele at this position [12]. The mutagenized construct was verified by direct Sanger sequencing. HepG2 cells were plated in 6-well plates 3×10^5 cells and grown to 70–80% confluence, then both constructs and the internal control Renilla luciferase-expressing plasmid pRL-TK (Promega, USA) were transiently transfected using lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. After 24 h, the cells were lysed and luciferase activity was analyzed using a dual-luciferase reporter assay (Promega, USA) as relative light units with a BD Monolight 3010C luminometer (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). The results were calculated as the ratio of firefly luciferase activity over Renilla luciferase activity and expressed as percentages. The assays were conducted in three independent experiments, each one repeated three times ($n = 9$).

Statistical analysis

Quantitative variables are expressed as medians and interquartile range (IQR), accordingly. Categorical variables are expressed as percentages. To compare quantitative variables between two or three groups, Student's *t* test or Mann–Whitney *U* test and ANOVA or Kruskal–Wallis were performed accordingly. Dunn–Bonferroni post hoc method was used for multiple comparison purposes. Chi square was used to compare nominal variables in bivariate analyses, among two or more nominal categories. Hardy–Weinberg equilibrium was determined using Chi-squared tests using data from participants without diabetes. In all the analyses where -514C>T polymorphism was included, an additive genetic model was considered. To evaluate the direct and indirect effects between -514C>T variant and T2D (included as case or control), mediation analysis, with log-transformed HDL-C levels as mediating variable, was performed using path analysis in Mplus v.8.3 software [25]. The role of BMI as mediating variable between the genetic variant and T2D or HDL-C was also assessed. All the models were adjusted for ethnicity, age, gender and BMI. Triglycerides plasma levels (TG) were not considered as independent adjustment variable in

the final analyses as TG correlated with BMI. Nevertheless, because parsimony, non-significant paths were removed from the final model. The mediation analysis method has been used elsewhere to evaluate the role of genetic variants on metabolic conditions [26–28]. Because the plasma concentrations of HDL-C were not sampled under the case–control design, we performed the prevalence-weighted approach suggested by Vanderweele and Vansteelandt [29]. Owing to binary outcome, probit link and Delta parameterization were used in the estimation of the parameters. Goodness-of-fit of the final models was assessed through indexes such as the standardized summary of the average covariance residuals [root mean square error of approximation (RMSEA)], Comparative fit index (CFI), and Tucker–Lewis index (TLI).

Results

Genotype and allele frequencies

In the whole study sample, the genotype frequencies of the -514C>T variant were as follows: CC 0.190 (401/2105), CT 0.448 (943/2105) and TT 0.362 (761/2105). In 1648 T2D controls genotype frequencies were: CC 0.205, CT 0.458, TT 0.337. The results from Chi-square test for Hardy–Weinberg equilibrium in the control group were: $\chi^2 = 7.762$ and $p = 0.005$. In agreement with other authors, this deviation from Hardy–Weinberg proportions is an effect of mixed population, like Mexican-mestizos [30], accordingly, a less restrictive *p* value threshold is accepted when Hardy–Weinberg equilibrium is tested in Mexicans [20, 31].

Description of the main biochemical and anthropometric measurements of the whole study sample and according to -514C>T *LIPC* genotype

The main characteristics of the studied population, a total of 2105 participants are shown in Table 1. Among the relevant variables are male gender representing 44.4% of the total studied population; median age was 48 years; median of plasma concentration of HDL-C was 1.09 mmol/L, and 21.7% of the total sample had a T2D diagnosis.

When we compared the main clinical and biochemical features according to the -514C>T allele, we found that the distribution of sex and age was the same between the three-genotype groups. As expected, HDL-C levels were higher among the carriers of TT genotype as compared to the CC genotype carriers (median concentrations: 1.11 vs. 1.06 mmol/L, $p < 0.027$, respectively). None of the other lipids levels were different among groups. The fasting glucose levels and the frequency of T2D were also higher in the TT group as compared to the CT and CC individuals (5.1 vs.

