



Universidad
Zaragoza

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Análisis de variantes genéticas en *LIPC* en sujetos con concentraciones extremas de colesterol transportado por HDL

Analysis of genetic variants in *LIPC* in subjects with extreme concentrations of HDL-cholesterol

Autora

Adonia Gabriela Ilie

Directora

Dra. Irene Gracia Rubio
(Dpto. Anatomía e Histología Humanas)

Hospital Universitario Miguel Servet
Instituto de investigación Sanitario Aragón (IISA)
Grupo de investigación “GIIS007 Dislipemias primarias”



Universidad Zaragoza



**Instituto de Investigación
Sanitaria Aragón**

**FACULTAD DE MEDICINA
ZARAGOZA 2024-2025**

ABREVIATURAS

ABCA1	Proteína transportadora de la familia ABC
ABCG1	Miembro 1 de la Subfamilia G del Cassete de Unión a ATP
Apo A1	Apolipoproteína A1
Apo B	Apolipoproteína B
CEICA	Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón
CEPT	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
cHDL	Colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad
cLDL	Colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad
CT	Colesterol total
DM	Diabetes mellitus
ECV	Enfermedad cardiovascular
FL	Fosfolípidos
FFA	Ácidos grasos libres
GGT	Gamma glutamil transferasa
GPT	Transaminasa glutámico-pirúvica
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HTA	Hipertensión arterial
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IMC	Índice de masa corporal
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LE	Lipasa endotelial
LH	Lipasa hepática
LIPC	Gen <i>LIPC</i>
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LPL	Lipoprotein lipasa
Mix F	Mezcla para la reacción directa
Mix R	Mezcla para la reacción inversa
Pb	Pares de bases
PCR	Proteína C reactiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SR-B1	Receptor scavenger de clase B, tipo 1
TG	Triglicéridos
TM	Temperatura de fusión
TRC	Transporte reverso del colesterol
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

ÍNDICE

RESUMEN	4
1. RESUMEN	4
2. PALABRAS CLAVE.....	4
ABSTRACT	5
1. ABSTRACT.....	5
2. KEY WORDS.....	5
INTRODUCCIÓN	6
1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	6
2. LIPC.....	8
2.1 LIPC EN EL METABOLISMO LIPOPROTÉICO	8
2.2 LIPC EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	10
2.3 VARIANTES GENÉTICAS DE LIPC	11
OBJETIVOS DEL ESTUDIO	14
1. OBJETIVO GENERAL	14
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. SELECCIÓN DE SUJETOS.....	15
2. PARÁMETROS CLÍNICOS Y ANTROPOMÉTRICOS.....	15
3. EXPLORACIÓN ECOGRÁFICA.....	15
4. ANÁLISIS BIOQUÍMICO	16
5. OBTENCIÓN DEL ADN GENÓMICO.....	16
6. DISEÑO DE CEBADORES.....	16
7. AMPLIFICACIÓN DEL GEN A ESTUDIO POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	18
8. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO PCR MEDIANTE EXOSAP-IT	19
9. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.....	19
10. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	20
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
12. FUNDAMENTOS ÉTICOS.....	21
RESULTADOS	22
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, BIOQUÍMICAS Y ANTROPOMÉTRICAS	22
2. VARIANTES DEL GEN LIPC.....	23
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	31
ANEXO	36

RESUMEN

1. RESUMEN

Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) es la presencia de niveles elevados de colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad (cLDL). Por otro lado, el colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) ha sido tradicionalmente considerado un factor protector, ya que numerosos estudios han evidenciado su asociación inversa con el riesgo de ECV, debido a su papel en el transporte reverso de colesterol (TRC). Sin embargo, investigaciones más recientes han puesto en duda esta relación lineal, proponiendo que la asociación entre los niveles de cHDL y el riesgo cardiovascular podría ajustarse mejor a un modelo en forma de “U”, en el que tanto concentraciones muy bajas como muy elevadas podrían estar vinculadas a un mayor riesgo cardiovascular. El gen *LIPC* codifica la lipasa hepática, una enzima clave en el metabolismo lipoproteico cumpliendo dos funciones. Por un lado, hidroliza los triglicéridos y fosfolípidos presentes en las HDL y en las LDL, y, por otro lado, actúa como ligando, facilitando la unión de lipoproteínas a los receptores de la superficie de los proteoglicanos. Su doble función es esencial en el TRC. El objetivo de este estudio fue identificar las variantes del gen *LIPC* en 74 individuos con concentraciones extremas de cHDL. El análisis clínico, bioquímico y antropométrico reveló que los individuos con cHDL elevado tienen menor concentración de proteína C reactiva, índice de masa corporal y menor incidencia de ECV, así como mayores concentraciones de apolipoproteína A1 y una edad promedio más alta, reforzando el papel protector del cHDL frente a la aterosclerosis. En el análisis de las variantes genéticas se identificaron 16 variantes de las cuales dos se encontraron exclusivamente en el grupo con niveles de cHDL bajo: rs768938270 (c.212C>G, p.(Thr71Arg)) y rs6080(c.575-8C>A) y otra variante se encontró en el grupo de cHDL alto: rs1477741062 (c.-380G>A). Se identificaron dos variantes deletéreas: rs3829462 (c.1068C>A, p.(Phe356Leu)) y rs6080 (c.575-8C>A). Además, se observaron diferencias significativas en la frecuencia alélica de las variantes identificadas en individuos con niveles extremos de cHDL al compararlos con la población europea general, según los datos de la base gnomAD.

2. PALABRAS CLAVE

- Enfermedad cardiovascular (ECV)
- Lipasa hepática (LH)
- *LIPC*
- Colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad (cHDL)
- Variantes genéticas
- Metabolismo lipoproteico

ABSTRACT

1. ABSTRACT

One of the main risk factors for the development of cardiovascular disease (CVD) is the presence of high levels of low-density lipoprotein cholesterol (cLDL). On the other hand, high-density lipoprotein cholesterol (cHDL) has traditionally been considered a protective factor, as numerous studies have shown an inverse association with CVD risk and due to its role in reverse cholesterol transport (RCT). However, more recent research has questioned this linear relationship, proposing that the association between cHDL levels and cardiovascular risk may follow a “U” shaped pattern, where both very low and very high concentrations are associated with increased risk. The *LIPC* gene encodes hepatic lipase (LH), a key enzyme in lipoprotein metabolism that performs two main functions. On one hand, it hydrolyzes triglycerides, and phospholipids present in HDL and LDL; on the other hand, it acts as a ligand, facilitating the binding of circulating lipoproteins to proteoglycan surface receptors. This dual role is essential in RCT. The main goal of this study was to identify variants of the *LIPC* gene in 74 individuals with extreme cHDL concentrations. Clinical, biochemical, and anthropometric analyses revealed that individuals with high cHDL levels had lower concentrations of C-reactive protein, lower body mass index, and a lower incidence of CVD, as well as higher levels of apolipoprotein A1 and a higher average age. These findings support the protective role of cHDL against atherosclerosis. Genetic analysis identified 16 variants in the *LIPC* gene, of which two were exclusive to the low cHDL group: rs768938270 (c.212C>G, p.(Thr71Arg)) y rs6080 (c.575-8C>A) and one was exclusive to the high cHDL group: rs1477741062 (c.-380G>A). Two deleterious variants were identified: rs3829462 (c.1068C>A, p.(Phe356Leu)) and rs6080 (c.575-8C>A). Moreover, significant differences were observed in the allele frequency of the variants identified in individuals with extreme cHDL levels, when compared to the general European population, according to gnomAD database.

2. KEY WORDS

- Cardiovascular disease (CVD)
- Hepatic lipase (LH)
- *LIPC*
- High-density lipoprotein Cholesterol (cHDL)
- Genetic variants
- Lipoprotein metabolism

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte a nivel mundial, representando en torno al 30% de las muertes en el 2019. De estas muertes, el 85% se debieron a infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares. La mayoría de las enfermedades cardiovasculares pueden prevenirse abordando factores de riesgo conductuales y modificables.(1)

El metabolismo lipídico desempeña una función crucial en la salud del sistema cardiovascular y ha sido reconocido como un elemento determinante en el origen y avance de afecciones cardiovasculares, como la cardiopatía coronaria (2). La evidencia proveniente de estudios genéticos, cohortes, estudios de aleatorización mendeliana y ensayos clínicos aleatorizados concluye que el colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad (cLDL), no es solo un marcador asociado a mayor riesgo, sino un factor causal directo en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. La reducción del riesgo cardiovascular está directamente relacionada con el grado en que se logre disminuir el cLDL (3). El efecto aterogénico del LDL se debe a que puede quedar retenido y acumularse bajo el endotelio, lo que desencadena una respuesta inflamatoria local compleja que culmina en la formación y progresión de la placa arterioesclerótica (4).

Por otro lado, el colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad (cHDL) ha sido ampliamente estudiado y demostrado su papel protector frente a las ECV cuando se encuentra en concentraciones elevadas, mientras que niveles bajos se asocian con un mayor riesgo cardiovascular (5–7). Sin embargo, estudios recientes han revelado que esta asociación no sigue una línea recta, sino que presenta un modelo en forma de “U”, existe un nivel óptimo de las concentraciones de cHDL, y tanto valores muy bajos como muy altos pueden asociarse con mayor riesgo. Esta afirmación sugiere que el efecto protector de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) frente a la aterosclerosis podría estar más vinculado a su funcionalidad que a su concentración en sangre (6,7).

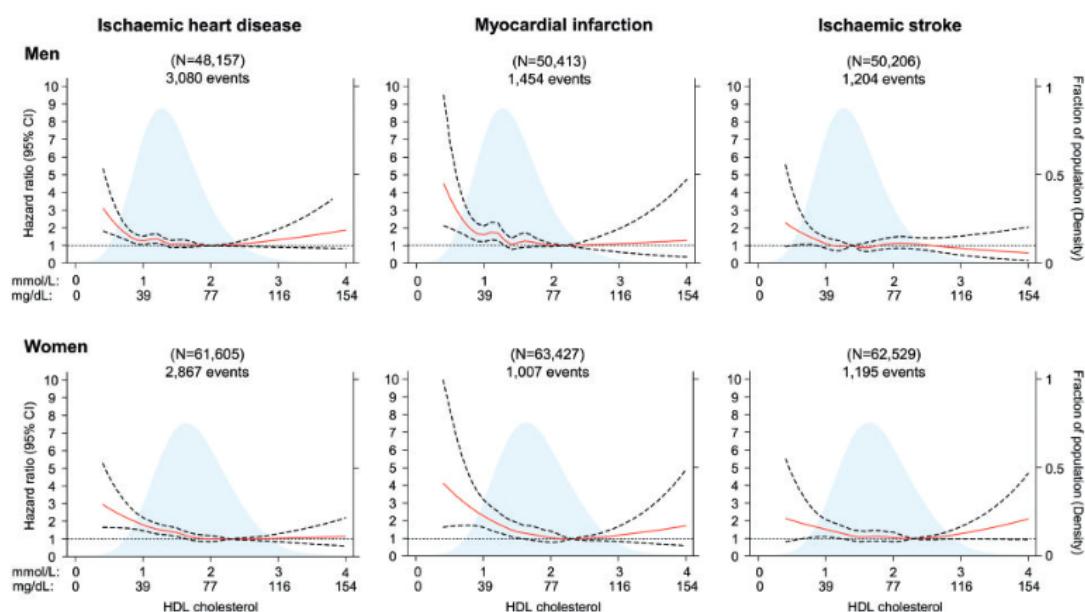


Figura 1. Gráfico que muestra cómo varía el riesgo de mortalidad según los niveles de cHDL en la población general en relación con el riesgo de infarto, enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular. La línea continua roja representa el riesgo relativo, mientras que las líneas discontinuas indican el intervalo de confianza del 95%. El área azul refleja cómo están distribuidos los niveles de cHDL en la muestra analizada (7).

