

## Trabajo Fin de Grado

MUTACIONES EN EL GEN DE APOA5 EN SUJETOS  
CON HIPERTRIGLICERIDEMIA GRAVE  
ESTUDIO DE LA PREVALENCIA EN UNA ZONA  
SANITARIA DE ARAGÓN

Autor

M<sup>a</sup> Victoria Méndiz Manero

Directores

Dra. Isabel de Castro-Orós

Dr. Fernando Civeira Murillo

Grado en Biotecnología

Universidad de Zaragoza

2014

Departamento de Bioquímica. Universidad de Zaragoza

Laboratorio de Biología Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet

## ÍNDICE

Resumen. Abstract	4
Abreviaturas	5
Introducción	6
1. Metabolismo de lípidos	6
1.1. Metabolismo de lipoproteínas	6
1.1.1. Metabolismo de los quilomicrones	7
1.1.2. Metabolismo de las VLDL	8
1.1.3. Metabolismo de las LDL	9
1.1.4. Metabolismo de las HDL	9
1.2. Metabolismo de los triglicéridos	10
2. Dislipemias	11
2.1 Hipertrigliceridemia	11
2.2. Fenotipos de las hipertrigliceridemias	11
3. Variantes genéticas asociadas a la HTG	13
3.1 Apolipoproteína AV e hipertrigliceridemia	13
Hipótesis y objetivos	14
Materiales y métodos	15
1. Descripción de la muestra	15
2. Obtención de la muestra	15
3. Obtención del DNA genómico	15
4. Análisis y concentración de la muestra	15
5. Amplificación por PCR de los genes de estudio	16
6. Purificación del producto de PCR	17
7. Reacción de secuenciación	18
8. Precipitación alcohólica	18
9. Análisis estadístico	19
10. Análisis bioinformático	19
Resultados	20
1. Características de la población de estudio	20
2. Identificación de las variantes del gen de <i>APOA5</i>	21
Discusión	25
Conclusiones. Conclusions	26
Bibliografía	27

## **RESUMEN**

Las hipertrigliceridemias (HTG) son una dislipemia común que se ha asociado con el desarrollo de enfermedad cardiovascular. La HTG grave, definida con triglicéridos > 500 mg/dl, suele estar causada por mutaciones en genes del catabolismo de los triglicéridos y se asocia con predisposición a pancreatitis aguda. Mutaciones en *APOA5* que causan baja concentración de Apo AV se asocian con la HTG grave. El objetivo de este estudio fue identificar las variantes génicas, comunes y no comunes en el gen candidato *APOA5* en sujetos con HTG grave de causa primaria y analizar su asociación con la enfermedad. Para llevar a cabo este trabajo, se seleccionaron 66 pacientes procedentes de Centro de Salud de la Almozara de Zaragoza en los que se extrajo el DNA y se amplificaron mediante PCR y se secuenciaron el promotor, exones y nexos de unión exón-intrón del gen *APOA5*. Las frecuencias de las variantes encontradas se compararon con la población europea analizada en el proyecto 1000 Genomas y se analizaron con herramientas bioinformáticas para predecir su efecto. El 4,55% de los pacientes resultaron portadores de 2 variantes raras: p.Gln97\*, previamente descrita como causal de HTG y p.Leu173Pro, identificada por primera vez en este trabajo. El análisis bioinformático de la mutación p.Leu173Pro mostró controversia. Además, las variantes comunes c.-3A>G, p.Ser19Trp, p.Iso44Iso y c.162-43A>G presentaron una frecuencia significativamente superior en los sujetos con HTG frente a la población de los 1000 Genomas. A partir de este trabajo podemos concluir que variantes comunes y no comunes en el gen *APOA5* pueden estar implicadas en la patogenicidad de la HTG grave.

## **ABSTRACT**

Hypertriglyceridemia (HTG) syndromes are common dyslipidaemias associated with the development of cardiovascular disease. Severe HTG, has been defined as triglyceride levels > 500 mg/dl, and is usually caused by mutations in genes involved in triglyceride catabolism; and associated with acute pancreatitis. The objective of this study was to identify common and uncommon genetic variants in *APOA5* in subjects affected of severe HTG with a primary cause, and also to analyse its association with this disease. To perform this study, 66 patients from the Centro de Salud de la Almozara in Zaragoza were selected. DNA was extracted and *APOA5* promoter, exons, and exon-intron boundaries were amplified by PCR and sequenced. Frequencies of the identified variants were compared with European population from the 1000 Genomes Study, and were analysed with bioinformatical tools in order to predict its effect. The 4,5% of the patients were carriers of 2 rare variants: p.Gln97\*, previously described as HTG cause, and p.Leu173Pro, identified by the first time in this work. The p.Leu173Pro bioinformatical analysis showed controversial data. Besides, common variants: c.-3A>G, p.Ser19Trp, p.Iso44Iso and c.162-43A>G showed a significant higher frequency in HTG subjects compared to 1000 Genomes. As a consequence of this work, we can conclude that common and uncommon variants in *APOA5* gene may be involved in the pathogenicity of severe HTG.

## **ABREVIATURAS**

- 2- MG: 2 monoacilglicerol  
AG: Ácidos Grasos  
Apo: Apoliproteína  
*APOA5*: Gen de la apolipoproteína A-V  
CL: Colesterol libre  
dNTP's: Desoxirribonucleótidos trifosfato  
DGAT: Enzima acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa  
ECP: Enfermedad Coronaria Prematura  
ECV: Enfermedad cardiovascular  
FL: Fosfolípidos  
GPIHBP1: glucosil-fosfatidil-inositol anclado a la lipoproteína de alta densidad unida a una proteína 1  
HDL: Lipoproteína de elevada densidad  
HFC: hiperlipemia familiar combinada  
HMG-CoA: hidroxi-metil-glutaril Coenzima A  
IDL: Lipoproteína de densidad intermedia  
IMC: Índice de Masa Corporal  
Kb: Kilobases  
LH: Lipasa hepática  
LDL: Lipoproteína de baja densidad  
LMF1: Factor de maduración de la lipasa 1  
LPL: Lipoproteína lipasa  
MTP: proteína microsomal Triglyceride Transfer Protein  
NA: No analizado  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PDI: proteína disulfito isomerasa  
QM: Quilomicrón  
QMr: Quilomicrón remanente  
RE: Retículo Endoplasmático  
SNP: polimorfismo de un solo nucleótido  
TE: tampón TRIS-EDTA  
TG: triglicéridos  
VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

# **INTRODUCCIÓN**

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en los países desarrollados y se considera que seguirá siendo en el futuro. La Organización Mundial de la Salud (OMS) registró que en el año 2008 murieron por esta causa 17,3 millones de personas, representando un 30% de todas las muertes registradas en el mundo.

Una de las principales causas de las enfermedades cardiovasculares es la alteración del metabolismo lipídico, produciendo acumulación de lípidos a nivel arterial y la formación de placa de ateroma, causantes de cardiopatía isquémica y otros accidentes cardiovasculares.

El metabolismo lipídico está finamente regulado entre las fuentes de aporte y las vías de eliminación. La alteración de cualquiera de los mecanismos que mantienen la homeostasis produce una alteración en las concentraciones de los lípidos provocando una dislipemia<sup>1</sup>.

## **1. METABOLISMO DE LÍPIDOS**

Los lípidos son un amplio y heterogéneo grupo de moléculas biológicas que se caracterizan por su apolaridad. Las largas cadenas de hidrocarburos que los componen les confieren esta propiedad, que les hace insolubles en agua. Clínicamente los lípidos más importantes en plasma son los triglicéridos (TG) y el colesterol<sup>2</sup>.

Los TG son una llave energética formada por tres ácidos grasos unidos a un glicerol. Son sintetizados en el intestino y en células hepáticas y transportados hacia el plasma. Posteriormente, se produce la lipólisis en la superficie endotelial liberando los ácidos grasos en las células periféricas para su β-oxidación o su almacenaje<sup>2</sup>.

