



**Universidad**  
Zaragoza

## Trabajo Fin de Grado

# SECUENCIACIÓN DE LOS GENES *PAQR3* Y *ANGPTL3* EN SUJETOS CON HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR E HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA

Autor/es

Esther Franco Marín

Director/es

Dra. Itziar Lamiquiz Moneo

Dr. Fernando Civeira Murillo

Universidad de Zaragoza

Julio 2019



**D. FERNANDO CIVEIRA MURILLO**, Doctor en Medicina, Catedrático del Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología de la Universidad de Zaragoza.

**DÑA. ITZIAR LAMIQUIZ MONEO**, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Investigadora del CIBERCV y del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón

Codirectores de este Trabajo final de Grado,

CERTIFICAN

Que la Memoria del Trabajo Final de Grado titulado: “Secuenciación de los genes PAQR3 y ANGPTL3 en sujetos con Hipercolesterolemia Familiar e Hiperlipemia Familiar Combinada”, presentada por **DÑA. ESTHER FRANCO MARÍN**, ha sido realizada en la Unidad Clínica y de Investigación de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Miguel Server bajo su dirección, de acuerdo a los objetivos del Trabajo final de Grado aprobado dentro del Grado de Biotecnología , reúne los requisitos para ser presentada por su autora para optar al Graduado en Biotecnología por la Universidad de Zaragoza y autorizan su presentación.

Zaragoza, 26 de Junio de 2019.

# Índice

1. RESUMEN/ABSTRACT .....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Metabolismo de las lipoproteínas .....	2
2.2 Dislipemias .....	4
2.2.1 Hipercolesterolemia familiar .....	4
2.2.2 Hiperlipemia Familiar Combinada .....	5
3. HIPÓTESIS .....	6
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	6
4.1 Selección de sujetos.....	6
4.2 Obtención de la muestra .....	7
4.3 Obtención del DNA genómico .....	7
4.4 Diseño de los cebadores .....	7
4.5 Amplificación por PCR de los genes de estudio .....	8
4.6 Purificación del producto mediante Exosap-IT (USB).....	9
4.7 Reacción de secuenciación.....	10
4.8 Análisis estadístico .....	10
5. RESULTADOS .....	11
5.1 Descriptivo de la población.....	11
5.2 Variantes genéticas en <i>PAQR3</i> .....	12
5.3 Variantes genéticas en <i>ANGPTL3</i> .....	14
6. DISCUSIÓN.....	17
7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....	19
8. REFERENCIAS .....	20
9. ANEXOS.....	23
9.1 Optimización de la secuenciación por PCR del gen <i>PAQR3</i> .....	23
9.2 Optimización de la secuenciación por PCR del gen <i>ANGPTL3</i> .....	26
9.3 Cebadores utilizados para la reacción de secuenciación de <i>PAQR3</i> .....	30
9.4 Cebadores utilizados en la reacción de secuenciación de <i>ANGPTL3</i> .....	31

## 1. RESUMEN/ABSTRACT

La hipercolesterolemia familiar (HF) y la hiperlipemia familiar combinada (HFC) son dos trastornos autosómicos dominantes del metabolismo lipídico asociados a causas genéticas. Sin embargo, el 20-40% de los pacientes con diagnóstico clínico de HF no tienen mutaciones identificables en los genes candidatos y en el caso de HFC se conocen más de 35 genes asociados con esta patología. El objetivo del presente trabajo fue identificar variantes en los genes *PAQR3*, que codifica una proteína que promueve la interacción entre LDLR y PCSK9, y *ANGPTL3*, que codifica una proteína que inhibe la lipoproteína lipasa y la lipasa endotelial, en sujetos con HF y HFC respectivamente. Se secuenció el gen *PAQR3* en 96 sujetos HF no relacionados y el gen *ANGPTL3* en 162 individuos con HFC no relacionados por el método Sanger. La secuenciación de *PAQR3* reportó 8 variantes, 1 de ellas no descrita previamente, todas ellas localizadas en región intrónica, promotor y 3' UTR. De las 8 variantes encontradas, 4 de ellas presentaron una frecuencia alélica significativamente diferente a la población general, aunque todas ellas fueran clasificadas como benignas por el análisis bioinformático. La secuenciación de *ANGPTL3* mostró 13 variantes, 4 de ellas no previamente descritas y tres de ellas localizada en región codificante. De las 3 variantes reportadas en región codificante, 2 variantes generan un cambio de aminoácido, p.(Leu129Phe) y p.(Tyr321Asn), aunque solo la primera fue clasificada como patogénica por el análisis bioinformático. De las 10 variantes encontradas en región no codificante, dos de ellas presentaron una frecuencia alélica significativamente menor en nuestra población HFC que en la población control, estando una de ellas, c.\*52\_\*60del, asociada con dos microRNAs. Nuestros resultados indican que son necesarios más estudios que nos permitan estudiar el papel de *PAQR3* y *ANGPTL3* en la etiología de la HF y HFC respectivamente.