Los triglicéridos (TG) también son esenciales en el metabolismo lipídico y están estrechamente relacionados con el desarrollo de ECV. Dos enzimas clave en su descomposición son la lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa hepática (LH), que convierten los TG en ácidos grasos, los cuales se usan como energía o se almacenan en el tejido adiposo. La disfunción de estas enzimas, como en el caso de la diabetes tipo 2, puede causar un aumento de los TG, que está vinculado a un mayor riesgo cardiovascular (2).

En el desarrollo de la ECV otro factor importante es la lipoproteína (a) (Lp(a)). Esta lipoproteína es una molécula con una estructura compleja y funciones biológicas particulares. Participa activamente en procesos inflamatorios a través de diversos mecanismos, promoviendo disfunción del endotelio, activación de células inmunitarias como monocitos y macrófagos, así como el crecimiento de células musculares lisas, contribuyendo al desarrollo de la ECV. Aunque cada vez hay más consenso sobre la importancia de medir los niveles de Lp(a) al menos una vez en la vida, persisten dudas sobre su manejo, debido a su origen genético y a la falta de tratamientos específicos para reducirla. Sin embargo, entidades como la Sociedad Europea de Cardiología y la Sociedad Española de Arteriosclerosis recomiendan cuantificarla y controlar intensivamente otros factores de riesgo en quienes presentan niveles altos. Identificar estos niveles también permite el cribado familiar, mejora el control del riesgo y facilita el desarrollo de estrategias personalizadas (8).

En las últimas décadas, se ha consolidado la importancia de los factores de riesgo clásicos como la hipertensión, la diabetes, la obesidad, el tabaquismo y la dislipidemia en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, investigaciones recientes han identificado factores de riesgo que enriquecen el abordaje clínico del riesgo cardiovascular. Uno de los más relevantes es la proteína C reactiva (PCR), un marcador de inflamación que ha demostrado ser útil para predecir eventos cardiovasculares como el infarto agudo de miocardio, el accidente cerebrovascular y la enfermedad vascular periférica. Gracias al desarrollo de pruebas de alta sensibilidad para cuantificar la PCR, se dispone actualmente de una herramienta diagnóstica sencilla, económica y estandarizada. Su utilidad ha sido validada en múltiples estudios epidemiológicos a lo largo de los últimos 20 años, en los que se ha evidenciado su papel activo en los procesos inflamatorios implicados en la aterosclerosis. La PCR no solo complementa a los factores de riesgo tradicionales, sino que también permite estratificar el riesgo cardiovascular en categorías baja, intermedia y alta, según sus niveles plasmáticos (<0,1 mg/dL, 0,1–0,3 mg/dL y >0,3 mg/L, respectivamente), lo cual mejora su capacidad predictiva, especialmente cuando se evalúa en conjunto con el perfil lipídico. Asimismo, se ha documentado que la PCR refleja la participación del sistema inmunológico en la lesión vascular aterosclerótica, a través de diversas células y mediadores inflamatorios (9).

2. *LIPC*

LIPC es un gen que se encuentra en el cromosoma 15 (en 15q21.3) y que codifica la lipasa hepática (10). La LH es una proteína que tiene 447 aminoácidos y desempeña un papel clave en el metabolismo de las lipoproteínas.

El gen *LIPC* abarca más de 60 kb y contiene 9 exones y 8 intrones. El exón 1 codifica el péptido señal; el exón 4 codifica una región que se une al sustrato de la lipoproteína; el exón 5 codifica una región evolutivamente muy conservada con una posible función catalítica; y los exones 6 y 9 codifican secuencias ricas en aminoácidos básicos que se consideran importantes para anclar la enzima a la superficie endotelial (11).

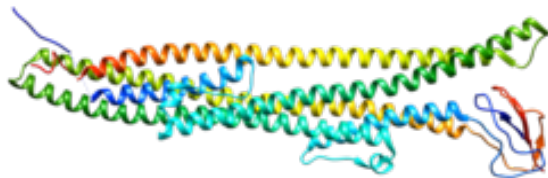


Figura 2. Estructura 3D del gen *LIPC*. (Wikipedia)

La mayor parte de la lipasa hepática se produce y se libera en el hígado, donde cumple dos funciones principales: como enzima lipasa y como molécula de unión (ligando). En su función como lipasa, LH facilita la hidrólisis de TG y fosfolípidos (FL) presentes en remanentes de lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), en LDL grandes y ligeras, y en HDL, transformándolos en partículas lipídicas más pequeñas y densas. Por otro lado, actuando como ligando, LH participa en el transporte reverso del colesterol (TRC), ayudando en la captación de lipoproteínas por el hígado. Este proceso se da mediante la interacción con proteoglicanos de la superficie celular y proteínas similares al receptor de LDL, facilitando así la entrada al hígado de partículas como remanentes de LDL y HDL, incluyendo sus ésteres de colesterol (12).

2.1 *LIPC* EN EL METABOLISMO LIPOPROTÉICO

Las enzimas fundamentales en el metabolismo de las lipoproteínas son la lipasa hepática (LH) codificada por *LIPC* y la LPL (13).

Como se ha comentado previamente, la lipasa hepática se trata de una enzima lipolítica que hidroliza los TG y FL presentes en las lipoproteínas plasmáticas circulantes. La LH también actúa como un ligando que facilita la captación de lipoproteínas por los receptores de la superficie celular y los proteoglicanos, afectando así directamente la administración de lípidos a las células (14).

En las figuras 2 y 3 se ilustran las principales funciones de la LH.

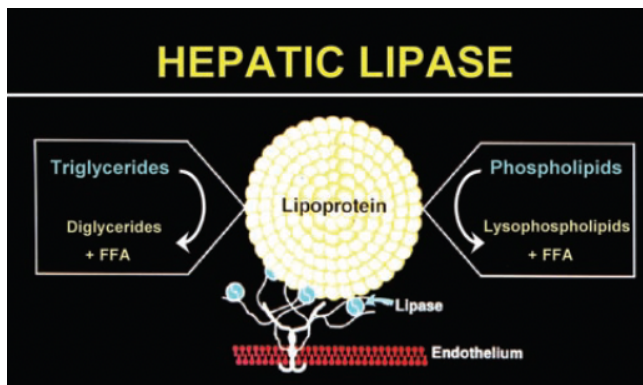


Figura 3. Ilustración de la función clásica de la lipasa hepática como enzima lipolítica. La lipasa hepática hidroliza los TG y FL presentes en las lipoproteínas que circulan en el plasma, liberando diglicéridos, lisofosfolípidos y ácidos grasos libres (FFA) (14).

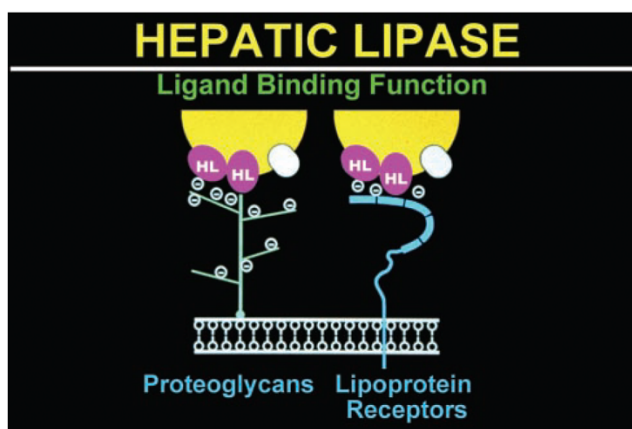


Figura 4. Ilustración de la función de ligando de la LH que facilita la interacción entre lipoproteínas circulantes en plasma y los receptores de la superficie de los proteoglicanos (14).

En el metabolismo de las lipoproteínas la LPL y la LH están unidas a la pared endotelial a través de glucosaminoglicanos. Se encargan de hidrolizar los TG de las lipoproteínas ricas en TG (como los quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)) y las convierte en IDL, remanentes de quilomicrones o LDL.

Debido a la dinamicidad del proceso, una fracción de LPL y lipasa hepática puede desprenderse y unirse a lipoproteínas en circulación formando complejos lipasa-lipoproteína. Posteriormente, estos complejos son captados por las células a través de: proteoglicanos, el receptor de LDL y el receptor scavenger B1 (SR-B1).

En cuanto a la LPL, su síntesis, producida por macrófagos y células musculares lisas en las placas ateromatosas puede favorecer la progresión de la enfermedad aterosclerótica (13). Respecto a la lipasa hepática, esta enzima puede influir en el riesgo de aterogénesis, independientemente de las variaciones en los niveles de lípidos en plasma, al modificar la acumulación de colesterol en los macrófagos. Su presencia en la pared arterial podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas (14).

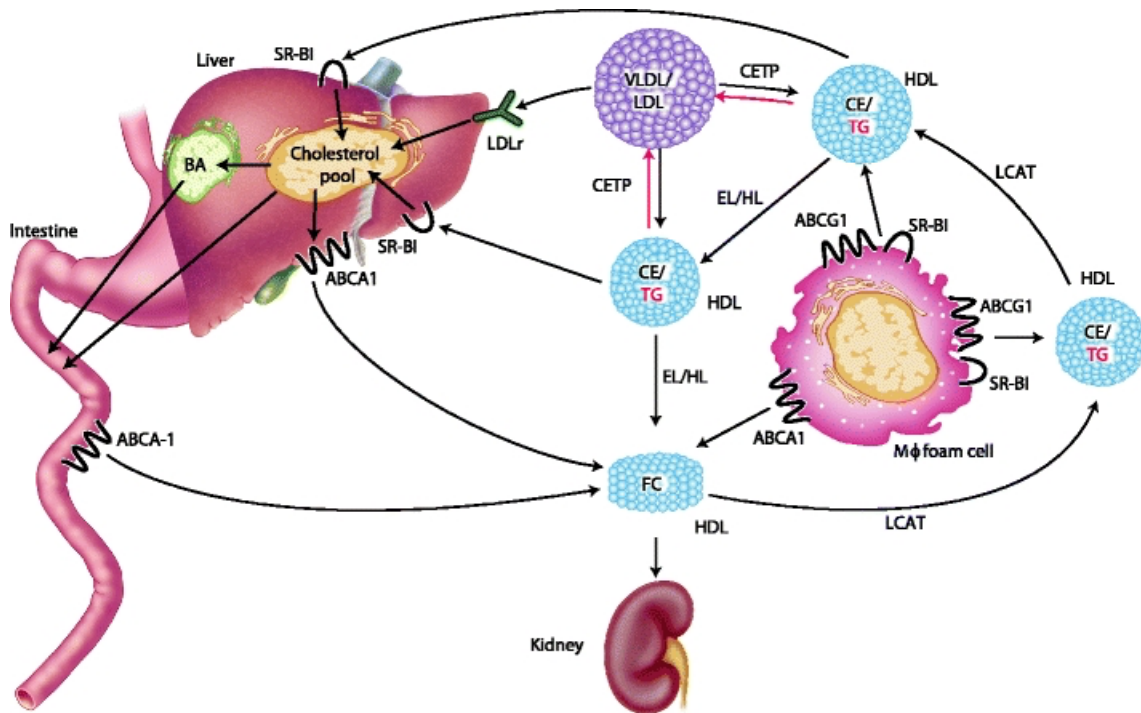


Figura 5. Metabolismo de las lipoproteínas y TRC.