El colesterol es una molécula grande, que presenta cuatro ciclos condensados y radicales, y tiene numerosas funciones. Es componente de las membranas celulares, precursor de hormonas esteroideas y de la vitamina D, y es necesario para la activación neuronal, como señal molécula<sup>3</sup>. El 80% del colesterol es derivado de la síntesis endógena por la enzima HMG-CoA Reductasa y, sólo un pequeño porcentaje proviene de la dieta<sup>4</sup>.

### **1.1 Metabolismo de las lipoproteínas**

La insolubilidad del colesterol y los TG requiere que sean transportados por lipoproteínas, complejos proteicos formadas por un núcleo de lípidos apolares (colesterol esterificado y TG) cubiertos por una capa polar de apolipoproteínas (Apo), fosfolípidos y colesterol libre (CL)<sup>4</sup>.

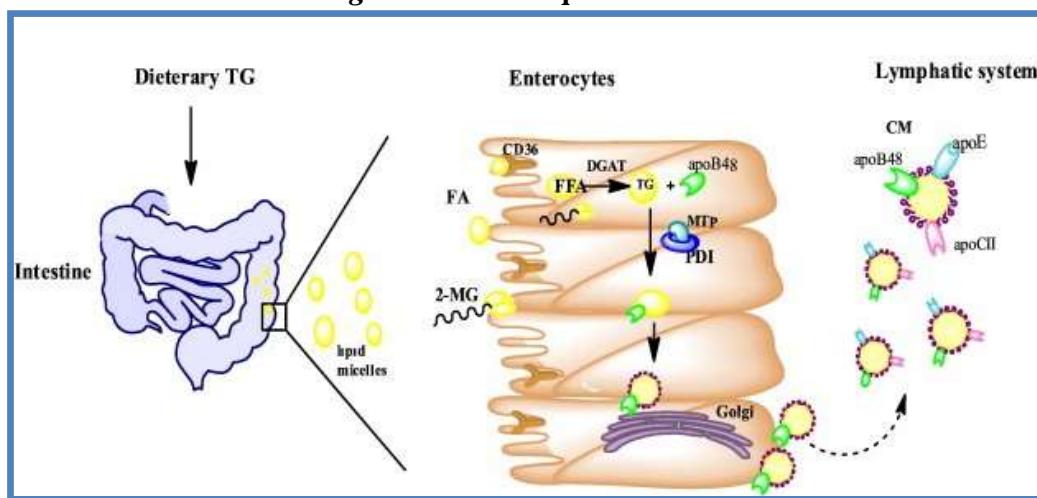
Las lipoproteínas se dividen en 5 grandes clases en función de sus propiedades fisico-químicas: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL)<sup>5</sup>. Los TG son transportados principalmente por los QM y las VLDL, mientras que las LDL y HDL hacen lo propio con el colesterol.

#### 1.1.1. Metabolismo de los quilomicrones

Los QM son las lipoproteínas más ricas en TG, con un contenido superior al 85%, y tan solo un 2% de proteína. Además, contienen las apolipoproteínas: Apo B-48, Apo C-III, Apo C-II y Apo A-V.<sup>4</sup>

Los TG derivados de la dieta son hidrolizados en el intestino por medio de la lipasa pancreática en 2-monoacilglicerol (2-MG) y ácidos grasos (AG)<sup>6</sup>, que pueden ser absorbidos por los enterocitos (*Fig. 1*) donde son restituidos en TG por la acil-CoA diacilglicerolaciltransferasa (DGAT)<sup>7</sup>. La proteína Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP), junto con la proteína disulfito isomerasa (PDI), facilita la lipidación de la Apo B-48, en el primer paso para la formación del QM<sup>6</sup>. A continuación, se transportan al aparato de Golgi para ser exocitados al sistema linfático, y entran al torrente circulatorio por la vena cava, donde, los QM se enriquecen en Apo E, Apo C-II y Apo C-I mediante el intercambio con las HDL formándose el QM maduro.

**Fig. 1: Síntesis de quilomicrones**



Los TG de la dieta son hidrolizados en el intestino en 2-monoacilglicerol (2-MG) y ácidos grasos (AG). En el interior del enterocito, el 2-MG y AG son restituidos en TG. Posteriormente la proteína MTP, facilita la lipidación de la Apo B-48. Los QM nacientes son exocitados hacia el torrente circulatorio.

Tomada de Hassing HC, Surendran RP. "Pathophysiology of hypertriglyceridemia". Biochimica et Biophysica Acta. 2011

Cuando el QM maduro llega a los tejidos, es sustrato de la lipoprotein lipasa (LpL), enzima glicoproteica anclada por medio de los glicosaminoglicanos a la superficie endotelial<sup>8</sup>. La LpL hidroliza los triglicéridos a 2-MG y AGL que son capturados por los tejidos adiposo y muscular.

El QM, tras perder los TG, mediante intercambio con las HDL, disminuye su contenido en Apo C-II y se enriquece en Apo C-III, dando lugar a los QM remanentes (QMr) que viajarán al hígado, donde serán metabolizados por la lipasa hepática (LH)<sup>9</sup>.

Finalmente los QMr ricos en Apo E, son reconocidos por el receptor de las LDL (rLDL) y por el LRP1 (proteína relacionada con el receptor LDL 1) e internalizados en las células hepáticas mediante endocitosis<sup>10</sup>.

### 1.1.2 Metabolismo de las VLDL

Las VLDL son lipoproteínas de origen hepático que participan en el transporte de las grasas endógenas. Son ricas en TG suponiendo el 55% de la masa total frente al 10-15% de colesterol.

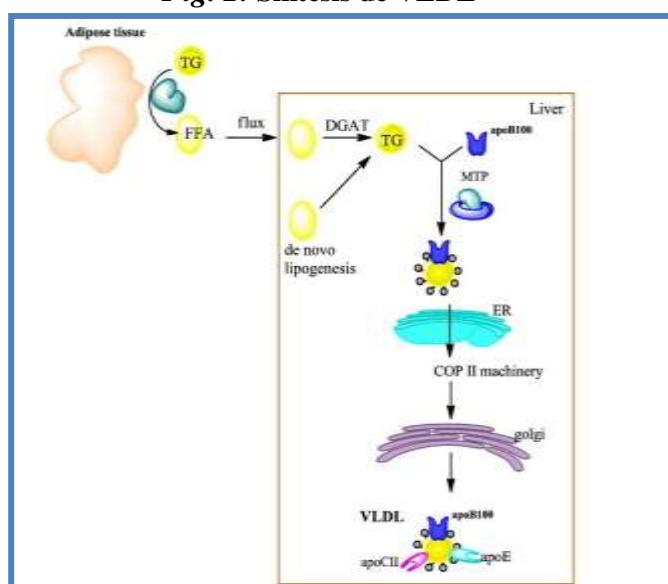
Los TG son sintetizados en el hígado y empaquetados en partículas de VLDL con Apo B-100 como proteína principal y pequeñas cantidades de Apo E y Apo C (*Fig. 2*).

Cuando las VLDL llegan al plasma, son retenidas por los proteoglicanos heparin sulfato y sus TG son hidrolizados por la acción de LpL liberando AGL y glicerol. Las VLDL intercambian Apos con las HDL de manera similar a lo que sucede en los QM.

Finalmente, la partícula queda libre y convertida en VLDL remanente (VLDLr), conocida como IDL. Esta partícula puede ser captada de nuevo por el hepatocito mediante LDLr o ser metabolizada a LDL por la LH<sup>11</sup>.

El papel de Apo A-V en la facilitación de la producción de VLDLr no está determinado. Recientemente se ha demostrado que niveles altos de Apo A-V, localizado en gotas lipídicas en el hígado, coinciden con altos niveles de TG almacenados, sugiriendo un papel de Apo A-V en la movilización de TG en la producción de VLDL<sup>11</sup>.