Familial hypercholesterolemia (FH) and familial combined hyperlipidemia (FCH) are two autosomal dominant disorders of lipid metabolism associated with genetic causes. Nevertheless, 20-40% of patients with a clinical diagnosis of FH don't have identifiable mutations in candidate genes and in the case of FCH more than 35 genes associated with this pathology are known. The aim of the present work was to identify variants in the genes *PAQR3*, which encodes a protein that promotes the interaction between LDLR and PCSK9, and *ANGPTL3*, whose protein encoded inhibits lipoprotein lipase and endothelial lipase, in patients with FH and FCH respectively. *PAQR3* gene was sequenced in 96 unrelated FH subjects and *ANGPTL3* gene was sequenced in 162 unrelated FCH subjects by the Sanger method. *PAQR3* sequencing reported 8 variants, 1 of them not previously described, all of them located in intronic region, promoter and 3'UTR. 4 of the 8 variants found had a significantly different allelic frequency than the general population, although all of them were classified as benign by bioinformatic analysis. *ANGPTL3* sequencing showed 13 variants, 4 of them not previously described and 3 of them located in coding region. 2 of the 3 variants reported in coding region causes an amino acid change, p.(Leu129Phe) and p.(Tyr321Asn), though only the first one was classified as pathogenic by the informatic analysis. We must stand out 2 of the 10 variants found in non-coding region because they presented a significantly lower allelic frequency in our population than in control population, one of them, c.\*52\_\*60del, being previously associated with two microRNAs. Our results suggest that more studies are needed that allow us studying the role of *PAQR3* and *ANGPTL3* in the etiology of FH and FCH respectively.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) es un término que engloba al conjunto de problemas relacionados con el corazón y los vasos sanguíneos y en la actualidad son la principal causa de muerte en países desarrollados, y se considera que lo seguirán siendo en el futuro. La Organización Mundial de la Salud (OMS), registró que en el año 2012 murieron por esta causa 17.5 millones de personas. Además, se calcula que en el año 2030 morirán cerca de 23.6 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías e ictus (1). Una de las principales causas de enfermedades cardiovasculares es la alteración del metabolismo lipídico, produciendo la acumulación de lípidos a nivel arterial y la formación de la placa de ateroma, causantes de la cardiopatía isquémica y otros accidentes cardiovasculares (2).

Los lípidos plasmáticos son aportados por la dieta mediante absorción intestinal y por la síntesis endógena a nivel hepático. Desde el punto de vista clínico, los lípidos más importantes en el plasma son los triglicéridos (TG) y el colesterol (3). La insolubilidad del colesterol y los TG requiere que sean transportados por macromoléculas esféricas llamadas lipoproteínas. Las lipoproteínas son agregados moleculares esféricos de 20 Å de grosor, pseudomicerales, solubles en agua y formadas por un núcleo de lípidos apolares (colesterol esterificado y TG) cubiertos por una capa polar de 2nm formada a su vez por varias proteínas específicas, llamadas apolipoproteínas, fosfolípidos y colesterol libre(4).

El grupo de lipoproteínas alberga 5 grandes clases en función de sus características físico-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). Las principales lipoproteínas transportadoras de TG son los QM y las VLDL, mientras que el colesterol es principalmente transportado por las LDL y las HDL(5).