TRC: transporte reverso del colesterol, LDL: lipoproteínas de baja densidad, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad, HDL: lipoproteínas de alta densidad, IDL: lipoproteínas de densidad intermedia, SR-B1: receptor scavenger B1, LPR: receptor relacionado con LDL, LH: Lipasa hepática, LPL: lipoprotein lipasa. CEPT: Proteína transferidora de ésteres de colesterol, LCAT: Lecitina colesterol aciltransferasa, LE: lipasa endotelial. ABCA1: proteína transportadora de la familia ABC, ABCG1: Miembro 1 de la Subfamilia G del Cassete de Unión a ATP. (15–17).

Profundizando en el metabolismo de las lipoproteínas, las partículas HDL se producen principalmente en el hígado y en menor medida en el intestino. Participan en el transporte del colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado. Este proceso involucra varios transportadores y enzimas como ABCA1, LCAT, ABCG1 y SR-B1, que ayudan a madurar las partículas HDL y a cargarlas con colesterol. Posteriormente, las lipasas (LE y LH) degradan los lípidos de las HDL, desestabilizándolas y liberando la apolipoproteína A1 (Apo A1), que se elimina a través de los riñones. El colesterol de las HDL se incorpora al hígado y puede ser excretado directamente o transformado en ácidos biliares. La proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) permite el intercambio de colesterol entre HDL y otras lipoproteínas, facilitando su eliminación. La actividad de ciertas lipasas reduce los niveles de HDL, aumenta el colesterol hepático, pero no altera mucho su excreción biliar, con resultados variables sobre la salida total de colesterol (15–17).

2.2 LIPC EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La función de la lipasa hepática en la ECV es objeto de debate, ya que se le atribuyen tanto efectos que favorecen como que previenen la aterogénesis. Además de su papel catalítico en el metabolismo lipídico y la modificación de las lipoproteínas LDL y HDL, también contribuye a la

absorción de lípidos por las células. Su presencia en las paredes de los vasos sanguíneos sugiere una posible relación con el desarrollo de la aterosclerosis. En los últimos años, se ha identificado como una proteína con diversas funciones y un impacto complejo en la progresión de esta enfermedad (14).

La lipasa hepática, producida en el hígado, se une a células hepáticas y endoteliales. Funciona como un homodímero con amplia especificidad, hidrolizando lípidos como FL y TG en diversas lipoproteínas, incluyendo HDL. Además, facilita la unión y captación de lipoproteínas y ésteres de colesterol (15).

Estudios realizados en humanos han evidenciado que una mayor actividad de la enzima LH se relaciona con concentraciones elevadas en sangre de LDL de tamaño reducido y alta densidad, y una reducción de niveles de HDL, condiciones que se consideran un factor de riesgo significativo para desarrollar enfermedad coronaria (14).

No obstante, pese a que la asociación buscada no queda clara, hay mucha evidencia científica con estudios clínicos que avala la relación entre la lipasa hepática y el colesterol transportado por HDL. Se trata de una relación inversa entre la actividad de la lipasa hepática y las concentraciones del colesterol transportado por HDL en plasma, con estudios clínicos que lo confirman (15).

La LH es una enzima fundamental en el proceso de metabolización de los lípidos, cuya actividad requiere un control preciso, ya que tanto su exceso como su deficiencia pueden asociarse con desequilibrios lipídicos, conocidos como dislipidemias (14).

2.3 VARIANTES GENÉTICAS DE *LIPC*

Diversas investigaciones clínicas han explorado la correlación entre la aterosclerosis y distintos polimorfismos del gen *LIPC*, sugiriendo que ciertas variantes alélicas podrían alterar la actividad enzimática de esta proteína, modulando el metabolismo de lipoproteínas y, en consecuencia, favoreciendo la formación de placas ateromatosas en contextos genéticos específicos. Como se ha mencionado previamente, la LH desempeña un papel determinante en la regulación de las concentraciones plasmáticas de cHDL, observándose una relación inversa entre su actividad y los niveles de esta fracción lipídica, respaldada por estudios tanto clínicos como farmacológicos. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la variabilidad genética en el gen *LIPC* constituye un factor modulador clave en los niveles de HDL, y se anticipa que investigaciones futuras, con un diseño metodológico más riguroso y muestras poblacionales más amplias, permitirán identificar nuevos polimorfismos funcionales con implicaciones clínicas significativas (15–17).

En la tabla de las variantes del gen *LIPC* (tabla 1), se identificaron diferentes polimorfismos con posibles implicaciones en el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) y en los niveles plasmáticos de colesterol HDL (cHDL). En la región 5'UTR se identificaron diversos polimorfismos con implicación en las concentraciones de cHDL y desarrollo de ECV. La variante, rs35511894 (c.-523C>T) se ha asociado, por un lado, con el aumento del grosor de la capa íntima-media de la carótida en portadores homocigotos sin que se observe un aumento en los niveles de cHDL(18). Por otro lado, se ha relacionado con niveles elevados de cHDL, pero no se ha evidenciado un mayor riesgo de ECV (19). La variante rs1800588 (c.-514C>T) se ha asociado con un aumento del área de placa coronaria en portadores que no presentan cambios en la

concentración de cHDL (20), así como con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) en varones, especialmente en presencia de niveles elevados de cHDL, asociación que no se ha observado en mujeres (21). Asimismo, se ha reportado un riesgo cardiovascular incrementado vinculado a concentraciones altas de cHDL en algunos estudios (22). Sin embargo, otras investigaciones no han confirmado esta relación, aunque sí describen niveles de cHDL elevados o sin cambios en portadores de la variante (23). Por último, en la región 5'UTR la variante (c.-216G>A) se ha asociado con un aumento en los niveles de cHDL en relación con el déficit de la función de la lipasa hepática, y un mayor riesgo de isquemia cardíaca en individuos homocigotos, aunque los resultados no fueron concluyentes (24,25), mientras que rs2070895 (c.-250G>A) no presentó datos concluyentes respecto a su impacto clínico ni sobre los niveles lipídicos (26,27).

En cuanto a las variantes que inducen cambios en la secuencia proteica rs1566946168 (c.583G>A, p.(Ala195Thr)); rs121912502 (c.866C>T, p.(Ser289Phe)) y rs113298164 (c.1214C>T, p.(Thr405Met)) no evidenciaron asociación clara con ECV ni con alteraciones en los niveles de cHDL (28,29).

Finalmente, las variantes en la región 3'UTR (c.88+8149G>A) y (c.88+16269C>T) no presentaron datos suficientes para establecer una asociación con riesgo cardiovascular ni con modificaciones en el perfil de cHDL (30).

Tabla 1. Polimorfismos de la lipasa hepática y su asociación con aterosclerosis y enfermedad coronaria.

rs	Cambio de nucleótido	Cambio de proteína	Relación con ECV	Impacto en los niveles de cHDL	Referencia
rs35511894	c.-523C>T	NA	Aumento del grosor de la capa íntima-media de la carótida en portadores homocigotos.	ND	(18)
			Sin asociación con mayor riesgo de ECV.	Elevados	(19)
rs1800588	c.-514C>T	NA	Aumento del área de placa coronaria en portadores	ND	(20)
			Mayor riesgo de ECV en varones portadores, pero no en mujeres.	Elevado	(21)
			Aumento del riesgo de ECV.	Elevados	(22)
			Sin asociación con mayor riesgo de ECV.	Elevado/ No afectado	(23)
NR	c.-216G>A	NA	Riesgo elevado de isquemia cardiaca en homocigotos.	Elevado	(24)
rs2070895	c.-250G>A	NA	ND	ND	(26,27)
rs1566946168	c.583G>A	p.(Ala195Thr)	ND	ND	(28,29)
rs121912502	c.866C>T	p.(Ser289Phe)			
rs113298164	c.1214C>T	p.(Thr405Met)			
rs12594375	c.88+8149G>A	NA	ND	ND	(30)
rs8023503	c.88+16269C>T				

ND: No determinado. NA: No aplicable. NR: No reportado

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

1. OBJETIVO GENERAL

Este estudio tiene como objetivo identificar las variantes genéticas del gen *LIPC*, que codifica la lipasa hepática, en individuos con concentraciones extremas de cHDL. El estudio busca analizar la relación entre las variantes genéticas de *LIPC* y los niveles de cHDL.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Secuenciar el promotor, los exones y los nexos exón-intrón del gen *LIPC* en sujetos con valores extremos de cHDL.
2. Asociar las variantes identificadas con el fenotipo lipídico.
3. Validar la patogenicidad de las variantes identificadas mediante herramientas bioinformáticas.
4. Comparar los resultados obtenidos entre los grupos con cHDL alto y cHDL bajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE SUJETOS

Se seleccionaron individuos no relacionados con concentraciones de colesterol transportado por HDL por encima del percentil 95 (n=37) e inferiores al percentil 5 (n=37), ajustados por edad y sexo. Los participantes fueron seleccionados de la Unidad Clínica y de Investigación en Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Miguel Servet, siguiendo las directrices del estudio DRECE (31).

Tabla 2. Percentiles de los niveles de cHDL en la población española, clasificados por sexo y rangos de edad (expresados en mg/dl) según el estudio DRECE.