*Fig. 2: Síntesis de VLDL*



*Los TG resintetizados en el hígado se movilizan gracias al complejo que componen las VLDL.*

*Tomada de Hassing HC, Surendran RP. "Pathophysiology of hypertriglyceridemia". Biochimica et Biophysica Acta. 2011*

### **1.1.3 Metabolismo de las LDL**

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) contienen el 60-70% del colesterol total plasmático, por tanto, son las principales transportadoras de colesterol. Su eliminación del plasma es dependiente del receptor de LDL que reconoce Apo B-100<sup>4</sup>.

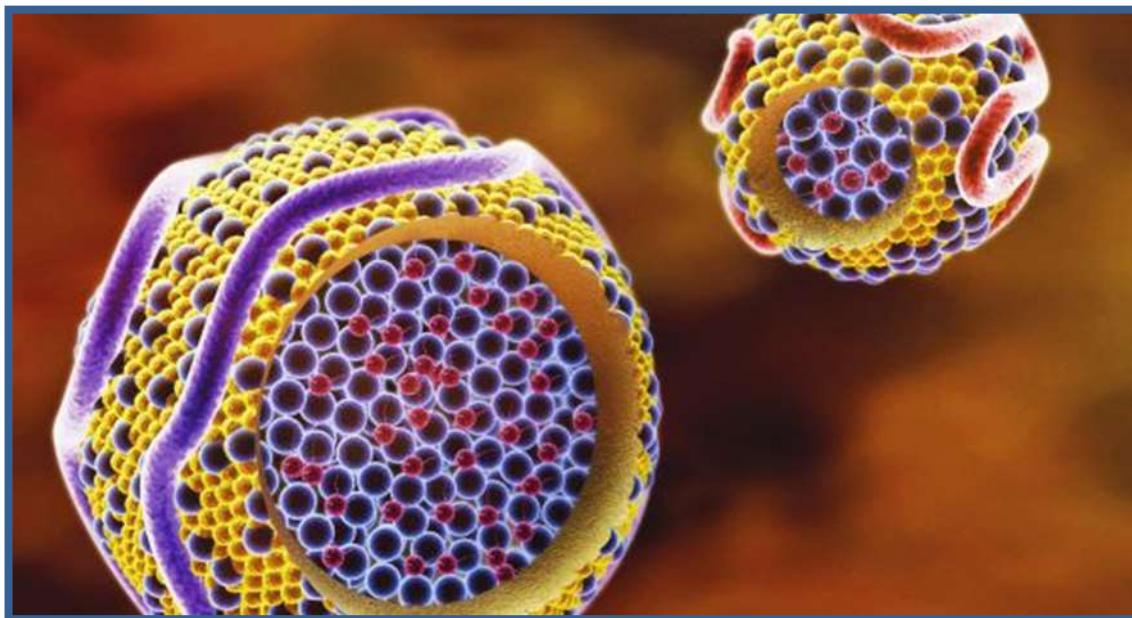
### **1.1.4 Metabolismo de las HDL**

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) están compuestas, aproximadamente, por un 50% de lípidos y un 50% de proteínas .Contienen el 20-30% del colesterol y su función principal es el transporte del colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para su catabolismo. Sus principales proteínas son Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo C y Apo E, siendo el componente esencial la Apo A-I, que se coloca a modo de cinturón junto con fosfolípidos, rodeando el colesterol<sup>4</sup>.

Las HDL nacientes van adquiriendo lípidos a través del flujo del colesterol y de la lipólisis de las lipoproteínas ricas en TG. Estas HDL nacientes se encuentran en muy baja concentración en el plasma, tan solo un 5%, ya que rápidamente se transforman a maduras<sup>12</sup>.

El riñón, el hígado y los tejidos esteroidogénicos son los principales sitios implicados en el catabolismo de las HDL. La eliminación de las HDL puede llevarse a cabo bien por captación selectiva de colesterol u otros lípidos de la partícula, o bien por endocitosis y degradación de toda la partícula.

**Fig. 3 Recreación de HDL (derecha) y LDL (izquierda).**



*Recreación virtual de las moléculas que transportan colesterol, siendo HDL (derecha) y LDL (izquierda). Tomada de SPL (age fotostock)*

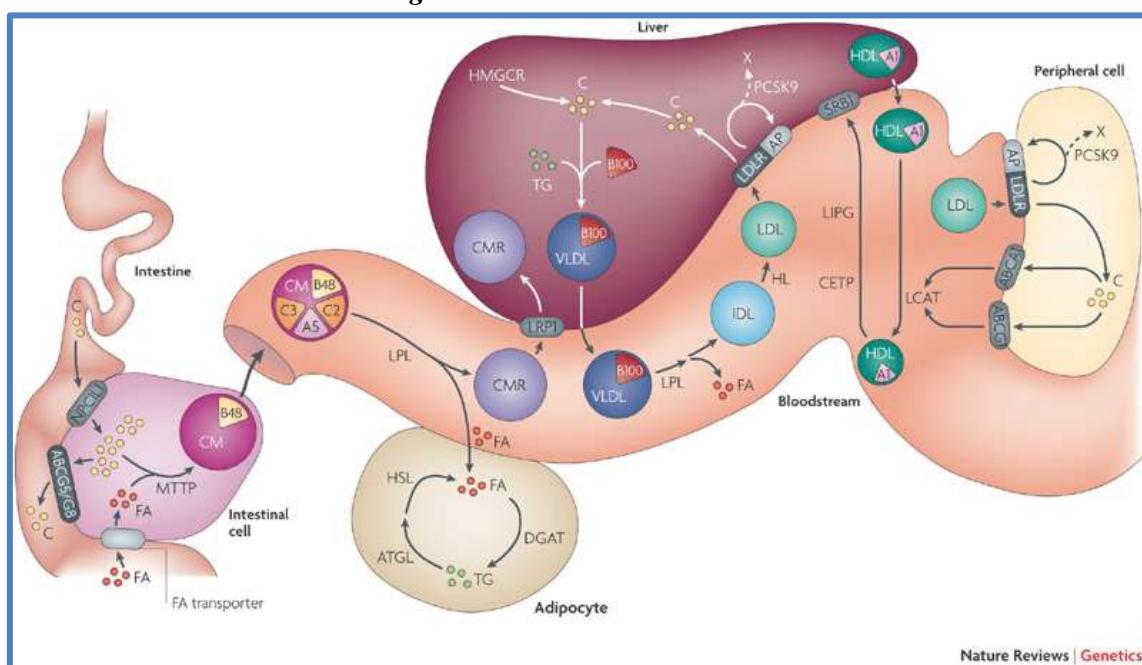
## 1.2. Metabolismo de los TG

Los niveles de TG en plasma pueden tener un origen exógeno (derivados de dietas ricas en ácidos grasos) o endógeno (provenientes de la síntesis hepática). En el intestino, los TG de la dieta son hidrolizados por la lipasa hepática en 2-monoglicerol (2-MN) y ácidos grasos libres (AGL) formando micelas<sup>13</sup>.

Los AGL entran en los enterocitos por medio del transportadores FABP (proteína unida a los ácidos grasos), como los CD36. En su interior los TG son re-sintetizados de nuevo por medio de la enzima DGAT, estos pueden ser hidrolizados de nuevo por la lipasa ATGL y por la lipasa sensible a hormonas (HSL)<sup>4</sup>. Posteriormente la MTP media el ensamblaje de los TG a la Apo B-48 y Apo-E en una primera etapa de formación de los QM. Estos QM se secretan al sistema linfático, después de su secreción los QM adquieren la Apo C-II, Apo C- III, que modulan en plasma el metabolismo de lipoproteínas ricas en TG<sup>14</sup>.

Los QM son secretados al sistema linfático, entran en la vena cava y circulan hasta que interactúan con la lipoprotein lipasa (LpL), la secreción de esta enzima depende del factor de maduración de la lipasa (LMF1) y está anclada al endotelio vascular por los proteoglicanos y por GPIHBP1<sup>4</sup>.

**Fig. 4. Metabolismo de los TG**



Los TG hidrolizados pasan al enterocito, donde son resintetizados por DGAT. Después se transportan por QM.

Tomada de Hegele.R.Plasma lipoprotein..Nature Rev Genet. 2009;10:109-19.