Table 1 Clinical and biochemical parameters of whole study sample and by -514C>T *LIPC* genotypes

Characteristics	Whole study sample (2105)	C/C (401)	C/T (943)	T/T (761)	<i>p</i> value
Male sex, <i>n</i> (%)	935 (44.4)	189 (47.1)	423 (44.9)	323 (42.4)	0.291
Age, median (IQR), years	48 (40–56)	48 (40–56)	48 (41–56)	48 (40–56)	0.591
Total-C, median (IQR), mmol/L	5.3 (4.6–6.0)	5.3 (4.6–6.1)	5.3 (4.7–6.0)	5.4 (4.6–6.1)	0.861
HDL-C, median (IQR), mmol/L	1.09 (0.93–1.29)	1.06 (0.91–1.24)	1.09 (0.93–1.29)	1.11 (0.93–1.32)	0.021^b
LDL-C, median (IQR), mmol/L	3.2 (2.6–3.8)	3.1 (2.6–3.8)	3.2 (2.6–3.9)	3.1 (2.6–3.7)	0.228
Triglycerides, median (IQR), mmol/L	2.2 (1.3–3.1)	2.3 (1.3–3.2)	2.2 (1.3–3.2)	2.3 (1.4–3.1)	0.301
Fasting glucose, median (IQR), mmol/L	5.0 (4.6–5.6)	4.9 (4.5–5.4)	4.9 (4.5–5.5)	5.1 (4.6–5.9)	0.001^{c,d}
BMI, median (IQR), kg/m ²	28 (25.5–30.9)	28.6 (26–31.2)	27.7 (25.3–30.7)	28 (25.5–30.9)	0.051
WhtR, median (IQR), cm	0.57 (0.53–0.62)	0.58 (0.53–0.62)	0.57 (0.53–0.62)	0.58 (0.53–0.62)	0.419
SBP, median (IQR), mmHg ^a	120 (110–130)	120 (110–130)	120 (110–130)	120 (110–130)	0.349
DBP, median (IQR), mmHg ^a	80 (70–81)	80 (70–82)	80 (70–82)	80 (70–80)	0.346
Hypertension status, <i>n</i> (%) ^a	513 (33.2)	110 (38.1)	223 (33.1)	180 (30.9)	0.109
T2D status, <i>n</i> (%)	457 (21.7)	63 (15.7)	189 (20.0)	205 (26.9)	<0.001

IQR Interquartile range, Total-C total cholesterol, HDL-C high density lipoprotein cholesterol, LDL-C low density lipoprotein cholesterol, BMI body mass index, WhtR waist to height ratio, SBP systolic blood pressure, DBP diastolic blood pressure, T2D type 2 diabetes. Kruskal–Wallis was used to compare quantitative variables between the three groups and Dunn–Bonferroni post hoc method was calculated for multiple comparison purposes. Chi square was used to compare the nominal variables. Significant differences are in bold

^a*n* = 1545

^bCC vs. TT, *p* = 0.027

^cCC vs. TT, *p* < 0.001

^dCC vs. CT, *p* = 0.013

4.9 mmol/L, *p* < 0.001; 26.9%, 20%, and 15.7%, *p* < 0.001, respectively) (Table 1).

The -514C>T *LIPC* polymorphism increases HDL-C levels and decreases the T2D risk

A path analysis was performed to explore the role of -514C>T *LIPC* gene variant on HDL-C levels and its possible association to T2D that could explain the differences in the proportion of diabetes individuals between -514C>T genotype groups. The analysis included age, sex, ethnicity and BMI as independent variables. The vector of log-transformed levels of HDL-C was the mediating variable and the indicator variable for T2D cases was the outcome. In the final model, the goodness of fit indexes were: RMSEA = 0 with a 90% confidence interval [0–0.024], CFI = 1.0 and TLI = 1.02. Figure 1 shows HDL-C act as a mediator between -514C>T *LIPC* polymorphism and T2D status. Importantly, -514C>T *LIPC* polymorphism is significantly associated to increase HDL-C levels ($\beta = 0.03$; *p* < 0.001). High HDL-C levels in turn decrease the risk of T2D ($\beta = -1.07$; *p* < 0.001). Thus, the indirect effect of -514C>T variant on T2D is protective through increasing HDL-C levels ($\beta = -0.03$; *p* < 0.001). Although marginal and positive direct association between the genotype and T2D was also found ($\beta = 0.08$; *p* = 0.06). Moreover, the variables directly affecting T2D status in our model were European

ethnicity ($\beta = -7.20$; *p* < 0.001), age ($\beta = 0.04$; *p* < 0.001), male sex ($\beta = -0.15$; *p* = 0.02), and HDL-C ($\beta = -1.07$; *p* < 0.001) (Table 2 and Fig. 1).