	Percentil 5	Percentil 10	Percentil 25	Percentil 25	Percentil 50	Percentil 90	Percentil 95
Mujeres (edad en años)							
5-12	39	43	49	58	67	76	81
13-19	40	43	49	57	65	72	78
20-29	38	42	48,5	57	66	77	82
30-39	38	42	49	58	67	75	81
40-49	39	43	49	57	69	80	85
50-59	40	44	50	59	69	80	84
Varones (edad en años)							
5-12	40	44	53	61	70	79	83
13-19	35	37	43	50	58	64	69
20-29	33	36	41	48	56	64	70
30-39	32	34	39	46	54	64	70
40-49	31	33	39	46	56	65	70
50-59	31	35	41	50	60	70	78
Total	35	39	45	54	64	73	80

2. PARÁMETROS CLÍNICOS Y ANTROPOMÉTRICOS

Los participantes fueron evaluados mediante una exploración física básica que incluyó la medición de la altura, el peso y el perímetro de la cintura, permitiendo calcular el índice de masa corporal (IMC), que es el peso en kilogramos dividido por la altura en metros al cuadrado. Además, se registró el sexo y se llevó a cabo una encuesta para recopilar antecedentes personales y familiares, con especial atención a diagnósticos previos de enfermedades asociadas al síndrome metabólico, como hipertensión arterial, diabetes o enfermedad cardiovascular.

3. EXPLORACIÓN ECOGRÁFICA

Se realizó una exploración ecográfica de arterias carótidas y femorales con el objetivo de determinar la presencia y número de placas de aterosclerosis siguiendo el protocolo descrito por Muntendam y cols (32).

4. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

La recolección de sangre de los participantes se llevó a cabo bajo condiciones estandarizadas entre las 8 y 10 de la mañana, después de un ayuno nocturno de 10 a 14 horas y un mínimo de 5 minutos de reposo. Las muestras fueron obtenidas en tubos con EDTA y posteriormente centrifugadas para el análisis del plasma. La concentración de colesterol total (CT) y TG totales se determinó mediante métodos enzimático-colorimétricos estandarizados, utilizando CHOD-PAP y GPO-PAP, respectivamente.

El cHDL se analizó mediante la precipitación de VLDL y LDL con ácido fosfotúngstico-Mg²⁺, seguido de la medición del colesterol en el sobrenadante mediante CHOD-PAP, ajustando la proporción muestra/reactivo al 5% en lugar del 1% utilizado para el CT. La concentración de cLDL se calculó aplicando la fórmula de Friedewald.

Las apolipoproteínas Apo A1 y Apo B se midieron mediante inmunonefelometría, mientras que la Lp(a) y la HbA1c se determinaron por inmunoturbidimetría. Además, se realizaron pruebas fotométricas estandarizadas para evaluar la actividad enzimática de la transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) y la gamma-glutamyl transferasa (GGT). Finalmente, la glucemia se determinó mediante métodos enzimático-colorimétricos. Todos los análisis bioquímicos fueron realizados en el laboratorio de Bioquímica del Hospital Universitario Miguel Servet.

5. OBTENCIÓN DEL ADN GENÓMICO

El ADN genómico de las muestras se obtuvo a partir de 10 ml de sangre periférica recolectada en tubos con EDTA, utilizando el kit comercial Flexigene® DNA (Quiagen). Las alícuotas con el material genético fueron almacenadas en ultracongeladores (Sanyo) a -80°C. Posteriormente, se analizó este ADN para determinar su pureza y concentración mediante espectrofotometría con un NanoDrop 1000 (ThermoScientific). La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm, mientras que la pureza y calidad del extracto se evaluaron a través de la relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm, donde valores cercanos a 1,8 indican ADN puro y valores en torno a 2 sugieren contaminación con ARN. Luego, el ADN se diluyó en TE 0,1X hasta alcanzar una concentración de 100 ng/μl. Este buffer TE 0,1X se preparó disolviendo 1,211 g de Trizma® Base (Sigma-Aldrich) y 0,336 g de EDTA-Na2 (Sigma-Aldrich) en 900 ml de agua, ajustando el pH a 8 con HCl y almacenando la solución a 4°C. Finalmente, se realizó una dilución 1:10 para su conservación a -20°C. Todo el procedimiento fue llevado a cabo por el Servicio de Genómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

6. DISEÑO DE CEBADORES

Para la secuenciación del gen *LIPC* se realizó el diseño de los cebadores utilizando el programa Primer3, tomando como referencia la secuencia de este gen disponible en la base de datos Ensembl. Posteriormente, los cebadores diseñados fueron analizados con el software OligoAnalyzer (V3.1).

Para un diseño adecuado de los cebadores, se consideraron varios criterios:

- La longitud de los cebadores debía oscilar entre 18 y 30 nucleótidos.

- La temperatura de fusión (TM) dependía de la longitud y el contenido de citosina (C) y guanina (G), asegurándose de que la diferencia entre el cebador directo y el reverso no superara los 2-3 °C.
- El contenido de C/G debía situarse entre el 50 y 60 % para garantizar una unión estable con la secuencia de ADN.
- Se evitó la presencia de múltiples bases C/G en el extremo 3' para prevenir uniones inespecíficas con otras secuencias de ADN.
- Se procuró evitar la formación de homodímeros, que ocurren cuando el cebador se pliega sobre sí mismo formando una horquilla.
- También se minimizó la posibilidad de heterodímeros, que surgen de la complementariedad entre los cebadores directo y reverso, lo que podría afectar su eficiencia.

En el caso del gen *LIPC*, se diseñaron pares de cebadores (directo (F) y reverso (R)) para cada uno de los exones y el promotor.

Tabla 3: Características de los cebadores para la amplificación y secuenciación del gen *LIPC*.

Gen	Exón	Cebador	Secuencia	TM	Pb
<i>LIPC</i>	Promotor	Directo	5': CTAGGATCACCTCTCAATGGG-3'	60°C	254 bp
		Reverso	5': CTGTGACAGCGCTGCAAGGG-3'		
	Exón 1	Directo	5': AGGGTCTGAACAGTGGATAAC-3'	55°C	252 bp
		Reverso	5': CTCTGGAGAAAAGTCAGGC-3'		
	Exón 2	Directo	5': AAGACGGAGGGCTTCAGA -3'	55°C	393 bp
		Reverso	5': TGGAAAATTAGAACGTGCTTCA-3'		
	Exón 3	Directo	5': CCAGCATTATCCAGGAGCTG-3'	55°C	398 bp
		Reverso	5': CATTCTGTGAGCTGAGCAT-3'		
	Exón 4	Directo	5': ATTTCTGAGCAGGCACGAAG-3'	55,7° C	348 bp
		Reverso	5': AGCGCTGATCCCTCACAATA-3'		
	Exón 5	Directo	5': CCCGCGTAACCCTTACCC-3'	60°C	486 bp
		Reverso	5': GCTCCCGGCCCATGACTT- 3'		
	Exón 6	Directo	5': GCTAACCTCCTGTGGGATGA-3'	56,5° C	461 bp
		Reverso	5': TTTCAGAAACACCGCAACAGC -3'		
	Exón 7	Directo	5': TCACTGCTTAAATTATCTCTCTC-3'	57°C	395 bp
		Reverso	5': TGTCATCACCTAGGGGGCTA-3'		
	Exón 8	Directo	5': TCCAAGTCATTAGGGAAAC-3'	55°C	498 bp
		Reverso	5': GCACCTGTGGCTGTGTAAG -3'		
Exón 9	Directo	5': CAAAAATATTTGCGAACATAAGAATC-3'	50,5° C	685 bp	
	Reverso	5': TGGTGATTAATTAGAATCTTGCTTT -3'			

TM: temperatura de fusión; Pb: pares de bases

7. AMPLIFICACIÓN DEL GEN A ESTUDIO POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se realizó la PCR del ADN genómico extraído de cada paciente en un volumen total de 20 μ l. La mezcla de reacción incluyó 1 μ l de ADN de cada muestra (100 ng/ μ l) y 19 μ l de mix de PCR, compuesto por: 13,5 μ l de agua ultrapura (Meinsol inyectable) a 4°C, 2 μ l de buffer 10X (BioTaq® DNA polymerase BIO-21040, Meridian Bioscience) a 4°C, 0,6 μ l de MgCl₂ (BioTaq® DNA polymerase BIO-21040, Meridian Bioscience) a 4°C, 2 μ l de dNTPs (2 mM) a 4°C, 0,4 μ l de cebador directo (10 μ M) a -20°C, 0,4 μ l de cebador reverso (10 μ M) a -20°C y 0,12 μ l de la enzima Taq polimerasa (BioTaq® DNA polymerase BIO-21040, Meridian Bioscience) a -20°C.

La PCR se llevó a cabo en una placa Labcon de 96 pocillos, donde se añadieron la mezcla de reacción correspondiente a cada paciente. Para evitar la evaporación, la placa se selló con PCR seal, se sometió a un breve centrifugado y luego se trasladó al termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems). Allí, se ejecutaron los programas específicos de amplificación para cada fragmento del gen *LIPC*, según lo indicado en la Tabla 4.

Tabla 4: Programa general de termociclador empleado para la amplificación por PCR.

Fase de amplificación	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	2'
Desnaturalización del ADN	95°C	40"
Hibridación de cebadores	TM	30"
Extensión de cebadores	72°C	30"
Extensión final	72°C	7'
Final	4°C	∞

} x 35

La TM es modificada según el cebador utilizado. La desnaturalización del ADN, la hibridación y extensión de cebadores se repite 35 veces (o ciclos).

Los productos de PCR se verifican mediante electroforesis en gel de agarosa MS-8 (8065, Condalab) al 2 % en TAE 1X, teñido con 1,6 μ l de SYBR® Safe I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen S33102). Una vez que el gel se ha solidificado, se prepara una mezcla de 2 μ l de cada muestra con 2 μ l de xileno para su carga en los pocillos. Se incluye un control negativo siguiendo el mismo procedimiento y, en el primer pocillo, se deposita 1 μ l del marcador de peso molecular Direct PCR 100bp Low Ladder (D3687, Sigma-Aldrich).

Tras la carga de las muestras, la electroforesis se lleva a cabo bajo condiciones de 90 V, 400 mA durante 30 minutos. Finalmente, el gel se visualiza bajo luz UV con el software Uviphoto para comprobar la correcta amplificación de los fragmentos de ADN mediante PCR.

8. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO PCR MEDIANTE EXOSAP-IT

Los productos de PCR obtenidos se purifican utilizando ExoSAP-IT® (78205.10.ML, ThermoFisher) para eliminar los cebadores no hibridados y los nucleótidos residuales. Para ello, se mezclan 5 µl de los productos de PCR con 2 µl de ExoSAP diluida 1/10 en una placa Labcon. Tras sellarla, la placa se coloca en el termociclador con el siguiente programa: 37 °C durante 40 minutos para permitir la degradación enzimática de los nucleótidos, seguido de 15 minutos a 80 °C para inactivar el reactivo. Finalmente, la muestra se deja enfriar a 4 °C.

9. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en placas IBIAN protegidas de la luz, con un volumen total de 10 µl. Para ello, se añadieron 1,5 µl de la muestra de PCR previamente purificada con ExoSAP-IT® y 8,5 µl de la mezcla de reacción. Se prepararon dos mezclas: una para la reacción directa (mix F) y otra para la reacción inversa (mix R).