En el hígado, los TG son sintetizados a partir de AGL. La MTP hepática media el ensamblaje de TG con los ésteres de colesterol, la Apo B-100 y la Apo E, para formar VLDL<sup>15</sup>. En el tejido adiposo y los capilares musculares, los TG de los QM y las VLDL son hidrolizados en AGL por la lipasa endotelial. Los AGL son re-esterificados y almacenados en adipocitos o se lleva a cabo la  $\beta$ - oxidación de los mismos para obtener energía<sup>15</sup>.

## **2. DISLIPEMIAS**

Las dislipemias son un conjunto de patologías caracterizadas por alteraciones en las concentraciones lipídicas plasmáticas. Es un término genérico para denominar cualquier situación clínica en la cual existan concentraciones anormales de colesterol total, colesterol HDL (c-HDL), colesterol LDL (c-LDL) o TG<sup>1</sup>.

Se clasifican en primarias o secundarias, dependiendo del origen. Se considera primaria cuando no está vinculada a un factor ambiental, es decir, el origen es genético. Mientras que las dislipemias secundarias están asociadas a otros factores como la diabetes o la obesidad, o el alcoholismo, que alteran el metabolismo de lípidos.

### **2.1. Hipertrigliceridemia**

La hipertrigliceridemia (HTG) se define como la concentración sérica de TG en ayunas y sin tratamiento previo, por encima del percentil 90, ajustado por sexo y edad en la población<sup>15</sup>.

La HTG es una forma común de dislipemia que se encuentra asociada con la enfermedad cardiovascular<sup>16</sup>.

Existen varios trastornos genéticos comunes relacionados con las HTG que pueden generar un evento cardiovascular prematuro (ECP), que incluyen la hiperlipemia familiar combinada (HFC), la dislipemia residual en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y la hipoalfalipoproteinemia familiar, pudiendo ser los responsables del 50% de los ECP. En contrapartida, otra forma hereditaria de HTG, la hipertrigliceridemia familiar monogénica, comúnmente llamada HTG grave, no está asociada con ECP sino con pancreatitis aguda<sup>13</sup>.

La HTG secundaria está asociada a otros factores que derivan en el aumento de TG en sangre, como por ejemplo la obesidad, en particular la troncular, la diabetes mellitus tipo II, el hipotiroidismo, el consumo de alcohol, enfermedad renal o una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana<sup>3</sup>.

### **2.2. Fenotipos de las Hipertrigliceridemias**

La HTG de tipo 1 o hiperquilomicronemia (OMIM 238600), tiene una frecuencia en la población menor a 1:10<sup>6</sup> suele aparecer en la infancia o adolescencia y se caracteriza por niveles de TG de 1000-10000 mg/dl debidos a deficiencia en la actividad de la LpL o Apo C-II<sup>16</sup>. Suele ir acompañada de alteraciones cutáneas y oculares, así como pancreatitis recurrente<sup>15</sup>.

La mayoría de las HTG primarias se diagnostican en adultos, con un rango de TG entre 200 y 2000 mg/dl, principalmente debido a la acumulación de partículas VLDL, que pueden acompañarse o no de QM<sup>17</sup>.

Tradicionalmente se ha usado la clasificación Fredrickson (*Tabla 1*) para fenotipar las dislipemias<sup>9</sup>.

**Tabla 1:** Clasificación de Fredrickson de las dislipemias primarias

Tipo	Prevalencia en la población	Perfil lipídico	Variación en lipoproteína	Variaciones genéticas
<b>HLP tipo 1</b>	1:10 <sup>6</sup>	↑↑↑ TG ↑ CT	Alto QM con Baja LDL y VLDL	Mutaciones en <i>LPL</i> y también en Apo C-II
<b>HLP tipo 2A</b>	1:50	↑↑ CT	Alto LDL	Mutaciones en Apo B y LDLr
<b>HLP tipo 2B</b>	5%	↑↑ TG ↑↑ CT	Alto VLDL Alto LDL	Mutaciones en Apo B, Apo C-III y USF1
<b>HLP tipo 3</b>	1:10 <sup>4</sup>	↑↑ TG ↑↑ CT	Alto CT Alto TG	Mutaciones en homocigosis en Apo E
<b>HLP tipo 4</b>	5-10%	↑↑ TG ↑ CT	Alto VLDL	No se conoce
<b>HLP tipo 5</b>	1:10 <sup>8</sup>	↑↑↑ TG ↑ CT	Alto QM Alto VLDL	Mutaciones en heterocigosis en <i>LPL</i> en el 5-10% de los casos

HLP: hiperlipoproteinemia. TC: Colesterol total. TG: triglicéridos. LDL: Lipoproteína de baja densidad.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad. LPL: lipoproteína lipasa. ↑↑↑ Muy elevado (por encima del percentil 99 por edad y por sexo). ↑↑ Elevado (por encima del percentil 95 por edad y sexo).

↑ Moderadamente elevado (por encima del percentil 90).

### **3. VARIANTES GENÉTICAS ASOCIADAS A LA HTG**

La mayoría de las HTG se producen como resultado de la combinación de los factores ambientales genéticos. Identificar las variantes, tanto comunes como raras que se producen y originan el aumento de TG plasmáticos es esencial para conocer mejor las rutas del metabolismo lipídico, y así poder alcanzar el problema desde su origen y aplicar un tratamiento más específico, disminuyendo así el riesgo cardiovascular<sup>18</sup>.

Los GWAS son estudios estadísticos asocian los polimorfismos genéticos a las enfermedades que ocasionan. Gracias a estos estudios se han identificado nuevas regiones genómicas que pueden relacionarse con los TG para estudios posteriores<sup>19,20,21</sup>.

Sin embargo, para establecer totalmente la arquitectura genómica de las concentraciones de TG en plasma se requieren experimentos complementarios, incluyendo secuenciación, estudio con modelos animales, estudios de linaje y familiares, funciones celulares y experimentos bioquímicos<sup>19</sup>.

#### **3.1. Apolipoproteína AV e hipertrigliceridemia**

El gen que codifica para la Apo AV fue localizado dentro de la agrupación genética *APOA5-APOA4-APOC3-APOA1* en el cromosoma 11<sup>22</sup>. El gen de *APOA5* de 1,9 Kb se compone de 4 exones, que codifican 366 aminoácidos. Se expresa exclusivamente en hígado. El 80% de Apo A-V está asociado con QMs, VLDLs y HDLs, mientras que aproximadamente el 20% es retenido a nivel intrahepático asociado con gotas lipídicas<sup>11</sup>. Presumiblemente, Apo A-V afecta directamente al ensamblaje intracelular de VLDL o a su secreción a nivel hepático<sup>23</sup>.

Se ha observado en ratones que la sobreexpresión de *APOA5* disminuye marcadamente la concentración de TG plasmáticos<sup>24</sup>, mientras que en ratones *knock-out* (KO) para *APOA5* se observa una HTG grave<sup>25</sup>. La expresión de *APOA5* está regulada por factores transcripcionales, que están involucrados en las lipoproteínas plasmáticas y en la homeostasis de la glucosa, sugiriendo que responde a múltiples señales ambientales<sup>25</sup>. Sin embargo, su regulación y funciones moleculares son todavía desconocidas.

Algunas variantes comunes de *APOA5* se han asociado con los niveles de TG en plasma en numerosas etnias<sup>26</sup>. Uno de los polimorfismos más estudiados es c.-1131T>C, que afecta a la actividad transcripcional del gen *APOA5* y se encuentra asociado a la enfermedad cardiovascular<sup>27</sup>. El estudio del polimorfismo p.Ser19Trp demuestra que este cambio es más frecuente en pacientes con niveles elevados de TG en sangre comparados con el resto de la población<sup>27</sup>.