In addition to the -514C>T *LIPC* variant, HDL-C plasma levels were directly affected by other well-recognized variables as previously documented [32, 33]: BMI ($\beta = -0.01$; *p* < 0.001), male sex ($\beta = -0.19$; *p* < 0.001), and European ethnicity ($\beta = 0.67$; *p* < 0.001). In contrast, BMI was directly influenced by ethnicity ($\beta = -7.61$; *p* = 0.004) (Table 2 and Fig. 1) and marginally by the -514C>T *LIPC* variant ($\beta = -0.26$; *p* = 0.06) (Supplementary table). In addition, the role of BMI as mediating variable between -514C>T and T2D was not significant (*p* = 0.18) nor between the -514C>T *LIPC* genetic variant and HDL-C (*p* = 0.06) (Supplementary table).

Ethnicity was the only variable with significant effects in all the dependent variables (T2D, HDL-C and BMI) thus, its relevant role as confounder in association studies for metabolic traits in Mexican mestizos was confirmed.

In vitro functional studies

The -514C>T (rs1800588) variant decreases the activity of *LIPC* promoter in HepG2 cells

To evaluate whether the -514C>T polymorphism had an effect on *LIPC* promoter activity in hepatic derived cells, we

Fig. 1 Mediation model exploring the relationships between -514C>T *LIPC* polymorphism, type 2 diabetes (T2D), log-transformed high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), age, ethnicity, sex, and body mass index (BMI). The values on the arrows represent unstandardized beta (UB) and standard error (SE). The values on arrow entering at BMI and HDL-C are UB and SE of residual variance of this model. The pathway where HDL-C acts as a mediator between -514C>T *LIPC* gene variant and T2D risk is highlighted in bold. Effects falling short of the conventional level of statistical significance ($p < 0.05$) were not represented

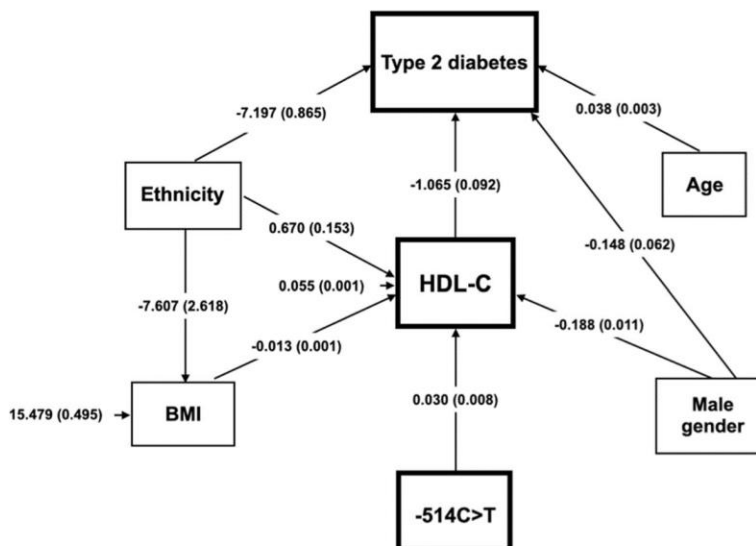


Table 2 Direct and indirect effects between -514C>T *LIPC* polymorphism, T2D, HDL-C, age, ethnicity, sex and BMI

Dependent	Independent	Direct effects			Indirect effects		
		Standardized beta	Unstandardized beta (SE)	<i>p</i> value	Standardized beta	Unstandardized beta (SE)	<i>p</i> value
Variables							
T2D							
	Ethnicity ^a	-0.232	-7.197 (0.865)	<0.001			
	Age	0.352	0.038 (0.003)	<0.001			
	Log HDL-C	-0.246	-1.065 (0.092)	<0.001			
	Male sex	-0.066	-0.148 (0.062)	0.017			
	-514C>T	0.055	0.084 (0.045)	0.062			
					-514C>T->Log HDL-C->T2D	-0.021	-0.032 (0.009) <0.001
Log HDL-C							
	Ethnicity ^a	0.094	0.670 (0.153)	<0.001			
	Male sex	-0.363	-0.188 (0.011)	<0.001			
	BMI	-0.194	-0.013 (0.001)	<0.001			
	-514C>T	0.094	0.030 (0.008)	<0.001			
BMI							
	Ethnicity ^a	-0.069	-7.607 (2.618)	0.004			

Mediation analysis was performed considering -514C>T polymorphism in additive genetic model. BMI is a quantitative outcome. The significant effects were considered when $p < 0.05$

T2D type 2 diabetes, Log HDL-C log-transformed high density lipoprotein cholesterol, BMI body mass index, SE standard error

^aPrincipal components from two GWAS were used to estimate ethnicity, discriminating between Native American and European ancestry