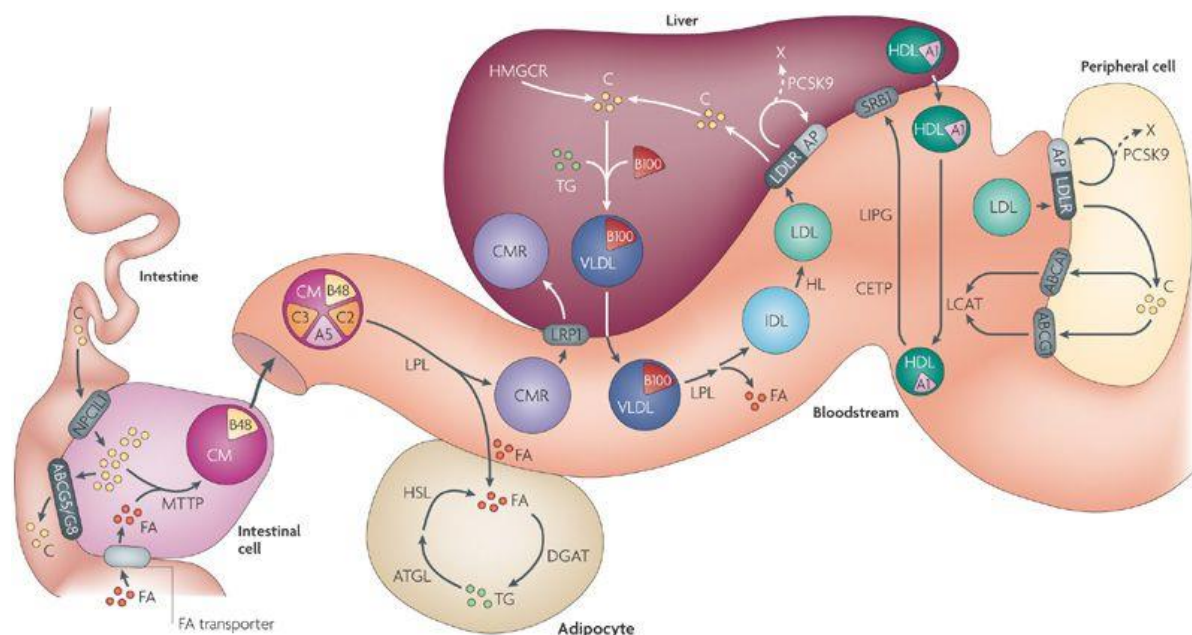
### 2.1 Metabolismo de las lipoproteínas

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). Los TG provenientes de la dieta son hidrolizados por la lipasa hepática en 2-monoglicerol y ácidos grasos libres (FA). Estos FA derivados de la hidrólisis de los TG de la dieta penetran en los enterocitos por transportadores de FA, y una vez en el interior, se reconstituyen de nuevo en TG por medio de la enzima diacilglicerol-acil-transferasa (DGAT). Estos TG podrán ser hidrolizados de nuevo por la lipasa de TG del tejido adiposo (ATGL) y por la lipasa sensible a hormonas (6). Posteriormente, la proteína microsomal de transferencia de TG (MTP) media el ensamblaje de los TG a la Apolipoproteína B-48 y la Apolipoproteína E en un primer paso de formación de QM. Estos QM se secretan al sistema linfático, donde adquieren la apolipoproteína C-II y la apolipoproteína C-III que modulan en plasma el metabolismo de lipoproteínas ricas en TG (7). Los QMs son secretados al plasma, donde pueden ser hidrolizados por la lipoproteína lipasa (LPL) dándose la liberación de FAs (que penetrarán en las células periféricas o en los adipocitos); la secreción de esta enzima depende del factor 1 de maduración de la lipasa (LMF1) y está anclada al endotelio vascular por medio de proteoglicanos y por Glicosil-fosfatidil-inositol unida una proteína 1(GPIHBP1)(6). En los adipocitos y capilares musculares, los TG de los QM y de las VLDL son hidrolizados en ácidos grasos libres por la lipasa unida al endotelio vascular. Los ácidos grasos son re-sintetizados y almacenados en adipocitos o se lleva a cabo la  $\beta$ -oxidación de los mismos para obtener energía en las células musculares (8).

A nivel hepático, los TG son sintetizados a partir de ácidos grasos libres extraídos del plasma o ácidos grasos sintetizados de nuevo. La MTP hepática media el ensamblaje de TG con los ésteres de colesterol, la apolipoproteína B-100 y la apolipoproteína E, dando lugar a VLDL (8).

Los QM se remodelan en partículas pequeñas, densas, de vida corta y ricas en colesterol esterificado, llamadas quilomicrones remanentes (QMRs) que son aclarados mediante endocitosis por los receptores hepáticos de LDL (LDLR), o en su ausencia son captadas por la proteína 1 relacionada con LDLR (LRP1). Los TG contenidos en las VLDL son hidrolizadas por la LPL, liberando ácidos grasos y VLDL remanentes, también llamados lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) que son hidrolizados por la lipasa hepática (HL), produciendo LDL (8).