Los análisis funcionales realizados en las mutaciones en *APOA5* que se asocian con HTG, han revelado generalmente una pérdida de la actividad de LpL, particularmente cuando existe mutaciones en extremo C-terminal, que interfiere con la capacidad de Apo A-V para interactuar con lípidos y lipoproteínas<sup>28</sup>.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

- La población adulta afecta de HTG primaria grave presenta una mayor cantidad de variantes genéticas patogénicas comunes y no comunes en el gen *APOA5* que la población general.
- La HTG primaria grave con valores >500 mg/dl es causada por mutaciones funcionalmente graves en heterocigosisidad, y/o acumulación de variantes patogénicas comunes en el gen *APOA5* asociados con TG elevados.

Teniendo en cuenta estos hechos planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificar las variantes génicas, comunes y no comunes en el gen candidato: *APOA5* en sujetos con HTG grave de causa primaria.
2. Conocer si existe asociación entre las variantes alélicas del gen *APOA5* y la HTG mediante comparación de las frecuencias alélicas de la población hipertrigliceridemia frente a los 1000 genomas.
3. Analizar bioinformáticamente el efecto de las variantes encontradas en *APOA5*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Descripción de la muestra**

Seleccionamos 66 pacientes procedentes del Centro de Salud de la Almozara de Zaragoza, con edades comprendidas entre 26 y 79 años que presentaron HTG primaria grave con TG máximos por encima de 500 mg/dl cuando no estaban sometidos a tratamiento.

Establecimos como criterios de exclusión la hipertrigliceridemia secundaria debida a diabetes mellitus tipo II, obesidad (con índice de masa corporal superior a 30 kg/m<sup>2</sup>), hipotiroidismo, consumo de alcohol, insuficiencia renal crónica, hemocromatosis y tratamientos farmacológicos que elevan los TG.

### **2. Obtención de la muestra**

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa, tras ayuno previo de 10-12 horas. Se extrajeron 10 ml en un tubo con 1 ml de EDTA (ácido etilendiaminotetracético) como anticoagulante. A continuación la muestra sanguínea se centrifugó a 1800 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga Kubota 5220. Posteriormente el plasma obtenido, se distribuyó en alícuotas de 500 µl y se conservó a -80°C. El precipitado de las células sanguíneas se reconstituyó con un volumen de suero fisiológico igual al que se había retirado de plasma y se conservó a -80°C.

### **3. Obtención del DNA genómico**

El DNA genómico se aisló a partir de 10 ml de sangre periférica recogida sobre tubos con EDTA mediante el producto Flexigen® DNA (Qiagen) en el Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón).

### **4. Análisis de concentración y pureza**

Los ácidos nucleicos, debido a su estructura molecular, absorben la radiación en el rango del ultravioleta, a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 260 nm. Las proteínas, sin embargo, absorben la radiación a una  $\lambda$  de 280 nm. Tras la obtención del DNA se llevó a cabo el análisis de la concentración y pureza mediante espectrofotometría con un NanoDrop 1000 (ThermoScientific). La medida de la pureza se determinó mediante el cociente entre la absorbancia (A) medida a 260 nm y la obtenida a 280 nm. Se consideró que los valores óptimos de pureza eran los comprendidos entre 1.8-2.0 para la relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>.

Posteriormente, para homogeneizar las muestras, se llevaron a una concentración de trabajo de 100 ng/ml de DNA con TE 0,1X.

La preparación de TE 0.1X se realizó a partir de 1,211 gramos de Trizma® Base (Casa Comercial) y 0,336 gramos de EDTA-Na<sub>2</sub>, en 900 ml de agua, ajustándose el pH a 8 por la adición de ácido clorhídrico. Se conservó a 4°C y tras una dilución 1:10 a -20°C.

### **5. Amplificación por PCR de los genes de estudio**

La secuencia de Apo A5 se encuentra en la base de datos Ensembl.

Utilizando como referencia la secuencia ENSG00000110243 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) del gen *APOA5* se amplificaron el promotor, los 4 exones y las uniones exón-intrón mediante PCR. Debido a su gran tamaño, el exón 4 se dividió en dos fragmentos de amplificación: 4.1 y 4.2. Los exones 2 y 3 se amplificaron en único fragmento.

En cada reacción de amplificación se mezcló la enzima Biotaq DNA polimerasa (Bioline), el tampón 10x (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 2mM DTT, 50% glicerol), el MgCl<sub>2</sub>, los dNTPs (Life Technologies), los cebadores correspondientes, el DNA de interés y el agua destilada estéril hasta alcanzar un volumen final de 20 µl.

Las cantidades y concentraciones se muestran en la *tabla 2*.

**Tabla 2: Cantidad de los reactivos utilizados para la amplificación de *APOAV***

Reactivos	Concentración stock	Cantidad (µl)
Buffer	10x	2
dNTP	2 mM	2
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,6
Primer F del exón correspondiente	10 µM	0,4
Primer R del exón correspondiente	10 µM	0,4
Taq polimerasa	5 U/µl	0,12
dH <sub>2</sub> O estéril		13,5
DNA de cada muestra	100 ng/µl	1

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp® 9700 (*AppliedBiosystem*).

Los programas térmicos utilizados fueron diferentes para cada uno de los exones de acuerdo a las características de los cebadores y el producto de la PCR (*Tabla 3*). También los diferentes primers diseñados para la amplificación (*Tabla 4*).

**Tabla 3: Programas para el termociclador de los exones de APOAV**

Programas para el termociclador	
	<u><b>EXÓN 1</b></u>
94°C 2min 94°C 20seg 60°C 20seg 72°C 30 seg	40 ciclos
72° 4min 4°C ∞	
	<u><b>EXÓN 2-3</b></u>
94°C 2min 94°C 20seg 65°C 20seg 72°C 30 seg	40 ciclos
72° 4min 4°C ∞	
	<u><b>EXÓN 4.1</b></u>
94°C 2min 94°C 20seg 63°C 30seg 72°C 1min	40 ciclos
72° 4min 4°C ∞	
	<u><b>EXÓN 4.2</b></u>
95°C 2min 95°C 20seg 59°C 30seg 72°C 1min	40 ciclos
72° 10min 4°C ∞	

**Tabla 4: Cebadores para la amplificación del gen APOA5.**

Exón	Tamaño (nt) del producto	Secuencia de los cebadores
Exón 1	184	Directo: 5'-GTGAGTGCTGGGAGGCAGCTGAGGTCAACTT-3' Reverso: 5'-CCACCTGCAATGCCCTCCCTTAGGACTGTG-3'
Exón 2-3	408	Directo: 5'- GTGAGTGCTGGGAGGCAGCTGAGGTCAACTT-3' Reverso: 5'- CCACCTGCAATGCCCTCCCTTAGGACTGTG-3'
Exón 4.1	834	Directo: 5'- CAGAGGATCAGTGCAGCTGACTT-3' Reverso: 5'- ATGGCGCGAGTGAAGGCAGCTATC-3'
Exón 4.2	1042	Directo: 5'- GAGGTGCGCCAGCGACTT-3' Reverso: 5'- GGCAGTGCTCTTGCTACCTC-3'

El resultado de las diferentes amplificaciones se comprobó mediante electroforesis de 96V durante 15 minutos en un gel de agarosa al 2% en TAE 1x teñido con SYBR® Safe (*Lifetechnologies*).

## **6. Purificación del producto de PCR mediante ExoSAP-IT® (USB)**

Para purificar el producto de amplificación se utilizó el producto comercial ExoSAP-IT ® (USB) que contiene las enzimas exonucleasa I y fosfatasa alcalina de camarón (SAP), que elimina los cebadores y nucleótidos residuales. La enzima exonucleasa I degrada los cebadores residuales y cualquier DNA de cadena única, mientras que la SAP hidroliza los dNTPs remanentes de la mezcla de la PCR.

Se preparó una dilución 1:10 de ExoSAP-IT® (USB) en agua destilada estéril de la que se añadieron 2 µl a 5 µl del producto de PCR. En un termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystem*) se realizó una incubación a 37 °C durante 45 min seguida de 15 min a 80 °C con el objeto de inactivar al enzima.

Las muestras purificadas se conservaron a -20 °C para su posterior utilización.