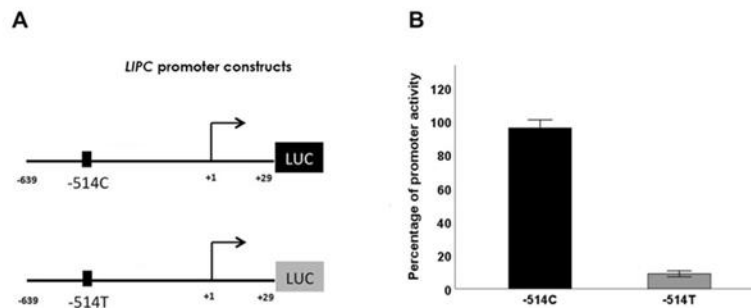


Fig. 2 *LIPC* promoter activity assay. **a** Schematic representation of the pGL3 plasmid constructs with *LIPC* promoter with either a C or T at the -514 site, upstream of a firefly luciferase reporter gene. **b** Relative activity luciferase in HepG2 cell line transfected with *LIPC* promoter corresponding to the sequence from nucleotide - 639 to + 29

after normalization against activity of Renilla luciferase. Data were taken from three representative experiments and are expressed as mean (\pm SEM) values from triplicates ($n=9$). The p value for two-tailed t test between the two alleles is <0.001

cloned *LIPC* gene promoter with the boundary of the construct at the nucleotide position +29 from the transcription start site to -639 nucleotide (Fig. 2a). Transient transfections were performed in HepG2 cell line. As shown in Fig. 2b, the luciferase construction of pGL3 reporter plasmid containing the T allelic sequence had only 10% of activity of the C allele sequence construct ($p < 0.001$).

Discussion

In the present study, we assessed the role of the -514C>T *LIPC* promoter variant on HDL-C plasma levels and T2D risk in Mexicans through path analysis. We found that in the studied sample, the -514 TT genotype group had the highest HDL-C plasma levels, and it has a significant effect on raising HDL-C concentrations. These results are consistent with other studies about -514C>T or its linked -250G>A polymorphism [13, 15, 16, 34]. However, other reports have failed to demonstrate such association [35, 36], while other groups published opposite results [37]. Some potential reasons for such differences may reside in the studied populations, and the HDL-C levels cut-off for defining hypoalphalipoproteinemia or normal HDL-C plasma levels. Importantly, in the present study, we analyzed a population with high prevalence of hypoalphalipoproteinemia and studied HDL-C as a continuous variable.

Regarding the association of -514C>T *LIPC* promoter variant with T2D, Costa et al. found that this genetic variant was not associated with pre-diabetes status in Mexicans after adjusting the model by ethnicity and other factors including age, BMI, sex and physical activity [38], consistent with a marginal association found between the -514C>T *LIPC* polymorphism and T2D risk in our study. In contrast,

Posadas-Sánchez et al. reported a significant association between the -514C>T variant with an increased risk of T2D in Mexicans [39]. Notably, the main difference with respect to the later study is that we included ethnicity as a confounder, as it has been shown to be a requirement for mixed populations such as Mexicans [4, 20, 40].

In a separate study of Pihlajamäki et al. found that healthy Finnish individuals carrying the AA genotype of the -250G>A gene polymorphism (part of the -514C>T, -250G>A, -710T>C, and -763A>G haplotype), displayed the highest levels of fasting insulin, very low density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) and triglycerides [15], suggesting that AA homozygous carriers are insulin resistant and consequently more prone to develop glucose-disposal defects. In contrast, in a prospective study conducted by Todorova et al., they found that individuals carrying the -250 GG genotype were more prone to conversion of glucose intolerance to T2D [14]. Thus, there are apparent conflicting results regarding the role of the -250G and A alleles and genotypes on different glucose related traits and it is therefore possible that role of -250G>A promoter variant (or any of the linked variants) is mediated through the effect of different confounders such as gender or BMI. It is also possible that this variant plays a dual role either increasing or decreasing T2D risk depending on the presence of additional gene or environmental factors. In this regard, it has been documented, a gene-gene interaction between the *CETP* and *LIPC* genes on T2D risk in a population from Gran Canaria Island, Spain, where the presence of the B1B1 Taq1 *CETP* polymorphism increased the risk for T2D [41]. In consequence, in Europeans, other genes such as *CETP* may act as modifiers of the risk for T2D in -514T carriers.