**Figura 1. Visión general del metabolismo de las lipoproteínas**



Nature Reviews | Genetics

Adaptada de Hegele et al (6). Abreviaturas que aplican a la siguiente figura: proteína de Niemann-Pick-C1-Like1 (NPC1L1), transportador dependiente de la unión de G5/G8 (ABCG5/G8), transportador de ácidos grasos (FA), proteína de transferencia microsomal (MTTP), quilomicrón (QM), colesterol (C), apolipoproteína B-48 (B48), apolipoproteína C-III (C3), apolipoproteína A5 (A5), apolipoproteína C-II (C2), lipoprotein lipasa (LPL), diacilglicerol-acil-transferasa (DGAT), triglicéridos (TG), lipasa de TG del tejido adiposo (ATGL), lipasa sensible a hormonas (HSL), quilomicrones remanentes (CMr), proteína 1 relacionada con LDL (LRP1), apolipoproteína B100 (B100), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), proteína adaptadora (AP).

En el metabolismo del colesterol LDL (cLDL), los esteroides del lumen intestinal penetran en los enterocitos gracias a la proteína de Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) y algunos de ellos son secretados de nuevo por los transportadores ABCG5/G8. En los enterocitos, el colesterol es empaquetado con TG formando QM. En los hepatocitos, el colesterol es reciclado o sintetizado de *novo* por la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGCR). Las LDL transportan el colesterol desde el hígado hasta los tejidos periféricos. La LDL es endocitada por el receptor LDL (LDLR) en células periféricas y hepatocitos, ayudado por una proteína adaptadora (AP). La pro-proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) regula la vida útil del LDLR, ya que cuando se une a LDLR, detiene el reciclaje de LDLR, desde el endosoma a la membrana plasmática, conduciéndolo a su degradación (6).

El colesterol presente en los tejidos se transporta al plasma mediante ABCA1 y ABCG1, y la lecitina-colesterol-acetiltransferasa (LCAT) lo esterifica, para que éste junto con APOA1 forme las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Sobre las HDL actuarán la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP) y la lipasa endotelial (LIPG) para que su contenido en colesterol pueda entrar al hígado mediante el receptor secuestrador de tipo B1 (SRB1)(9).

## 2.2 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 (cHDL), cLDL o TG(2).

### 2.2.1 Hipercolesterolemia familiar

La hipercolesterolemia familiar (HF) es un dislipemia de herencia autosómica dominante caracterizada por valores de cLDL superiores a 190 mg/dL, la presencia de xantomas, xantelasmas y un aumento de riesgo cardiovascular en los sujetos que la padecen (10). La HF es el resultado de mutaciones funcionales en los genes *LDLR*, *APOB* y *PCSK9* (11,12). Recientemente se han relacionado con otros genes como *APOE*(11), *ABCG5/G8* (13), *STAP1*(14) o *LDLRAP1*, siendo este último causante de la HF recesiva(15).

La prevalencia de HF heterocigota en poblaciones caucásicas se estima en 1 cada 200, aunque puede llegar hasta 1 cada 70 en poblaciones con efectos del gen fundador, como las poblaciones francocanadienses, sudafricanos holandeses, libaneses cristianos o judíos Ashkenazi(16,17).

Los pacientes con HF presentan una incapacidad para catabolizar el cLDL circulante, que permanecerá mucho más tiempo en plasma, lo que promoverá un aumento de la oxidación de las partículas LDL. Las partículas LDL oxidadas son absorbidas por macrófagos, dando lugar a “células espumosas” cargadas de colesterol que se depositan en tejidos concretos. Las manifestaciones clínicas características incluyen, xantelasmas, xantomas y arco corneal, que son los depósitos de colesterol en la piel de los párpados, alrededor de los tendones o a lo largo del margen corneal respectivamente; aunque los depósitos más peligrosos son la producción de placas de ateroma (18).

#### 2.2.1.1 Factores genéticos asociados con la hipercolesterolemia familiar

La presencia de mutaciones en los genes candidatos confirma el diagnóstico de HF de forma definitiva. Los genes clásicamente asociados con la HF son *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *APOE* o *LDLRAP1*. Sin embargo, del 20 al 40% de los pacientes con diagnósticos de hipercolesterolemia familiar no tienen mutación en los genes candidatos, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevos posibles genes causantes de hipercolesterolemia familiar e hiperlipemia familiar combinada.