Cada mezcla contenía:

- 0,5 µl de Big Dye (Kit de secuenciación de ciclos BigDye® Terminator v3.1, Thermo Fisher) (-20°C)
- 1,75 µl de buffer del kit Big Dye (4°C)
- 4,75 µl de agua ultrapura
- 1,5 µl de cebadores F o R (2,1 µM) para el mix F y el mix R, respectivamente

La reacción se realizó en dos placas separadas con sus respectivas mezclas. Una vez selladas, las placas fueron incubadas en el termociclador siguiendo el programa especificado en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa termociclador empleado para la secuenciación de *LIPC*.

Fase de amplificación	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	96°C	1'
Desnaturalización del ADN	96°C	10''
Hibridación de los cebadores	55°C	5''
Extensión de cebadores	60°C	4'
Final	4°C	∞

Después de la secuenciación, se llevó a cabo el protocolo de precipitación, en el cual se añadieron 4 µl de EDTA a cada reacción de secuenciación (10 µl). Tras centrifugar la placa, se añadieron 60 µl del reactivo de precipitación, compuesto por:

- 6,5 ml de etanol al 96 % (v/v)
- 0,75 ml de agua
- 0,25 ml de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 (Sigma-Aldrich)

La placa se mezcló por inversión y se incubó durante 15 minutos protegida de la luz. Luego, se centrifugó a 2090 G durante 30 minutos a 4°C, se retiró la tapa y se invirtió sobre papel absorbente para eliminar el sobrenadante. Posteriormente, se realizó una segunda centrifugación de la placa invertida durante 1 minuto a 180 G a 4°C.

A continuación, se añadieron 70 µl de etanol al 70 % (v/v), se mezcló nuevamente por inversión y se centrifugó durante 15 minutos a 2090 G a 4°C. Se repitió el paso de inversión y centrifugación para eliminar el sobrenadante.

Para la desnaturalización del ADN, se añadieron 20 µl de Hi-Di formamida a cada pocillo, se selló la placa, se centrifugó brevemente y se incubó a 94°C durante 2 minutos en el termociclador. Posteriormente, las muestras se enfriaron lo antes posible a 4°C y se almacenaron en refrigeración hasta su envío al analizador genético 3500xL (Applied Biosystems) para su secuenciación mediante electroforesis capilar, siguiendo el método de Sanger. Este último paso fue realizado en el Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

10. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para identificar las variantes genéticas presentes en las muestras de los pacientes, se utilizó el programa Variant Reporter (Applied Biosystems). Una vez detectadas, su posible patogenicidad fue evaluada mediante PredictSNP2(33).

Adicionalmente, las variantes genéticas fueron analizadas en la base de datos gnomAD (v3.1.1) (34) para comparar las frecuencias alélicas de estos polimorfismos en la población general (europea no finlandesa) con las observadas en nuestra muestra.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa R Studio, estableciendo un nivel de significación de $p < 0,05$. Los datos clínicos y antropométricos de los pacientes fueron analizados en relación con los niveles de cHDL, calculando el valor de p. Para las variables cualitativas (sexo, enfermedad cardiovascular, hipertensión, diabetes y presencia de placa) se calcula el número y el porcentaje de sujetos con la característica en cuestión y el valor p a partir del estadístico Chi-cuadrado de Pearson. Para las variables cuantitativas, primero se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Si $p > 0,05$, la variable se consideró una distribución paramétrica o normal; y si $p \leq 0,05$, se asumió una distribución no paramétrica.

En el caso de las variables paramétricas (edad, HDL, LDL, Apo A1, Lp(a), GPT, glucosa), se calcularon la media y la desviación estándar, obteniendo el valor de p mediante la prueba t de Student. Para las variables no paramétricas (IMC, TG, CT, Apo B, HbA1c, GGT), se calcularon la mediana y los cuartiles 25 y 75, y el valor de p se obtuvo con la prueba de U de Mann-Whitney.

12. FUNDAMENTOS ÉTICOS

Este proyecto de investigación se sustenta en principios éticos esenciales que buscan asegurar la protección de los individuos participantes, así como el respeto de estos. Para ello, se garantiza la aplicación de los principios contenidos en la Declaración de Helsinki, documento clave que orienta éticamente la investigación médica con seres humanos. Asimismo, para asegurar el cumplimiento de las normativas éticas y legales imprescindibles, el estudio fue aprobado y revisado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA). Esta aprobación garantiza que el estudio se desarrollará de forma ética, resguardando los derechos y la seguridad de los participantes. Los participantes han sido debidamente informados acerca de los objetivos del estudio, los procedimientos a seguir, y los posibles riesgos y beneficios. Su consentimiento fue otorgado por escrito, lo cual refleja que han aceptado participar de manera libre, voluntaria y con pleno conocimiento del proyecto.

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, BIOQUÍMICAS Y ANTROPOMÉTRICAS

En la tabla 6 se exponen las características clínicas, bioquímicas y antropométricas de los sujetos de los dos grupos analizados. Se analizaron 37 sujetos con concentración elevada de cHDL y 37 sujetos con concentración baja de cHDL.

En primer lugar, se evidencia una diferencia significativa en la media de edad, siendo mayor en el grupo con niveles altos de cHDL en comparación con el grupo con niveles bajos ($p < 0,05$). Por otro lado, el índice de masa corporal (IMC) resulta significativamente menor en el grupo con concentraciones elevadas de cHDL ($p < 0,05$).

Atendiendo a los parámetros bioquímicos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en los niveles de GGT, GPT, Apo B, Lp(a), glucosa y HbA1c. Sin embargo, la concentración de PCR fue significativamente menor en el grupo con niveles elevados de cHDL ($p < 0,05$) y la concentración de Apo A1 fue significativamente mayor en el grupo con niveles elevados de cHDL.

En relación con el perfil lipídico, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de cLDL ($p = 0,01$), cHDL ($p < 0,001$) y colesterol total ($p < 0,001$), siendo mayores en el grupo con niveles elevados de cHDL. Por el contrario, las concentraciones de TG no presentaron diferencias significativas entre ambos grupos, aunque la concentración es mayor en el grupo de cHDL bajo.

Por último, cabe destacar que tanto el sexo como diabetes e hipertensión arterial y la presencia de placa, no presentan una variación significativa. Sin embargo, se observaron diferencias en la presencia de enfermedad cardiovascular que es significativamente superior en los sujetos con niveles bajos de cHDL ($p = 0,024$).

Tabla 6: Características clínicas, bioquímica y antropométricas en base a los niveles de cHDL.

	Sujetos con niveles de cHDL alto (n=37)	Sujetos con niveles de cHDL bajo (n=37)	p
Edad, años	50 ± 11,92	39,16 ± 16,07	0,015
IMC, kg/m ²	24,06 [21,40 – 24,83]	25,51 [23,05 – 26,46]	0,009
Sexo, hombres, n (%)	20 (54%)	17 (45%)	0,642
HDL, mg/dL	90,86 ± 13,18	33,21 ± 4,58	<0,001
LDL corregido, mg/dL	166,44 ± 44,54	136,75 ± 52,45	0,010
TG, mg/dL	81 [66 - 110]	101 [76 - 145]	0,056
CT, mg/dL	300 [267 - 321]	201 [167 - 261]	<0,001
Apo A1, mg/dL	215,35 ± 26,93	115,14 ± 22,66	<0,001
Lp(a), mg/dL	60,23 ± 67,93	42,81 ± 53,73	0,231
GPT, UI/L	21,89 ± 8,74	23,38 ± 14,05	0,609
Gluc, mg/dl	89,35 ± 11,08	90,67 ± 16,41	0,685

Apo B, mg/dL	122,5 [103 - 142,5]	106 [89,2 - 141]	0,216
HbA1c, %	5,3 [5,2 - 5,52]	5,3 [5,07 - 5,6]	0,729
GGT, UI/L	23 [15 - 28]	17 [13 - 27,5]	0,269
PCR mg/dL	0,6 [0,4 - 1,05]	2,15 [0,7 - 4,82]	0,005
DM, n (%)	0 (0%)	4 (10%)	0,123
HTA, n (%)	5 (13%)	4 (11%)	1
ECV, n (%)	0 (0%)	6 (17%)	0,025
Presencia de placa, n (%)	9 (25%)	9 (47%)	0,168

Índice de masa corporal (IMC); Lipoproteínas de alta densidad (HDL); Lipoproteínas de baja densidad (LDL); Triglicéridos (TG); Colesterol total (CT); Apolipoproteína A1 (Apo A1); Lipoproteína (a) (Lp(a)); Transaminasa glutámico-pirúvica (GPT); Glucosa (Gluc); Apolipoproteína B (Apo B); Hemoglobina glicosilada (HbA1c); Gamma-glutamil transferasa (GGT); Proteína C reactiva (PCR); Diabetes mellitus (DM); Hipertensión arterial (HTA); Enfermedad cardiovascular (ECV)

P: el valor de p corresponde a las diferencias globales entre los grupos según la concentración de cHDL; calculado mediante T-Student, prueba U de Mann-Whitney o chi-cuadrado, según la distribución de las variables; paramétricas, no paramétricas o dicotómicas respectivamente.

Las variables cualitativas están expresadas como número (%), mientras las variables cuantitativas paramétricas (distribución normal) están expresadas como media \pm desviación estándar y las cuantitativas no paramétricas (distribución no normal) están expresadas como mediana [rango intercuartílico].

2. VARIANTES DEL GEN *LIPC*

Se detectaron un total de 16 polimorfismos en el gen *LIPC* entre los individuos seleccionados, cuyas frecuencias alélicas y resultados del análisis bioinformático se detallan en la Tabla 7.

Entre las variantes genéticas identificadas, tres se localizan en la región no codificante 5'UTR. Estas variantes corresponden a rs1800588, rs35511894 y rs1477741062; y conllevan las siguientes sustituciones respectivamente: c.-514C>T, c.-523C>T y c.-380G>A; en las que se reemplaza una citosina por una timina en las dos primeras posiciones, y una guanina por una adenina en la tercera. Los análisis bioinformáticos predicen que las tres variantes son neutrales, con probabilidades de neutralidad del 77%, 88 % y 88 %, respectivamente.

En la región codificante se identificaron un total de diez variantes genéticas. De estas, cuatro corresponden a variantes no sinónimas que provocan un cambio en la secuencia de aminoácidos, mientras que las seis restantes son variantes sinónimas que no alterando la secuencia proteica.

Dentro de las variantes no sinónimas se encuentra rs768938270 en el exón 2, la cual implica una sustitución de citosina por guanina (c.212C>G, p.(Thr71Arg)) y presenta una probabilidad del 63 % de ser neutral. En el exón 3, se localiza rs6078, que corresponde a un cambio de guanina por adenina (c.283G>A, p.(Val95Met)), con una probabilidad del 89 % de neutralidad. En el exón 5 se identificó la variante rs6083, caracterizada por la sustitución de una adenina por una guanina (c.644A>G, p.(Asn2155er)), también con una probabilidad del 89 % de ser neutral. Finalmente, en el exón 7, la variante rs3829462 (c.1068C>A, p.(Phe356Leu)), que implica un cambio de citosina por adenina, se predice como deletérea con una probabilidad del 82 % en contraste con las variantes anteriores.