## 7. Reacción de secuenciación

Los fragmentos amplificados y purificados se secuenciaron mediante electroforesis capilar. Para su preparación utilizamos el producto comercial BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (*Applied Biosystems*), que contiene un vial de BigDye v3.1 ReactionMix que contiene una DNA polimerasa termoestable y dNTPs marcados con fluorocromos y un vial con el tampón de secuenciación BigDye v3.1 5X que aporta las condiciones idóneas para la reacción enzimática. Todo el proceso se llevó a cabo en frío y protegiendo el reactivo BigDye de la luz.

Las reacciones se prepararon en un volumen final de 10 µl, y con el siguiente programa para el termociclador, según indica la *tabla 5*.

**Tabla 5. Reactivos y concentraciones de la reacción de secuenciación.**

Reactivo	Cantidad (µl)	Programa térmico
Big Dye	0,5	
Mix de reacción Big Dye 5x	1,75	96°C 1min
dH <sub>2</sub> O estéril	4,75	96°C 10seg 55°C 5seg
Primer de secuenciación (2,1µM)	1,5	60°C 4min
Producto purificado de PCR	1,5	4°C ∞

## 8. Precipitación alcohólica

El resultado de las reacciones de secuenciación se purificó por precipitación alcohólica con el fin de eliminar los terminadores sobrantes. En primer lugar añadimos 4 µl de EDTA 62,5 mM a los 10µl de la reacción de secuenciación. Preparamos una mezcla con: 2,6 µl de NaAc 3 M pH 5,2 con, 7,8 µl de agua destilada y 67,71 µl de etanol al 96% (v/v) de la que se añadieron 60 µl a la muestra. Seguidamente se centrifugó a 2.090 xg, 1 minuto a 4°C en una centrífuga 3-16K (*Sigma*).

Seguidamente, la muestra se incubó a temperatura ambiente y protegida de la luz, durante 15 minutos. A continuación, se centrifugó durante 30 minutos a 2.090 xg a 4 °C. Para eliminar el sobrenadante se realizó una centrifugación con las muestras invertidas durante 1 min a 180 xg, también a 4°C.

A continuación, se añadieron 70 µl de etanol al 70% y se centrifugaron las muestras durante 15 min a 4 °C a 2.090 xg. De nuevo se eliminó el sobrenadante centrifugando de forma invertida las muestras durante 1 min a 180 xg a 4°C. Finalmente, el pellet obtenido se guardó congelado a -20 °C para su posterior utilización.

Previamente a realizar la electroforesis capilar, se resuspendió el pellet en 20 µl de formamida (*LifeTechonologies*) y para la desnaturalización de las muestras se realizó una incubación en un termociclador GenAmp® 9700 (*AppliedBiosystems*) de 2 min a 94 °C.

La electroforesis capilar se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI 3500XL (*AppliedBiosystems*) en el Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del IIS Aragón.

El alineamiento y la lectura de las secuencias resultantes se llevó a cabo mediante el programa informático Variant Reporter™ (*AppliedBiosystems*).

## **9. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático SPSS 15.0 (*SPSS Inc.*) tomando como nivel significativo estadístico valores de p menor a 0,05 (p<0,05).

Para comprobar si una variable seguía la distribución normal se realizó un análisis de Kolmogorov-Smirnov. Los rasgos cuantitativos que siguieron una distribución normal se expresaron como media ± desviación estándar y se analizaron con la prueba T-Student, mientras que aquellas variables que no siguieron una distribución normal se expresaron como mediana y rango intercuartílico y se analizaron con el test U de Mann-Whitney. Las variables cualitativas, incluyendo la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas, se expresaron en porcentaje y se analizaron mediante Chi-cuadrado. También se estudió si la población estaba en equilibrio Hardy Weinberg.

Se realizó la comparación de las frecuencias alélicas de estas variantes comunes o polimorfismos en nuestra población de estudio frente a la población Europea del estudio de los 1000 Genomas ([www.1000Genomes.org](http://www.1000Genomes.org)).

## **10. Análisis bioinformático**

Para evaluar la patogenicidad de las variantes génicas identificadas, se usaron los siguientes programas informáticos y bases de datos, cuando el cambio era no sinónimo: PolyPhen-2<sup>29</sup>, SIFT<sup>30</sup> y MutationTaster<sup>31</sup>.

Polyphen-2 clasifica las variantes en benignas, posiblemente dañinas y probablemente dañinas, según si la secuencia estaba conservada y según la estructura de la proteína. SIFT cataloga las variantes en función de la homología de secuencia, como tolerante o intolerante. MutationTaster, se utilizó también para variantes que incluían codones de parada y alteraciones intrónicas o complejas, clasificándolas como posiblemente causales de la enfermedad o posiblemente polimorfismos.

## **RESULTADOS**

### **1. Características de la población de estudio**

El grupo de individuos seleccionados estuvo finalmente compuesto por 66 sujetos: 51 varones y 15 mujeres. En la *tabla 6* se muestran las características clínicas y bioquímicas de los sujetos. Como consecuencia de los criterios de inclusión, todos los sujetos presentaron una hipertrigliceridemia grave con una mediana de 655,5 mg/dl, en el estudio.

Para conocer si las variables se ajustaban a una distribución normal o binomial, aplicamos el test de Kolmogorov-Smirnov a las variables.

**Tabla 6: Características de la población de estudio.**

Variable	Distribución
Edad (años)	56,12 ± 12,06
Hombres (%)	77,27
Mujeres (%)	22,72
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,88 (25,76 - 29,75)
CT (mg/dl)	213 ± 47,90
HDLC (mg/dl)	47,97 ± 10,98
LDLC (mg/dl)	113,73 ± 34,99
TG (mg/dl)	270,88 ± 173,19
TG máximos (mg/dl)	655,50 (556 - 844)
TSH (mg/dl)	1,85 (1,41 - 2,60)
Glucosa (mg/dl)	102,5 (90 - 117,25)
Diabetes mellitus (%)	24,24
HbA1c (%)	5,77 ± 0,77
HTA (%)	39,39
CVD (%)	10,6
Tabaco (%)	36,36

Las variables cuantitativas se expresan como Media ± Desviación estándar, excepto para las variables que no siguen la distribución normal (mediana, rango intercuartiles). Las variables cualitativas se expresan como %. IMC: Índice de masa corporal; CT: colesterol total, TG: triglicéridos, cHDL: colesterol HDL, cLDL: colesterol LDL, TSH: hormona tiroidea, HbA1c: hemoglobina glicosilada, CVD: enfermedad cardiovascular, HTA: hipertensión arterial.

## **2. Identificación de las variantes del gen APOA5**

Para la identificación de las variantes comunes y la detección de mutaciones nuevas y previamente descritas en el gen *APOA5* asociadas con HTG, se realizó la secuenciación automática del promotor, los exones y los nexos de unión-intrón del gen *APOA5*, tal y como se describe en el apartado 7 del capítulo *Materiales y Métodos*.

El análisis de las frecuencias genotípicas (*tabla 7*) mostró que todos los polimorfismos a excepción de las variantes c.-3A>G; c.162-43 A>G; c.\*158 C>T se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (*tabla 7*), siendo su frecuencia la esperada en la población general.

La comparación de las frecuencias genotípicas entre la población hipertrigliceridémica estudiada y los 1000 Genomas se llevó a cabo mediante la prueba Chi-cuadrado. Observamos que todas las variantes en las que se pudo calcular el p-valor excepto c.\*31C>T mostraron una distribución de genotipos diferente a la esperada. Se observó un incremento de los genotipos portadores del alelo menor en detrimento de los homocigotos para el alelo mayor.

Se realizó la comparación (*tabla 8*) de las frecuencias alélicas de estas variantes comunes o polimorfismos en nuestra población de estudio frente a la población Europea del estudio de los 1000 Genomas ([www.1000Genomes.org](http://www.1000Genomes.org)). Los SNPs c.-3A>G, p.Ser19Trp, p.Iso44Iso y c.162-43A>G mostraron una frecuencia significativamente mayor en los sujetos con HTG ( $p <0.05$ ).

Finalmente realizamos el análisis informático de las variantes encontradas.