Por una parte, se ha identificado *PAQR3* como un gen que codifica la proteína que favorece la interacción entre LDLR y PCSK9 y, por tanto, controla la degradación de LDLR y la homeóstasis del colesterol. Está principalmente localizada en el aparato de Golgi, y también puede estar en endosomas tempranos o junto con LDLR, PCSK9 y LDL. Para mediar esta unión, PAQR3 interactúa con el dominio P de PCSK9 y el dominio de lámina beta de LDLR. A esta conclusión se llegó tras realizar estudios con ratones *knockout* para el gen *PAQR3* ya que se vio que, tras haberlos alimentado con una dieta rica en grasas, los niveles sanguíneos de colesterol en LDL (c-LDL) y colesterol total eran significativamente menores en ratones con dicha delección hepática de PAQR3 que en ratones control. La supresión de *PAQR3* condujo, además, a una menor acumulación de TG en el hígado y formación de ácidos grasos, y también al aumento de los niveles de LDLR ya que había disminuido su velocidad de degradación.(19). Además de esto, PAQR3 interacciona con SREBP y Scap (los factores de transcripción

que regulan la síntesis de colesterol y sus proteínas acompañantes) y los mantiene unidos al aparato de Golgi. En este caso, la función de PAQR3 es promover la formación del complejo SREBP/Scap, estimular el procesamiento de SREBP para que sea activo y favorecer así la síntesis de lípidos.

Otra consecuencia de la deficiencia de PAQR3 es la intensificación de la expresión de los genes diana del receptor alfa activado de proliferación de los peroxisomas (PPAR $\alpha$ ). PPAR $\alpha$  es un factor de transcripción que regula el catabolismo lipídico en el hígado, estimulando la oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis. Lo que hace PAQR3 es promover la interacción entre PPAR $\alpha$  y la ubiquitina ligasa E3 (HUWE1), la cual estimula su ubiquitinación, y por tanto, su degradación(20)(21).

### **2.2.2 Hiperlipemia Familiar Combinada**

La hiperlipemia familiar combinada (HFC) fue descrita por primera vez como un trastorno del metabolismo lipídico autosómico dominante en 1973 por Goldstein y Brown (22). Estudios posteriores evidenciaron que se trata de un modelo hereditario multigénético, con una acumulación de variantes de único nucleótido (SNVs) pertenecientes a diferentes genes asociados con CT, TG, cLDL, HDL e índice de masa corporal (IMC) entre otros. Estos SNVs generan efectos pequeños e independientes que implican un aumento de las concentraciones de lípidos y una fuerte asociación con factores ambientales fundamentales para el desarrollo de este fenotipo(23). Esta susceptibilidad genética tiende a acumularse en determinadas familias, aunque la transmisión no se produce de forma mendeliana.

La HFC es un desorden lipídico muy común, con una prevalencia estimada entre 1-2% en población general, ascendiendo al 10-20% en pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio(24). A diferencia de la HF, se caracteriza por concentraciones elevadas de TG y/o CT (por encima del percentil 95 en población general ajustado por edad y sexo) en plasma en el individuo afectado, mostrándose también con frecuencia elevados niveles de apoB (>120 mg/dL) y bajos niveles de colesterol HDL. El fenotipo de HFC es variable, incluyendo obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hipertensión, enfermedad del hígado graso no alcohólico, bajo colesterol HDL, LDL densas y pequeñas, estado procoagulante, disfunción endotelial y aumento del grosor y rigidez de la pared arterial. Al igual que los sujetos con HF, los individuos con HFC sufren una alta predisposición a desarrollar ECV ateromatosa prematura, sin embargo, el incremento de riesgo cerebro vascular está influido por la variabilidad fenotípica y por la presencia de otros factores de riesgo no lipídicos, como el síndrome metabólico, la hipertensión o la DM2 entre otros(25).

#### **2.2.2.1 Factores genéticos asociados a la Hiperlipemia familiar combinada**

La HFC se ha asociado directamente con al menos 35 genes diferentes, entre ellos genes relacionados con desórdenes metabólicos como la obesidad, la resistencia periférica a la insulina la DM tipo 2, la hipertensión y el síndrome metabólico(26–28).