In the present study, through path analysis, we showed that the -514C>T *LIPC* promoter variant has an indirect

and protective role on T2D through increasing HDL-C plasma levels in the Mexicans, although a marginal direct effect between the -514C>T variant and T2D risk was also found. Yet, to rule out a possible reverse causation given that there is also information that describes T2D as a risk factor to lower HDL-C levels [42–44], we ran the adjusted model where the final outcome was HDL-C plasma concentration and the mediating variable was T2D. As expected, we found the direct effect of T2D on HDL-C levels was negative and significant ($\beta = -0.058$; $p < 0.001$); however, the direct effect of the genetic variant on T2D was not significant ($\beta = 0.052$; $p = 0.24$). Moreover, the indirect effect of the SNP on HDL-C levels passing through T2D was not significant ($\beta = -0.003$; $p = 0.25$). Thus, we showed that the effect of -514C>T variant is through increasing HDL-C level and as a consequence the T2D risk decreased.

Importantly, we did not find a significant association between BMI and the studied *LIPC* variant, consistent with the study of Juo et al. [45]. In contrast, other reports found an association between HL activity and obesity in humans [46, 47], and with overexpression of the human *LIPC* and obesity in mice [48]. However, the association reported in humans was due to intra-abdominal fat [46, 47], a trait not adequately captured by BMI [49]. Even when we did not measure the HL levels in our population, our in vitro results show that the -514C>T variant decreases by 90% the activity of the *LIPC* promoter, which could translate into lower HL levels in vivo. These results are in agreement with a previous study performed in a murine cell line where the authors found the T allele diminished 70% the promoter activity [12]. Nonetheless, in a separate study, Botma et al. found that -514 T allele alone did not significantly reduce the *LIPC* promoter activity in HepG2 cells and that the inclusion of the linked -250A allele in combination with the -514T variant, resulted in a decreased transactivation activity [11]. The difference between both studies may reside on the sequence upstream into the reporter gene, according to the main start of transcription site (-684 to +14 in our study vs. -650 to +48 in the Botma et al. study). Importantly, in the present work we included only -514C>T variant, because both in silico analysis and in vitro studies show that this variant may disrupt a binding region for Upstream Stimulatory Factor (USF) transcription factor [11, 50]. Although it is possible that the additional three variants comprising the haplotype may contribute to the reduced transcriptional activity of the promoter, and it constitutes a limitation of the present in vitro study, there is sufficient evidence to support the notion that -514C>T *LIPC* promoter polymorphism has functional consequences by itself.

Moreover, in vitro studies of the -514C>T polymorphism, as well as evidence from animal models, are in line with epidemiological observations in humans. Overall, these studies establish a negative correlation between the

activity of hepatic lipase and HDL-C levels, where animal models and families with HL deficiency have elevated plasmatic HDL-C plasma levels [51, 52]. Furthermore, animal models over-expressing HL have the lowest levels of HDL-C [53]. Accordingly, it is expected that the -514T allele diminishes the transcription of the *LIPC* gene in vivo, and individuals with TT genotype display the lowest levels of HL enzyme activity and highest plasma levels of HDL-C [13].

In conclusion, our results showed the protective role of -514C>T polymorphism on T2D risk through the increase of HDL-C plasma levels in Mexicans, a finding supported by a large population-based studied sample that incorporated ancestry as possible confounder. To the best of our knowledge, this is the first study demonstrating that HDL-C plasma levels act as an intermediate factor between a *LIPC* gene variant and T2D risk. Further studies are warranted to explore possible gene–gene and gene–environmental interactions regarding dyslipidemia and T2D risk in our population.

Acknowledgements María Teresa Guerra-García is a doctoral student from Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and she was supported with a fellowship 170090 from CONACyT. We thank Maribel Rodríguez-Torres, José Luis Gallegos-Ventura, and Saúl Cano-Colín for technical assistance.

Author contributions CA-AS and MT-TL obtained funding. MT-GG, CA-AS, and MT-TL conceived and designed the experiments. MT-GG, H-MM, A-OG, P-VC and MT-TL analyzed data, wrote and critically reviewed the manuscript. MT-GG and MT-TL were in charge of the experiments conduction. ML-OS and R-RG helped conduct the experiments. VM-OO and M-PT helped in promoter activity assays. All authors approved the final manuscript. MT-TL is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Funding Project 128877 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that there are not competing conflicts of interests.

Ethics approval The Committee of Ethics and the Institutional Review Board of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), on research on humans have priorly approved the study protocol.

Research involving human participants and/or animals All procedures performed in human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments ethical standards.

Informed consent All the participants gave written informed consent before inclusion in the study. Participants did not receive any stipend for taking part in the study.