Las seis variantes sinónimas se distribuyen en varios exones. En el exón 4 se encuentra rs690 (c.465G>T, p.(Val155=)), que sustituye una guanina por una timina. En el exón 5 se identificaron tres polimorfismos: rs34351746 (c.588G>A, p.(Ala196=)), rs6082 (c.591A>G, p.(Gly197=)) y rs6084 (c.672C>G, p.(Thr224=)), correspondientes a sustituciones de guanina por adenina, adenina por guanina y citosina por guanina, respectivamente. En el exón 7 se encuentra rs3829461 (c.1092A>G, p.(Thr366=)) que implica una sustitución de adenina por guanina. Finalmente, en el exón 9 se localiza la variante rs6074 (c.1437C>A, p.(Thr479=)), donde se sustituye una citosina por una adenina. Los análisis bioinformáticos predicen que todas estas variantes sinónimas son neutrales con una probabilidad del 96 %, a excepción de la variante del exón 9, cuya probabilidad de neutralidad es del 93 %.

En cuanto a las variantes genéticas localizadas en regiones intrónicas o no codificantes, se identificaron tres en total. La primera es rs6076, ubicada en el intrón 2 (c.274-46G>A), que presenta una sustitución de guanina por adenina. La segunda es rs6080, localizada en el intrón 4 (c.575-8C>A), donde se sustituye una citosina por una adenina. La tercera corresponde a rs3751542, en el intrón 8 (c.1388+111T>C), que implica un cambio de timina por citosina. Los análisis bioinformáticos predicen que rs6076 y rs3751542 son variantes neutrales con una probabilidad del 77 % y 88%, respectivamente. En cambio, la variante rs6080 se considera deletérea con una probabilidad del 91 %.

Si observamos las frecuencias alélicas dentro de nuestro grupo de estudio, el análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los grupos de cHDL alto y bajo. Cabe destacar que hay dos variantes: una situada en el exón 2 rs 768938270 (c.212C>G, p.(Thr71Arg)) y otra situada en el intrón 4 rs6080 (c.575-8C>A), que se encuentran presentes únicamente en el grupo de cHDL bajo. Asimismo, la variante genética que se localiza en la región 5'UTR rs1477741062 (c.380G>A) se encuentra únicamente en el grupo de cHDL alto.

De los 16 polimorfismos identificados, el análisis realizado a través de la base de datos Clin Var (35) reveló que la mayoría (10 variantes) están clasificadas como benignas, lo que indica que no presentan relevancia clínica conocida. De las variantes restantes, cuatro no han sido previamente reportadas (rs35511894, rs1477741062, rs768938270 y rs6074), mientras que la variante rs34351746 se clasifica como de significado clínico incierto, lo que implica que aún no existe suficiente evidencia para establecer asociación concluyente y requiere estudios adicionales. Finalmente, solo la variante rs1800588 presenta una posible asociación clínica según la información disponible, aunque no se considera patogénica por sí sola.

Respecto a las diferencias en frecuencias alélicas de nuestros sujetos a estudio y gnomAD hay diferencias estadísticamente significativas en 5 variantes genéticas, siendo más frecuente en nuestro estudio que en la base de datos gnomAD: rs35511894 ($p=0,049$) y rs6084 ($p=0,020$). Por el contrario, las 3 variantes genéticas restantes: rs6080 ($p=0,050$), rs6082 ($p=0,027$), y rs6074 ($p=0,020$) son más frecuentes en la base de datos gnomAD que en nuestro estudio.

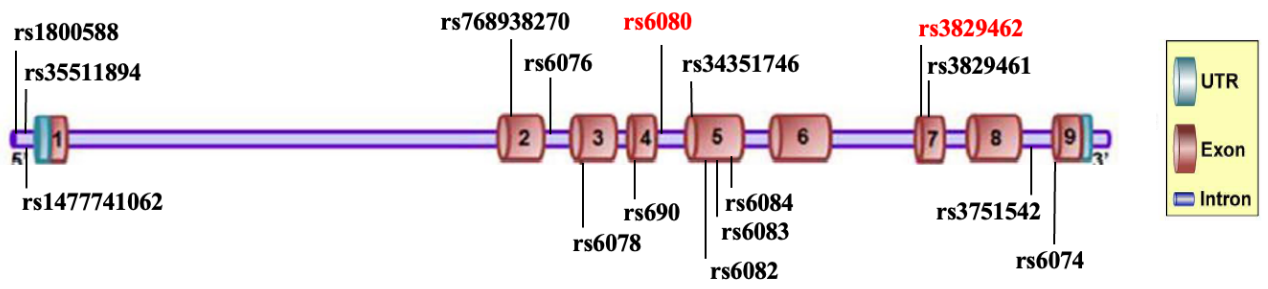


Figura 6. Variantes genéticas identificadas y su localización en el gen *LIPC*. Se indican en rojo las variantes deletéreas. Modificado de Lee et al., (46)

Tabla 7. Frecuencias alélicas y análisis bioinformático de las variantes de *LIPC* en sujetos con niveles extremos de HDL.

Variante	Localización	Cambio de nucleótido	Cambio de proteína	Clin Var	Análisis bioinformático	Frecuencia alélica en la población general en comparación con nuestro estudio			Frecuencia alélica en nuestro estudio		
						PredictSNP2 ¹ (probabilidad)	Nuestro estudio	gnomAD	<i>p</i>	Sujetos con niveles altos de cHDL	Sujetos con niveles bajos de cHDL
rs1800588	5'UTR	c.-514C>T	-	Asociación	Neutral (77%)	0,270	0,215	0,103	0,324	0,216	0,138
rs35511894	5'UTR	c.-523C>T	-	NR	Neutral (88%)	0,020	0,014	0,049	0,027	0,135	0,559
rs1477741062	5'UTR	c.-380G>A	-	NR	Neutral (88%)	0,007	0	0	0,013	0	0,316
rs768938270	Exón 2	c.212C>G	p.(Thr71Arg)	NR	Neutral (63%)	0,007	0	0	0	0,013	0,316
rs6076	Intrón 2	c.274-46G>A	-	Benigna	Neutral (77%)	0,162	0,170	0,791	0,176	0,149	0,655
rs6078	Exón 3	c.283G>A	p.(Val95Met)	Benigna	Neutral (89%)	0,034	0,297	0,772	0,054	0,013	0,172
rs690	Exón 4	c.465G>T	p.(Val155=)	Benigna	Neutral (96%)	0,601	0,581	0,626	0,554	0,648	0,239
rs6080	Intrón 4	c.575-8C>A	-	Benigna	Deletéreos (91%)	0,007	0,037	0,050	0	0,013	0,316
rs34351746	Exón 5	c.588G>A	p.(Ala196=)	Benigna/ Significancia incierta	Neutral (96%)	0,020	0,001	0	0,013	0,027	0,559
rs6082	Exón 5	c.591A>G	p.(Gly197=)	Benigna	Neutral (96%)	0,054	0,078	0,027	0,067	0,040	0,467
rs6083	Exón 5	c.644A>G	p.(Asn215Ser)	Benigna	Neutral (89%)	0,297	0,355	0,14	0,311	0,284	0,791
rs6084	Exón 5	c.672C>G	p.(Thr224=)	Benigna	Neutral (96%)	0,615	0,519	0,020	0,594	0,635	0,612
rs3829462	Exón 7	c.1068C>A	p.(Phe356Leu)	Benigna	Deletéreos (82%)	0,986	0,985	0,926	0,986	0,986	1
rs3829461	Exón 7	c.1092A>G	p.(Thr366=)	Benigna	Neutral (96%)	0,986	0,985	0,926	0,986	0,986	1
rs3751542	Intrón 8	c.1388+111T>C	-	Benigna	Neutral (88%)	0,250	0,294	0,240	0,297	0,203	0,184
rs6074	Exón 9	c.1437C>A	p.(Thr479=)	NR	Neutral (93%)	0,074	0,140	0,020	0,067	0,081	0,754

NR: No reportada

PredictSNP2 (33) (uses CADD, DANN, FATHMM y Funseq2 as predictors)

GnomAD (34)

DISCUSIÓN

En este estudio, evaluamos la presencia de variantes genéticas en el gen *LIPC* en individuos con valores extremos de cHDL con el objetivo de identificar un posible papel de las variaciones genéticas de la lipasa hepática en el metabolismo del cHDL, lo que podría ayudar a identificar el mecanismo y el riesgo cardiovascular asociado a concentraciones extremas de cHDL en algunos individuos.

Al analizar las características clínicas, bioquímicas y antropométricas de los dos grupos en estudio, sujetos con concentraciones elevadas de cHDL frente a aquellos con niveles bajos, se han observado hallazgos relevantes. En primer lugar, los individuos con niveles bajos de cHDL tienden a ser más jóvenes y presentan niveles más altos de IMC, asociadas a un mayor riesgo cardiovascular. Este resultado puede deberse a que la presencia de cHDL bajo es un factor de riesgo para el desarrollo de ECV (6,7), por lo que los sujetos podrían ser derivados de forma precoz a la Unidad de Lípidos del Hospital Universitario Miguel Servet para ser estudiados en profundidad. En cuanto a los parámetros bioquímicos, se evidenció que los niveles de Apo A1 son significativamente más altos en el grupo con cHDL elevado, lo cual resulta coherente con su función como principal apolipoproteína estructural y funcional de las HDL (36). Por el contrario, los valores de proteína C reactiva (PCR), un reconocido marcador inflamatorio, se encontraron aumentados en el grupo con cHDL bajo. Tal como se ha descrito previamente, la PCR es una herramienta útil en la predicción del riesgo cardiovascular, siendo sus concentraciones elevadas indicativas de un mayor riesgo de eventos cardiovasculares (9). Según la bibliografía basada en las concentraciones de PCR, el grupo de cHDL alto tendría un riesgo bajo mientras que el grupo de cHDL bajo tendría un riesgo moderado (5,6).

También es relevante destacar que el grupo con niveles de cHDL bajo se ha relacionado con un mayor porcentaje de ECV. Como se mencionó previamente, existen niveles óptimos de concentración de cHDL, y tanto valores muy bajos como muy altos se relacionan con un incremento en el riesgo de ECV (6,7). Aunque no hay diferencias significativas respecto al porcentaje de presencia de placa, este valor es mayor en el grupo de cHDL bajo. Este hallazgo es relevante, ya que refuerza la conclusión que también se deriva de los niveles de PCR; niveles bajos de cHDL se asocian con un mayor riesgo de desarrollar ECV.

Estos resultados hallados en nuestro estudio concuerdan con una investigación que se llevó a cabo recientemente en la que se analizó la relación entre los niveles de cHDL y la mortalidad. El estudio se realizó en personas con hipercolesterolemia primaria, excluyendo aquellas con causas secundarias. Los resultados mostraron que no existe una relación en forma de “U” entre los niveles de cHDL y la mortalidad, y que tener un cHDL alto no se relaciona de manera independiente con un mayor riesgo de muerte. Por el contrario, concentraciones elevadas de cHDL se asociaron con una menor mortalidad general, cardiovascular y no cardiovascular en comparación con otros niveles de HDL. Sin embargo, esta relación dejó de ser significativa tras ajustar por otros factores de riesgo como la obesidad y el tabaquismo (37,38).