Todas las variantes que supusieron un cambio no sinónimo fueron analizadas con los programas informáticos PolyPhen-2<sup>29</sup>, SIFT<sup>30</sup> y MutationTaster<sup>31</sup>, las variantes que se encontraban en promotores o dieron lugar a un codón de parada sólo pudieron ser analizadas por MutationTaster. El resultado de este análisis bioinformático se muestra en la *tabla 9*.

**Tabla 7: Frecuencias genotípicas de los SNPs identificados en el gen APOA5 en la población con HTG y los 1000 Genomas de la población europea.**

SNP		FRECUENCIAS GENOTÍPICAS						p	Equilibrio HW
Variante	SNPdb	HTG			1000 GENOMAS				p
		Genotipos	N	Frecuencia	Genotipos	N	Frecuencia		
c.-3 A>G	rs651821	AA	47	0.712	AA	321	0.847	<0.001	0.001
		AG	13	0.197	AG	55	0.145		
		GG	6	0.091	GG	3	0.007		
p.Ser19Try	rs3135506	CC	44	0.667	CC	379	0.900	<0.001	0.82
		CG	19	0.288	CG	37	0.088		
		GG	3	0.045	GG	3	0.007		
p.Iso44Iso	rs12287066	CC	45	0.682	CC	338	0.892	<0.001	0.70
		CA	18	0.272	CA	38	0.100		
		AA	3	0.045	AA	3	0.008		
c.162-43A>G	rs2072560	GG	49	0.754	GG	321	0.847	<0.001	0.000
		GA	11	0.169	GA	55	0.145		
		AA	5	0.077	AA	3	0.008		
p.Gln97*	rs201079485	CC	64	0.969				NA	0.98
		CA	2	0.030					
		AA	0	0.000					
p.Val153Met	rs3135507	GG	60	0.910	GG	359	0.925	NA	0.89
		GA	6	0.090	GA	29	0.075		
		AA	0	0.000	AA	0	0.000		
p.Leu173Pro		TT	65	0.984				NA	0.99
		CT	1	0.015					
		CC	0	0.000					
c.*31C>T	rs619054	CC	43	0.651	CC	226	0.596	0.24528	0.51
		CT	19	0.288	CT	137	0.361		
		TT	4	0.061	TT	16	0.042		
c.*76 C>T	rs34089864	CC	62	0.940	CC	359	0.947	NA	0.95
		CT	4	0.061	CT	20	0.053		
		TT	0	0.000	TT	0	0.000		
c.*158 C>T	rs2266788	TT	47	0.712	TT	313	0.826	<0.001	0.001
		TC	13	0.197	TC	63	0.166		
		CC	6	0.091	CC	3	0.008		
c.*288_*289dupAG	rs148759216	-/-	62	0.940	-/-	357	0.942	NA	0.95
		-/CT	4	0.061	-/CT	22	0.058		
		CT/CT	0	0.000	CT/CT	0	0.000		
c.*394T>C	rs33984246	TT	62	0.940	TT	357	0.942	NA	0.95
		TC	4	0.061	TC	22	0.058		
		CC	0	0.000	CC	0	0.000		

N: número individuos; p: grado de significación estadística según la prueba Chi- cuadrado

**Tabla 8:** Frecuencias alélicas de los SNPs identificados en el gen *APOA5* en la población con HTG y los 1000 Genomas de la población europea.

Variante	SNPdb	Exón	Alelo menor	Frecuencia alélica en HTG	Frecuencia alélica en 1000 Genomas	p
c.-3 A>G	rs651821	2-3	G	0,19	0,08	0,0001
p.Ser19Trp	rs3135506	2-3	G	0,19	0,06	0,0000
p.Iso44Iso	rs12287066	2-3	A	0,18	0,06	0,0000
c.162-43 A>G	rs2072560	4.1	A	0,16	0,08	0,0032
p.Gln97*	rs201079485	4.1	T	0,01		
p.Val153Met	rs3135507	4.1	A	0,05	0,04	0,69
p.Leu173Pro		4.1	C	0,008		
c.*31C>T	rs619054	4.2	T	0,2	0,22	0,63
c.*76C>T	rs34089864	4.2	T	0,03	0,02	0,79
c.*158 C>T	CR014773	4.2	C	0,19		
c.*288_*289dupAG	rs148759216	4.2	AG	0,03	0,03	0,93
c.*394T>C	rs33984246	4.2	C	0,03	0,03	0,93

p: grado de significación estadística según la prueba Chi- cuadrado

**Tabla 9:** Análisis bioinformático de las variantes encontradas en el gen *APOA5*

Variante	SNPdb	Polyphen-2	SIFT	MutationTaster
c.-3A>G	rs651821	NA	NA	Polimorfismo 0.999
p.Ser19Trp	rs3135506	PrD	0	Polimorfismo 0.999
p.Iso44Iso	rs12287066	NA	NA	Polimorfismo 0.999
c.162-43A>G	rs2072560	NA	NA	Polimorfismo 0.999
p.Gln97*	rs201079485	NA	NA	Causal de enfermedad 1
p.Val153Met	rs3135507	B	0.12	Polimorfismo 0.999
p.Leu173Pro		PrD	NA	Polimorfismo 0.999
c.*31 C>T	rs619054	NA	NA	Polimorfismo 0.999
c.*76 C>T	rs34089864	NA	NA	Polimorfismo 0.999
c.*158 C>T	rs60220612	NA	NA	Polimorfismo 0.999
c.*288_*289dupAG	rs148759216	NA	NA	Polimorfismo 0.999
c.*394T>C	rs33984246	NA	NA	Polimorfismo 0.999

PolyPhen-2 establece un rango de 0 a 1. Las variantes se consideran PrD (Probablemente dañinas), PoD (Posiblemente dañinas) o B (Benignas). La puntuación que establece SIFT va de 0 a 1. Una sustitución de aminoácido se predice como dañino cuando la puntuación es  $\leq 0.05$  y tolerante si la puntuación es  $> 0.05$ . Mutation Taster analiza la probabilidad de que una variante sea causante de enfermedad o polimorfismo. NA: no analizado.

El análisis mediante PolyPhen-2 y SIFT mostró que el SNP p.Ser19Trp, clásicamente asociado con HTG, es potencialmente dañino y por tanto probablemente causal para la enfermedad, tal y como también resultó del análisis con Mutation Taster. También cabe destacar la variante p.Gln97\*, que genera un codón de parada, dando lugar a una proteína truncada y una variante no descubierta previamente p.Leu173Pro, cuyo análisis bioinformático predijo su patogenicidad según PolyPhen-2 pero no según Mutation Taster, dando lugar a una controversia.

El resto de variantes no pudieron ser analizadas por PolyPhen-2 y SIFT o resultaron benignas en el análisis de Mutation Taster.

## **DISCUSIÓN**

En este trabajo hemos analizado mediante secuenciación el promotor, exones y nexos de unión exón-intrón del gen *APOA5* en 66 sujetos con HTG primaria. El 4,55% de los pacientes resultaron portadores de 2 variantes raras (p.Gln97\* y p.Leu173Pro).

Dos de los pacientes del estudio resultaron heterocigotos para la mutación p.Gln97\*, que produce una proteína aberrante, y había sido descrita con anterioridad como causal de HTG por Priore et al<sup>32</sup>.

La variante p.Leu173Pro, descrita por primera vez este trabajo, se encontró en un paciente en heterocigosis. Su análisis bioinformático la predijo como una variante patogénica según PolyPhen-2 y como un polimorfismo por Mutation Taster, por tanto, la podemos considerar como una variante controvertida que requiere un análisis más profundo.

Mutaciones que provocan un codón de parada en los aminoácidos 131 y 148 se ha observado que no se unen a las lipoproteínas circulantes<sup>33, 34</sup>, por tanto puede ser que un cambio de aminoácido en esta posición (p.Val153Met) produzca un cambio de conformación en la proteína suficientemente grave como para dar lugar a hipertrigliceridemia.