References

- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365(9467):1333–1346. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61032-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61032-X)
- Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segrè AV, Steinthorsdóttir V et al (2012) Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet* 44(9):981–990. <https://doi.org/10.1038/ng.2383>
- Gamboa-Meléndez MA, Huerta-Chagoya A, Moreno-Macias H, Vázquez-Cárdenas P, Ordóñez-Sánchez ML, Rodríguez-Guillén R et al (2012) Contribution of common genetic variation to the risk of type 2 diabetes in the Mexican Mestizo population. *Diabetes* 61(12):3314–3321. <https://doi.org/10.2337/db11-0550>
- Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, Shamah-Levy T, Avila MA, Gaona B, Rebolgar R, Hernández L (2010) Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud Publica Mex* 52(Suppl 1):S19–S26. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342010000700005>
- Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Gómez Pérez FJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepulveda J (2001) High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *J Lipid Res* 42(8):1298–1307
- Wilson PW, Meigs JB, Sullivan L, Fox CS, Nathan DM, D'Agostino RB Sr (2007) Prediction of incident diabetes mellitus in middle-aged adults: the Framingham Offspring Study. *Arch Intern Med* 167(10):1068–1074. <https://doi.org/10.1001/archinte.167.10.1068>
- Mykkänen L, Kuusisto J, Pyörälä K, Laakso M (1993) Cardiovascular disease risk factors as predictors of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in elderly subjects. *Diabetologia* 36(6):553–559. <https://doi.org/10.1007/BF02743273>
- Abbasi A, Corpeleijn E, Gansevoort RT, Gans RO, Hillege HL, Stolk RP, Navis G, Bakker SJ, Dullaart RP (2013) Role of HDL cholesterol and estimates of HDL particle composition in future development of type 2 diabetes in the general population: the PREVEND study. *J Clin Endocrinol Metab* 98(8):E1352–E1359. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1680>
- Guerra R, Wang J, Grundy SM, Cohen JC (1997) A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(9):4532–4537. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4532>
- Paththinige CS, Sirisena ND, Dissanayake V (2017) Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia—a comprehensive literature review. *Lipids Health Dis*. 16(1):103. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0488-4>
- Botma GJ, Verhoeven AJ, Jansen H (2001) Hepatic lipase promoter activity is reduced by the C-480T and G-216A substitutions present in the common LIPC gene variant, and is increased by Upstream Stimulatory Factor. *Atherosclerosis* 154(3):625–632. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(00\)00478-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00478-0)
- Deeb SS, Peng R (2000) The C-514T polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter diminishes its activity. *J Lipid Res* 41(1):155–158
- Isaacs A, Sayed-Tabatabaei FA, Njajou OT, Witteman JC, van Duijn CM (2004) The -514 C->T hepatic lipase promoter region polymorphism and plasma lipids: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 89(8):3858–3863. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0188>
- Todorova B, Kubaszek A, Pihlajamäki J, Lindström J, Eriksson J, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukkaaniemi S, Tuomilehto J, Uusitupa M, Laakso M, Finnish Diabetes Prevention Study (2004) The G-250A promoter polymorphism of the hepatic lipase gene predicts the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes mellitus: the Finnish Diabetes Prevention Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 89(5):2019–2023. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031325>
- Pihlajamäki J, Karjalainen L, Karhapää P, Vauhkonen I, Taskinen MR, Deeb SS, Laakso M (2000) G-250A substitution in promoter of hepatic lipase gene is associated with dyslipidemia and insulin resistance in healthy control subjects and in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(7):1789–1795. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.7.1789>
- Teran-García M, Santoro N, Rankinen T, Bergeron J, Rice T, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Bergman RN, Després JP, Bouchard C, HERITAGE Family Study (2005) Hepatic lipase gene variant -514C>T is associated with lipoprotein and insulin sensitivity response to regular exercise: the HERITAGE Family Study. *Diabetes* 54(7):2251–2255. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.7.2251>
- Lange T, Hansen KW, Sørensen R, Galatius S (2017) Applied mediation analyses: a review and tutorial. *Epidemiol Health* 39:e2017035. <https://doi.org/10.4178/epih.e2017035>
- Arellano-Campos O, Gómez-Velasco DV, Bello-Chavolla OY, Cruz-Bautista I, Melgarejo-Hernandez MA, Muñoz-Hernandez L et al (2019) Development and validation of a predictive model for incident type 2 diabetes in middle-aged Mexican adults: the metabolic syndrome cohort. *BMC Endocr Disord* 19(1):41. <https://doi.org/10.1186/s12902-019-0361-8>
- Weissglas-Volkov D, Aguilar-Salinas CA, Nikkola E, Deere KA, Cruz-Bautista I, Arellano-Campos O, Muñoz-Hernandez LL, Gomez-Munguia L, Ordoñez-Sánchez ML, Reddy PM, Lusia AJ, Matikainen N, Taskinen MR, Riba L, Cantor RM, Sinsheimer JS, Tusie-Luna T, Pajukanta P (2013) Genomic study in Mexicans identifies a new locus for triglycerides and refines European lipid loci. *J Med Genet* 50(5):298–308. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101461>
- SIGMA Type 2 Diabetes Consortium, Estrada K, Aukrust I, Bjørkhaug L, Burt NP, Mercader JM, García-Ortiz H et al (2014) Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a Latino population. *JAMA* 311(22):2305–2314. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.6511>
- Carlson RV, Boyd KM, Webb DJ (2004) The revision of the Declaration of Helsinki: past, present and future. *Br J Clin Pharmacol* 57(6):695–713. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02103.x>
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18(6):499–502. <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499>
- American Diabetes Association (2011) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34(Suppl 1):S62–S69. <https://doi.org/10.2337/dc11-S062>
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2006) Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabet Med* 23(5):469–480. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x>
- Muthén LK, Muthén BO (1998–2017) Mplus user's guide, 8th edn. Muthén & Muthén, Los Angeles
- Raghavan S, Porneala B, McKeown N, Fox CS, Dupuis J, Meigs JB (2015) Metabolic factors and genetic risk mediate familial type 2 diabetes risk in the Framingham Heart Study. *Diabetologia* 58(5):988–996. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3498-7>
- Singh A, Babyak MA, Nolan DK, Brummett BH, Jiang R, Siegler IC, Kraus WE, Shah SH, Williams RB, Hauser ER (2015) Gene by stress genome-wide interaction analysis and path analysis identify EBF1 as a cardiovascular and metabolic risk gene. *Eur J Hum Genet* 23(6):854–862. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.189>