Por otro lado, respecto a la identificación de variantes genéticas del gen *LIPC*, se encontraron los siguientes hallazgos. Mediante la secuenciación del promotor, los 9 exones y las regiones exón-intrón del gen *LIPC* en sujetos seleccionados con valores extremos de cHDL, se identificaron 16

variantes genéticas. Tres variantes estaban localizadas en la región promotora: rs1800588 (-514C>T) (38), rs35511894 (c.-523C>T) y rs1477741062 (c.-380G>A). La variante rs1800588 (c.-514C>T) es uno de los polimorfismos del gen *LIPC* más ampliamente estudiados (39). Esta variante se ha asociado con la actividad de la LH, los niveles de cHDL y el riesgo de enfermedades metabólicas (22,40,41). En este sentido, este polimorfismo se ha relacionado con una baja actividad de la lipasa hepática y un aumento del cHDL (15,39,42). Un estudio en sujetos mexicanos encontró que esta variante está relacionada con índices cardiometabólicos e incrementa el riesgo de enfermedades cardiovasculares (43). En nuestro estudio, la frecuencia alélica de rs1800588 (c.-514C>T) en sujetos con niveles altos de cHDL fue mayor que en aquellos con cHDL bajo, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. La variante rs35511894 (c.-523C>T) fue hallada en voluntarios sanos durante una feria de salud comunitaria, aunque no se describió una función específica para ella (44).

La variante intrónica rs35511894 (c.274-46G>A) también se encontró en población turca con niveles bajos de cHDL, aunque no se reportó ninguna asociación con los niveles plasmáticos de cHDL (45). De manera similar, hemos encontrado en nuestro estudio, lo mismo con la variante rs35511894 (c.-523C>T).

Las variantes no sinónimas rs6078 (c.283G>A, p.(Val95Met)); rs6083 (c.644A>G, p.(Asn215Ser)) y rs3829462 (c.1068C>A, p.(Phe356Leu)), localizadas en la región codificante, también fueron descritas en población turca. Hodoglugil et al. realizaron análisis bioinformáticos para evaluar su posible efecto en la función de la proteína y las categorizaron como benignas (45), al igual que la base de datos ClinVar (35). Sin embargo, nuestros análisis bioinformáticos describieron la variante rs3829462 (c.1068C>A, p.(Phe356Leu)) como deletérea con una probabilidad del 82%. Estas variantes también se encontraron en sujetos coreanos con niveles elevados de cHDL (46) y en afroamericanos y blancos no hispanos con valores extremos de cHDL (39). Long et al. (47,48) evaluaron la asociación de los polimorfismos rs6078 (c.283G>A, p.(Val95Met)) y rs6083 (c.644A>G, p.(Asn215Ser)) con diabetes tipo 2 en individuos chinos, aunque no se reportaron cambios metabólicos relacionados con diabetes. Sin embargo, en sujetos portadores de la variante rs6083 (c.644A>G, p.(Asn215Ser)), se observaron diferencias significativas en los niveles de colesterol, TG y cLDL entre los homocigotos AA y los genotipos combinados GG y AG, lo que sugiere que este polimorfismo podría influir en el metabolismo lipídico mediante interacción con otros polimorfismos de un solo nucleótido. En cuanto a la variante rs3829462 (c.1068C>A, p.(Phe356Leu)), un estudio en población Han china mostró que los hombres con niveles normales de cHDL tenían una mayor frecuencia alélica de esta variante que aquellos con niveles bajos de cHDL (48). Además, esta variante se ha asociado con una disminución del 29% en la actividad de la LH en hombres afroamericanos (49). En nuestro estudio, solo se encontró un sujeto por grupo con esta variante genética. Cabe mencionar que la variante rs768938270 (c.212C>G, p.(Thr71Arg)) se halló únicamente en un sujeto del grupo con cHDL bajo. Esta variante no se encuentra descrita en la literatura en relación con su influencia con niveles bajos de cHDL y su posible implicación en el metabolismo lipídico.

Cuatro polimorfismos sinónimos rs690 (c.465G>T, p.(Val155=)); rs6082 (c.591A>G, p.(Gly197=)); rs6084 (c.672C>G, p.(Thr224=)) y rs6074 (c.1437C>A, p.(Thr479=)) también se encontraron en la población turca (45). Estas variantes no se predijeron que crearan sitios de empalme crípticos, lo cual concuerda con nuestros análisis bioinformáticos que las describen como neutrales, y con la categorización de ClinVar que las define como benignas. Las variantes mencionadas anteriormente y rs3829461 (c.1092A>G, p.(Thr366=)) fueron descritas en

afroamericanos y blancos no hispanos con valores extremos de cHDL, y sus frecuencias alélicas fueron similares en todos los grupos (39). El polimorfismo (A>C) de rs6074 (c.1437C>A, p.(Thr479=)) se relacionó con niveles bajos de cHDL en sujetos del sur de la India sin diabetes; sin embargo, nosotros no observamos tales diferencias (51). En nuestra población no hay diferencias significativas entre ambos grupos en estas variantes.

La variante del gen *LIPC* rs1477741062 (c.-380G>A, p.(Thr71Arg)) se presentó únicamente en el grupo con cHDL alto. Estos sujetos mostraron un aumento en colesterol total y niveles de Apo B, lo que sugiere un posible papel de estas variantes en el metabolismo lipídico. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis. Por otro lado, las variantes rs768938270 (c.212C>G, p.(Thr71Arg)) y rs6080 (c.575-8C>A) se presentaron únicamente en el grupo con cHDL bajo. Además, la variante rs34351746 (c.588G>A, p.(Ala196=)) localizada en el exón 5 que como se ha comentado anteriormente codifica una región evolutivamente muy conservada con una posible función catalítica (11). En nuestro estudio la frecuencia alélica del grupo de cHDL bajo es el doble que el grupo cHDL alto, sugiriendo que si se aumentara el número de sujetos podrían salir diferencias significativas.

Este estudio presenta algunas limitaciones. Debido al tamaño del gen *LIPC*, solo se secuenciaron las regiones codificantes y los límites exón-intrón. Es posible que se hayan pasado por alto variantes funcionales ubicadas en intrones. Todos los sujetos eran caucásicos de ascendencia española, por lo que los resultados podrían no ser aplicables a otras poblaciones. El número de sujetos estudiados es limitado, aunque este fenotipo es poco común una vez excluidas las causas secundarias. Finalmente, la escasa contribución de variantes raras a los niveles extremos de cHDL podría no reflejar el papel del gen *LIPC* en fenotipos más leves.

CONCLUSIONES

- El análisis muestra que los individuos con cHDL elevado tienen menor concentración de PCR, IMC y menor incidencia de ECV. Además, presentan mayores concentraciones de Apo A1 y una edad promedio más alta. Estos resultados sugieren una relación entre el cHDL alto y un mejor perfil cardiometabólico. Se refuerza el papel protector del cHDL frente a la aterosclerosis.
- En los sujetos seleccionados con concentraciones extremas de cHDL se identificaron 16 variantes genéticas del gen *LIPC*: 3 en la región 5'UTR, 10 en regiones codificantes y 3 localizadas en regiones intrónicas.
- Se identificó una variante exclusiva en el grupo con niveles elevados de cHDL, rs1477741062 (c.-380G>A), y dos variantes específicas del grupo con niveles bajos de cHDL rs768938270 (c.212C>G, p.(Thr71Arg)) y rs6080 (c.575-8C>A), lo cual sugiere una relación entre el perfil lipídico individual y estas variantes del gen *LIPC*.
- En nuestra población de estudio, el análisis de las frecuencias alélicas no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con niveles altos y bajos de cHDL. Sin embargo, sí se observaron diferencias en la frecuencia alélica de las variantes identificadas en individuos con valores extremos de cHDL al compararlos con la población europea general, según los datos de la base gnomAD.
- Es necesario realizar más estudios para poder respaldar la asociación entre las variantes genéticas de *LIPC* y las concentraciones elevadas de cHDL.

BIBLIOGRAFÍA

1. Timmis A, Group on behalf of the AW, Vardas P, Group on behalf of the AW, Townsend N, Group on behalf of the AW, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021. *Eur Heart J.* 2022 Feb 22; 43(8):716–99. doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHAB892.
2. da Silva IT, Almeida-Pititto de B, Ferreira SRG. Reassessing lipid metabolism and its potentialities in the prediction of cardiovascular risk. *Arch Endocrinol Metab.* 2015;59(2):171–80. doi: 10.1590/2359-3997000000031.
3. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017 Aug 21; 38(32):2459–72. doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHX144.
4. Civeira F, Marco-Benedí V, Cenarro A. Papel de los lípidos en la aterosclerosis. *Revista Española de Cardiología Suplementos.* 2020 Jan 1;20(SD):2–7. doi: 10.1016/S11313587(20)30023-6
5. Badimón JJ, Ibáñez B. Incremento de las HDL como arma terapéutica en la aterotrombosis. *Rev Esp Cardiol.* 2010 Mar 1;63(3):323–33. doi: 10.1016/S0300-8932(10)70091-9.
6. Ko DT, Alter DA, Guo H, Koh M, Lau G, Austin PC, et al. High-Density Lipoprotein Cholesterol and Cause-Specific Mortality in Individuals Without Previous Cardiovascular Conditions: The CANHEART Study. *J Am Coll Cardiol.* 2016 Nov 8;68(19):2073–83. doi: 10.1016/J.JACC.2016.08.038.
7. Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: Two prospective cohort studies. *Eur Heart J.* 2017 Aug 21;38(32):2478–86. doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHX163.
8. Kamstrup PR. Lipoprotein(a) and Cardiovascular Disease. doi: 10.1093/clinchem/hvaa247.
9. Karakas M, Koenig W. CRP in cardiovascular disease. *Herz.* 2009 Dec;34(8):607–13. doi: 10.1007/S00059-009-3305-7.
10. LIPC lipasa C, tipo hepático [Homo sapiens (humano)] - Gen – NCBI. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3990#genomic-context>
11. Cai SJ, Wong DM, Chen SH, Chan L. Structure of the Human Hepatic Triglyceride Lipase Gene. *Biochemistry.* 1989;28(23):8966–71. doi: 10.1021/BI00449A002/ASSET/BI00449A002.FP.PNG_V03.