Además, hemos identificado variantes comunes o polimorfismos que se asocian con la HTG ya que se encuentran en una frecuencia alélica diferente de la que se observa en población general, según la base de datos europea de los 1000 Genomas: c.-3A>G, p.Ser19Trp, p.Iso44Iso y c.162-43 A>G.

El SNP p.Ser19Trp se ha asociado en trabajos previos con la HTG grave<sup>35</sup>. Los pacientes de este estudio presentaron una concentración mediana de TG de 665,5 mg/dl, lo que explica la menor frecuencia de defectos raros en nuestro estudio comparadas con el trabajo publicado por Surendran et al<sup>36</sup>, que encontró 46 mutaciones en 86 pacientes seleccionados por sufrir hiperquilomicronemia y por tanto, con niveles más altos de TG.

Nuestros resultados confirman que la HTG primaria es altamente heterogénea en su etiología y se asocia con la acumulación de variantes comunes y raras en *APOA5*.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que la HTG primaria del adulto con TG alrededor de 500-1000 mg/dl presenta mayor cantidad de variantes genéticas respecto a la población general, con una combinación de mutaciones de efecto entre moderado y agresivo, y polimorfismos clásicamente asociados con la enfermedad.

## **CONCLUSIONES**

1. Hemos identificado 2 mutaciones en *APOA5* en 3 de 66 pacientes con HTG primaria grave.
2. Hemos identificado la mutación p.Leu173Pro, no descrita anteriormente, en 1 sujeto con HTG primaria grave.
3. Los polimorfismos c.-3A>G, pSer19Tyr, pIso44Iso, c.162-43 >G en *APOA5* presentaron una distribución de la frecuencia alélica diferente a la población europea de los 1000 Genomas ( $p<0,05$ ), siendo más frecuentes en hipertrigliceridémicos.
4. Las variantes comunes p.Ser19Tyr, p.Glu79\*, que aparece en dos hermanos, y la mutación p.Leu173Pro se consideran potencialmente dañinas conforme al análisis bioinformático.

## **CONCLUSIONS**

1. Two *APOA5* mutations have been identified in 3 of 66 patients with severe HTG
2. We have identified the *APOA5* p.Leu173Pro mutation, not previously described, in 1 subject with severe HTG.
3. The following *APOA5* polymorphisms: c.-3A>G, pSer19Tyr, pIso44Iso, c.162-43 >G showed a different distribution of allelic frequency from the European population in the 1000 Genomes ( $p<0,05$ ).
4. The *APOA5* p.Ser19Tyr, p.Glu79\* common variants, present in two brothers, and the p.Leu173Pro mutation are considered as potentially damaging according to bioinformatics analysis.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Durrington P. **Dyslipidaemia.** *Lancet.* 2003;362:717-31.
2. Nelson D.L; Cox M.M. **Lípidos.** Lehninger, Principios de bioquímica. 2005 4<sup>a</sup> Ed:343-368.
3. Rader DJ, Mangelsdorf DJ. **The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 57:1709-19.
4. Hegele RA. **Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications.** *Nature Rev Genet.* 2009;10:109-19.
5. Carmena R, Duriez P, Fruchart JC. **Atherogenic lipoprotein particles in Atherosclerosis.** *Circulation.* 2004;109(suppl III): III-2 –III-7.
6. Iqbal J, Hussain MM. **Intestinal lipid absorption.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:1183-94.
7. Yen CL, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese Jr. **Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis.** *J Lipid Res.* 2008;49:2283-301.
8. Choi SY, Hirata K, Ishida T, Queterous T, Cooper AD. **Endothelial lipase: a new lipase on the block.** *J Lipid Res.* 2002;43:1763-9.
9. Hassing H C, Surendran RP, Mooij HL, Stroes ES, Nieuwdrop M, Dallinga-Thie GM. **Pathophysiology of hypertriglyceridemia.** *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821:826-32.
10. Havel JL, Hamilton RL. **Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:213-5.
11. Shu X, Nelbach L, Ryan RO, Forte TM. **Apolipoprotein A-V associated with intrahepatic lipid droplets and influences triglyceride accumulation.** *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801:605-8.
12. Rye K, barter P. **Formation and metabolism of prebeta- migrating lipid-poor apolipoprotein A-I.** *Arterioscler Tromb Vas Biol.* 2004;24:421-9.
13. JohnD.Brunzell, M.D. **Hypertriglyceridemia.** *N Engl J Med.* 2007;357:1009-26.
14. Christoper T, Johansen and Robert A, Hegele MD. **Genetic bases of hypertriglyceridemia phenotypes.** *Cur Opin Lipidol.* 2011;22:247-53.
15. Hegele R, Pollex RL. **Hypertriglyceridemia: phenomics and genomics.** *Mol Cell Biochem.* 2009;326:35-43.
16. Connelly PW, Maguire GF, Little JA. **Structure of apolipoprotein C- II deficiency associated with premature vascular disease.** *J Clin Invest.* 1987;80:1597-606.
17. Santamarina-Fojo, S. **The familial chylomicronemia syndrome.** *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998;27:551-5.
18. Attia J, Ioannidis JP. **How to use an article about genetic association: A: Background concepts.** *JAMA.* 2009;301:74-81.
19. Attia J, Ioannidis JP. **How to use an article about genetic association: B: Are the results and of the study valid?** *JAMA.* 2009;301:191-7.

20. Attia J, Ioannidis JP. **How to use an article about genetic association: C: What are the results and they help me in caring for my patients?** JAMA. 2009;301:304-8.
21. Brunzell JD, Deeb SS. **Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. Apo C- II Deficiency and Hepatic Lipase Deficiency.** The metabolic and molecular bases of inherited this is. New York: Mc Graw-Hill. 2001.117;2789-2808.
22. Van der Vielt HN, Schaap FG. **Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice.** Biochem Biophys Res Commun. 2002;295:1156-9.
23. Jakel HM, Nowak A, Fruchart- Najib and Fruchart JC. **Is apolipoprotein A5 a novel regulator of triglyceride rich lipoproteins?** Ann Med. 2006;38:2-10.
24. Criqui MH, Heiss G, Cohn R et al. **Plasma Triglyceride level and mortality from coronary heart disease.** N Engl J Med. 1993;328:1220-5.
25. Dorfmeister BW, Zeng A, Dichlberger SK. **Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding.** Arterioscler Thromb Vas Biol. 2008;28:1866-71.
26. Patermiti JR, brown WV, Ginsberg HN and Artzt K. **Combined lipase deficiency (cld): a lethal mutation on chromosome 17 of the mouse.** Science. 1983;221:167-9.
27. Hubacek JA, Skodova Z, Adamkova V. **The influence of APOAV polymorphisms (T-1131>C and S19>W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction.** Clinical Genetics. 2004; 65:126-130.
28. Dootlittle MH, NeherSb, Ben- Zeev O, Ling-Liao J, Gallagher CM et al. **Lipase maturation factor LMF1, membrane topology and interaction with lipase proteins in the endoplasmic reticulum.** J Biol Chem. 2009;284:33623-33.
29. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. **A method and server for predicting damaging missense mutations.** Nature Method. 2010;7:248–249.
30. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. **Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm.** Nature Protocols. 2009;4: 1073–81.
31. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. **MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations.** Nature Methods. 2010;7:575–6.
32. Priore Oliva C<sup>1</sup>, Carubbi F, Schaap FG, Bertolini S, Calandra S. **Hypertriglyceridaemia and low plasma HDL in a patient with apolipoprotein A-V deficiency due to a novel mutation in the APOA5 gene.** J Intern Med. 2008; 263(4):450-8
33. Marcais C. **Apoa5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment.** J Clin Invest. 2005; 115: 2862–9.

34. Mendoza-Barberá E, Julve J, Nilsson SK et al. **Structural and functional analysis of APOA5 mutations identified in patients with severe hypertriglyceridemia.** *J. Lipid Res.* 2013; 54: 649–61.
35. Wang J, Cao H, Ban MR et al. **Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650).** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2450–5.
36. Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S et al. **Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia.** *J Intern Med.* 2012; 272: 185–96.