28. Ochoa-Guzmán A, Moreno-Macías H, Guillén-Quintero D, Chávez-Talavera O, Ordoñez-Sánchez ML, Segura-Kato Y, Ortiz V et al (2020) R230C but not -565C/T variant of the ABCA1 gene is associated with type 2 diabetes in Mexicans through an effect on lowering HDL-cholesterol levels. *J Endocrinol Investig*. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01187-8>
29. Vanderweele TJ, Vansteelandt S (2010) Odds ratios for mediation analysis for a dichotomous outcome. *Am J Epidemiol* 172(12):1339–1348. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq332>
30. Deng HW, Chen WM, Recker RR (2001) Population admixture: detection by Hardy–Weinberg test and its quantitative effects on linkage-disequilibrium methods for localizing genes underlying complex traits. *Genetics* 157(2):885–897
31. Conomos MP, Laurie CA, Stimp AM et al (2016) Genetic diversity and association studies in US Hispanic/Latino populations: applications in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *Am J Hum Genet* 98(1):165–184. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.12.001>
32. Pérusse L, Després JP, Tremblay A, Leblanc C, Talbot J, Allard C, Bouchard C (1989) Genetic and environmental determinants of serum lipids and lipoproteins in French Canadian families. *Arteriosclerosis* 9:308–318. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.9.3.308>
33. Wilson PW, Anderson KM, Harris T, Kannel WB, Castelli WP (1994) Determinants of change in total cholesterol and HDL-C with age: the Framingham Study. *J Gerontol*. 49(6):M252–M257. <https://doi.org/10.1093/geronj/49.6.m252>
34. Brinkley TE, Halverstadt A, Phares DA, Ferrell RE, Prigeon RL, Hagberg JM, Goldberg AP (2011) Hepatic lipase gene -514C > T variant is associated with exercise training-induced changes in VLDL and HDL by lipoprotein lipase. *J Appl Physiol* 111(6):1871–1876. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00567.2011>
35. Fang DZ, Liu BW (2002) Polymorphism of HL +1075C, but not -480T, is associated with plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein AI in men of a Chinese population. *Atherosclerosis* 161(2):417–424. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00652-9)
36. Hegele RA, Harris SB, Brunt JH, Young TK, Hanley AJ, Zinman B, Connelly PW (1999) Absence of association between genetic variation in the LIPC gene promoter and plasma lipoproteins in three Canadian populations. *Atherosclerosis* 146(1):153–160. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00113-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00113-6)
37. Lu X, Huang J, Mo Z, He J, Wang L, Yang X et al (2016) Genetic susceptibility to lipid levels and lipid change over time and risk of incident hyperlipidemia in Chinese populations. *Circ Cardiovasc Genet* 9(1):37–44. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.115.001096>
38. Costa-Urrutia P, Abud C, Franco-Trecu V, Colistro V, Rodríguez-Arellano ME, Granados J, Seelaender M (2018) Genetic susceptibility to pre diabetes mellitus and related association with obesity and physical fitness components in Mexican-Mestizos. *Prim Care Diabetes* 12(5):416–424. <https://doi.org/10.1016/j.pcd.2018.07.005>
39. Posadas-Sánchez R, Ocampo-Arcos WA, López-Urbe AR, Posadas-Romero C, Villarreal-Molina T, León EÁ, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Cardoso-Saldaña G, Medina-Urrutia A, Vargas-Alarcón G (2015) Hepatic lipase (LIPC) C-514T gene polymorphism is associated with cardiometabolic parameters and cardiovascular risk factors but not with fatty liver in Mexican population. *Exp Mol Pathol* 98(1):93–98. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.12.010>