12. Rufibach LE, Duncan SA, Battle M, Deeb SS. Transcriptional regulation of the human hepatic lipase (LIPC) gene promoter. *J Lipid Res.* 2006;47(7):1463–77. doi: 10.1194/jlr.M600082-JLR200.
13. Santamarina-Fojo S, Haudenschild C, and Amar M (1998). The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 9, 211–219. doi: 10.1097/00041433-199806000-00005.
14. Santamarina-Fojo S, González-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. Vol. 24, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2004. p. 1750–4. doi: 10.1161/01.ATV.0000140818.00570.2d.
15. Guerra R, Wang J, Grundy SM, Cohen JC. A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. Vol. 94. 1997. doi: 10.1073/pnas.94.9.4532
16. Connelly PW. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. Vol. 286, *Clinica Chimica Acta.* 1999. doi: 10.1016/s0009-8981(99)00105-9
17. Annema W, Tietge UJF. Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. Vol. 13, *Current Atherosclerosis Reports.* 2011. p. 257–65. doi: 10.1007/s11883-011-0175-2.
18. Rundek T, Elkind MS, Pittman J, Boden-Albala B, Martin S, Humphries SE, et al. Carotid Intima-Media Thickness Is Associated With Allelic Variants of Stromelysin-1, Interleukin-6, and Hepatic Lipase Genes The Northern Manhattan Prospective Cohort Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2002;33(5):1420. doi: 10.1161/01.STR.0000015558.63492.B6.
19. Johannsen TH, Kamstrup PR, Andersen R V., Jensen GB, Sillesen H, Tybjaerg-Hansen A, et al. Hepatic lipase, genetically elevated high-density lipoprotein, and risk of ischemic cardiovascular disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2009 ;94(4):1264–73. doi: 10.1210/JC.2008-1342.
20. Fan YM, Lehtimäki T, Rontu R, Ilveskoski E, Goebeler S, Kajander O, et al. The hepatic lipase gene C-480T polymorphism in the development of early coronary atherosclerosis: The Helsinki sudden death study. *Eur J Clin Invest.* 2007 Jun;37(6):472–7. doi: 10.1111/J.1365-2362.2007.01812.X.
21. Ji J, Herbisona CE, Mamotte CDS, Burke V, Taylor RR, van Bockxmeer FM. Hepatic lipase gene –514 C/T polymorphism and premature coronary heart disease. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation.* 2002;9(2):105–13. doi: 10.1177/174182670200900206.
22. Isaacs A, Sayed-Tabatabaei FA, Njajou OT, Witteman JCM, Van Duijn CM. The -514 C->T hepatic lipase promoter region polymorphism and plasma lipids: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Aug; 89(8):3858–63. doi: 10.1210/JC.2004-0188.

23. Shohet R V., Vega GL, Anwar A, Cigarroa JE, Grundy SM, Cohen JC. Hepatic lipase (LIPC) promoter polymorphism in men with coronary artery disease: Allele frequency and effects on hepatic lipase activity and plasma HDL-C concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(8):1975–8. doi: 10.1161/01.ATV.19.8.1975.
24. Andersen R V., Wittrup HH, Tybjærg-Hansen A, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. Hepatic lipase mutations, elevated high-density lipoprotein cholesterol, and increased risk of ischemic heart disease: The Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Jun 4 ;41(11):1972–82. doi: 10.1016/S0735-1097(03)00407-8.
25. Botma GJ, Verhoeven AJM, 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 Feb 15;154(3):625–32. doi: 10.1016/S0021-9150(00)00478-0.
26. Grarup N, Andreasen CH, Andersen MK, Albrechtsen A, Sandbæk A, Lauritzen T, et al. The -250G>A promoter variant in hepatic lipase associates with elevated fasting serum high-density lipoprotein cholesterol modulated by interaction with physical activity in a study of 16,156 Danish subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(6):2294–9. doi: 10.1210/JC.2007-2815.
27. Todorova B, Kubaszek A, Pihlajamäki J, Lindström J, Eriksson J, Valle TT, et al. 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 May; 89(5):2019–23. doi: 10.1210/JC.2003-031325.
28. Ruel IL, Couture P, Gagné C, Deshaies Y, Simard J, Hegele RA, et al. Characterization of a novel mutation causing hepatic lipase deficiency among French Canadians. *J Lipid Res.* 2003 Aug 1; 44(8):1508–14. doi: 10.1194/jlr.M200479-JLR200.
29. Hegele RA, Vezina C, Moorjani S, Lupien PJ, Gagne C, Brun LD, et al. A hepatic lipase gene mutation associated with heritable lipolytic deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 72(3):730–2. doi: 10.1210/JCEM-72-3-730.
30. Iijima H, Emi M, Wada M, Daimon M, Toriyama S, Koyano S, et al. Association of an intronic haplotype of the LIPC gene with hyperalphalipoproteinemia in two independent populations. *J Hum Genet.* 2008 Mar; 53(3):193–200. doi: 10.1007/S10038-007-0236-0.
31. Gutiérrez Fuentes JA, Gómez-Jerique J, Gómez De La Cámara A, Rubio MÁ, Hernández AG, Arístegui I. Diet and cardiovascular risk in Spain (DRECE II study). Description of the evolution of cardiovascular profile. *Med Clin (Barc).* 2000 Dec 2;115(19):726–9. doi: 10.1016/s0025-7753(00)71675-7.
32. Muntendam P, McCall C, Sanz J, Falk E, Fuster V. The BioImage Study: Novel approaches to risk assessment in the primary prevention of atherosclerotic cardiovascular

- disease—study design and objectives. *Am Heart J.* 2010 Jul 1; 160(1):49-57.e1. doi: 10.1016/J.AHJ.2010.02.021.
33. Bendl J, Musil M, Štourač J, Zendulka J, Damborský J, Brezovský J. PredictSNP2: A Unified Platform for Accurately Evaluating SNP Effects by Exploiting the Different Characteristics of Variants in Distinct Genomic Regions. *PLoS Comput Biol.* 2016 May 1; 12(5). doi: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1004962.
 34. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020 581:7809. 2020 May 27;581(7809):434–43. doi: 10.1038/s41586-020-2308-7
 35. ClinVar. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
 36. van der Vorst EPC. High-Density Lipoproteins and Apolipoprotein A1. *Subcell Biochem.* 2020; 94:399–420. doi: 10.1007/978-3-030-41769-7_16.
 37. Bea AM, González-Guerrero A, Cenarro A, Lamiquiz-Moneo I, Climent E, Jarauta E, et al. Association of HDL cholesterol with all-cause and cardiovascular mortality in primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2024 Sep 26;400:118617. doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2024.118617.
 38. Brinkley TE, Halverstadt A, Phares DA, Ferrell RE, Prigeon RL, Hagberg JM, et al. Hepatic lipase gene -514C>T variant is associated with exercise training-induced changes in VLDL and HDL by lipoprotein lipase. Vol. 111, *Journal of Applied Physiology. J Appl Physiol* (1985); 2011. p. 1871–6.
 39. Pirim D, Bunker CH, Hokanson JE, Hamman RF, Demirci FY, Kamboh MI. Hepatic lipase (LIPC) sequencing in individuals with extremely high and low high-density lipoprotein cholesterol levels. *PLoS One.* 2020 Dec 1;15(12 December). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0243919.
 40. Goodarzynejad H, Boroumand M, Behmanesh M, Ziaee S, Jalali A, Pourgholi L. Association between the Hepatic Lipase Promoter Region Polymorphism (-514 C/T) and the Presence and Severity of Premature Coronary Artery Disease. *J Tehran Heart Cent.* 2017; 12(3):119–27.
 41. Zhao X, Ren Y, Li H, Wu Y. Association of LIPC -250G/A and -514C/T polymorphisms and hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2018 Oct 15;17(1). doi: 10.1186/s12944-018-0884-4.
 42. Moon S, Kim YJ, Han S, Hwang MY, Shin DM, Park MY, et al. The Korea Biobank Array: Design and Identification of Coding Variants Associated with Blood Biochemical Traits. *Sci Rep.* 2019 Dec 1; 9(1):1–11. doi: 10.1038/S41598-0183783298-.
 43. Posadas-Sánchez R, Ocampo-Arcos WA, López-Uribe ÁR, Posadas-Romero C, Villarreal-Molina T, León EÁ, et al. 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 Feb 1; 98(1):93–8. doi: 10.1016/J.YEXMP.2014.12.010.
44. Carlquist JF, McKinney JT, Horne BD, Camp NJ, Cannon-Albright L, Muhlestein JB, et al. Common Variants in 6 Lipid-Related Genes Discovered by High-Resolution DNA Melting Analysis and Their Association with Plasma Lipids. *J Clin Exp Cardiol*. 2011; 2(138):2155-9880-2–138. doi: 10.4172/2155-9880.1000138.
 45. Hodolugil U, Williamson DW, Mahley RW. Polymorphisms in the hepatic lipase gene affect plasma HDL-cholesterol levels in a Turkish population. *J Lipid Res*. 2010 Feb 1; 51(2):422. doi: 10.1194/JLR.P001578.
 46. Lee CJ, Park MS, Kim M, Ann S jin, Lee J, Park S, et al. CETP, LIPC, and SCARB1 variants in individuals with extremely high high-density lipoprotein-cholesterol levels. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1). doi: 10.1038/S41598-019-47456-2.
 47. Long T, Lu S, Li H, Lin R, Qin Y, Li L, et al. Association of APOB and LIPC polymorphisms with type 2 diabetes in Chinese Han population. *Gene*. 2018 Sep 25; 672:150–5. doi: 10.1016/J.GENE.2018.06.010.
 48. Fang DZ, Liu BW. 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*. 2002; 161(2):417–24. doi: 10.1016/S0021-9150(01)00652-9.
 49. Nettleton JA, Steffen LM, Ballantyne CM, Boerwinkle E, Folsom AR. Associations between HDL-cholesterol and polymorphisms in hepatic lipase and lipoprotein lipase genes are modified by dietary fat intake in African American and White adults. *Atherosclerosis*. 2007 Oct; 194(2). doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.11.025.
 50. Thuren T. Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2000; 11(3):277–83. doi: 10.1097/00041433-200006000-00008.
 51. Ayyappa KA, Ghosh S, Mohan V, Radha V. Association of hepatic lipase gene polymorphisms with hypertriglyceridemia and low high-density lipoprotein-cholesterol levels among South Indian subjects without diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2013 Jun 1;15(6):503–12. doi: 10.1089/DIA.2012.0302.

ANEXO



Informe Dictamen Favorable

C.P. - C.I. PI21/099
24 de marzo de 2021

Dña. María González Hincos, Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)

CERTIFICA

1º. Que el CEIC Aragón (CEICA) en su reunión del día 24/03/2021, Acta N° 06/2021 ha evaluado la propuesta del investigador referida al estudio:

Título: Variantes genéticas de SCARB1, gen que codifica SR-B1, en sujetos con valores extremos de colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad

Investigadora Principal: Irene Gracia Rubio

Versión protocolo: v1.1, 23/03/2021

2º. Considera que

- El proyecto se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuada la utilización de los datos y las muestras (solicitud BSSA).
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

3º. Por lo que este CEIC emite **DICTAMEN FAVORABLE a la realización del estudio.**

Lo que firmo en Zaragoza
GONZALEZ
HINJOS MARIA - DNI 03857456B
DNI 03857456B

Firmado digitalmente
por GONZALEZ HINJOS
MARIA - DNI 03857456B
Fecha: 2021.03.26
11:40:09 +01'00'

María González Hincos
Secretaria del CEIC Aragón (CEICA)