40. Carulli L, Rondinella S, Lombardini S, Canedi I, Loria P, Carulli N (2005) Review article: diabetes, genetics and ethnicity. *Aliment Pharmacol Ther* 22(Suppl 2):16–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02588.x>
41. López-Ríos L, Pérez-Jiménez P, Martínez-Quintana E, Rodríguez-González G, Díaz-Chico BN, Nóvoa FJ, Serra-Majem L, Chirino R (2011) Association of Taq 1B CETP polymorphism with insulin and HOMA levels in the population of the Canary Islands. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21(1):18–24. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.06.009>
42. Rohrer L, Hersberger M, von Eckardstein A (2004) High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 15(3):269–278. <https://doi.org/10.1097/00041433-200406000-00006>
43. Gatti A, Maranghi M, Bacci S et al (2009) Poor glycemic control is an independent risk factor for low HDL cholesterol in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32(8):1550–1552. <https://doi.org/10.2337/dc09-0256>
44. Vollenweider P, von Eckardstein A, Widmann C (2015) HDLs, diabetes, and metabolic syndrome. *Handb Exp Pharmacol* 224:405–421. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09665-0_12
45. Juo SH, Han Z, Smith JD, Colangelo L, Liu K (2001) Promoter polymorphisms of hepatic lipase gene influence HDL(2) but not HDL(3) in African American men: CARDIA study. *J Lipid Res* 42(2):258–264
46. Després JP, Ferland M, Moorjani S, Nadeau A, Tremblay A, Lupien PJ, Thériault G, Bouchard C (1989) Role of hepatic-triglyceride lipase activity in the association between intra-abdominal fat and plasma HDL cholesterol in obese women. *Arteriosclerosis* 9(4):485–492. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.9.4.485>
47. Carr MC, Hokanson JE, Deeb SS, Purnell JQ, Mitchell ES, Brunzell JD (1999) A hepatic lipase gene promoter polymorphism attenuates the increase in hepatic lipase activity with increasing intra-abdominal fat in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(11):2701–2707. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.11.2701>
48. Cedó L, Santos D, Roglans N, Julve J, Pallarés V, Rivas-Urbina A, Llorente-Cortes V, Laguna JC, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC (2017) Human hepatic lipase overexpression in mice induces hepatic steatosis and obesity through promoting hepatic lipogenesis and white adipose tissue lipolysis and fatty acid uptake. *PLoS One* 12(12):e0189834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189834>
49. Ashwell M, Gunn P, Gibson S (2012) Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 13(3):275–286. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2011.00952.x>
50. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12(6):996–1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
51. Mezdour H, Jones R, Dengremont C, Castro G, Maeda N (1997) Hepatic lipase deficiency increases plasma cholesterol but reduces susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Biol Chem* 272(21):13570–13575. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13570>
52. Breckenridge WC, Little JA, Alaupovic P, Wang CS, Kuksis A, Kakis G, Lindgren F, Gardiner G (1982) Lipoprotein abnormalities associated with a familial deficiency of hepatic lipase. *Atherosclerosis* 45(2):161–179. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(82\)90136-8](https://doi.org/10.1016/0021-9150(82)90136-8)
53. Dichek HL, Brecht W, Fan J, Ji ZS, McCormick SP, Akeefe H, Conzo L, Sanan DA, Weisgraber KH, Young SG, Taylor JM, Mahley RW (1998) Overexpression of hepatic lipase in transgenic mice decreases apolipoprotein B-containing and high density lipoproteins. Evidence that hepatic lipase acts as a ligand for lipoprotein uptake. *J Biol Chem* 273(4):1896–1903. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.1896>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.