Se trata de una enfermedad poligénica cuyo fenotipo se asocia a la región cromosómica 11q23-24 (que codifica las apoA I-cIII-AIV), a la región 1q21-23 (relacionada con diabetes mellitus tipo 2) y al gen USF1 (cuyas variantes pueden afectar al metabolismo hepático de triglicéridos). Estas alteraciones genéticas provocan una disminución de la captación de ácidos grasos libres en el tejido adiposo, por lo que son transportados al hígado favoreciendo la sobreproducción de apoB en el hígado. Además, predominan las LDL con poca concentración de colesterol, y altas concentraciones de apoB conocidas como LDL aterógenas(29,30).

Por otra parte, se ha identificado el gen de *ANGPTL3*, que codifica la proteína ANGPTL3 que actúa como un regulador del metabolismo de lipoproteínas, inhibiendo la LPL y la lipasa endotelial. La



proteína ANGPTL3 está principalmente expresada en el hígado, y una vez secretada se dirige al tejido adiposo (donde favorece la lipólisis) y al músculo (donde inhibe la LPL). Estudios previos mostraron que la delección y silenciamiento de *ANGPTL3* correlacionaba con una disminución en la secreción de ApoB-100 y un aumento de la admisión de LDL/VLDL. También es destacable que mutaciones de pérdida de función en *ANGPTL3* en homocigosidad cursan en sujetos con bajos niveles plasmáticos de TG, cHDL, y cLDL.(31). Sin embargo, si existen mutaciones de ganancia de función de *ANGPTL3* en sujetos con hiperlipemia familiar combinada que puedan explicar la etiopatogenia de esta enfermedad todavía no ha sido explorado.

### 3. HIPÓTESIS

Existen mutaciones raras en genes no relacionados previamente con la HF, que son responsables del fenotipo hipercolesterolémico en sujetos con diagnóstico clínico de HF, pero sin mutaciones en los genes candidatos clásicos. La secuenciación completa del gen de *PAQR3*, permitirá detectar mutaciones funcionales que podrían explicar la etiopatogenia de estos sujetos con hipercolesterolemia familiar sin mutaciones funcionales en los genes candidatos.

Mutaciones de pérdida de función en el gen de *ANGPTL3* se han asociado previamente con niveles bajos de TG, cHDL y cLDL. La secuenciación completa del gen de *ANGPTL3*, permitirá detectar mutaciones de ganancia de función que podrían explicar la etiopatogenia de la hiperlipemia familiar combinada.

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 4.1 Selección de sujetos

Se seleccionaron 96 sujetos con diagnóstico clínico de HF y 162 sujetos con diagnóstico clínico de HFC provenientes de la Unidad clínica y de investigación en Lípidos y Arterioesclerosis del Hospital Miguel Servet, que cumplieran los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

1. En el caso de los HF:

- Estudio Genético (Lipochip® y /o secuenciación masiva) negativo. Pacientes sin mutaciones funcionales en los genes *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *STAP1*, *APOE* y *LDLRAP1*.
- Ausencia de la delección p.(Leu167del) en el gen de *APOE*
- Niveles de cLDL > 95<sup>th</sup> ajustado por edad y sexo. El cLDL corregido se calculó según la fórmula de Friedewald para niveles de TG menores a 350 mg/dL:
  - $cLDL = CT - (HDLc + TG/5)$
- Con un patrón de hipercolesterolemia familiar con al menos un familiar afecto con cLDL > 90<sup>th</sup> ajustado por edad y sexo

Y los criterios de exclusión fueron:

- Índice de masa corporal (IMC) > 27.5 kg/m<sup>2</sup>
- Estudio genético positivo
- Niveles de TG superiores a 200 mg/dL
- Insuficiencia renal crónica (filtrado glomerular < 30 ml/min); síndrome nefrótico; hipotiroidismo (hormona tiroidea (TSH) > 6 mg/mL); enfermedad hepática (alanina transaminasa (ALT) > 3 valor normal); colestasis (bilirrubina directa > 2 mg/dL)
- Diabetes mal controlada (Hemoglobina glicosilada (HbA1c) > 7%)
- Consumo de alcohol superior a 40 gramos al día
- Sujetos no relacionados

1. En el caso de los sujetos con HFC, los criterios de inclusión fueron los siguientes:
  - Niveles de cLDL > 90<sup>TH</sup> ajustado por edad y sexo
  - Niveles de TG > 90<sup>TH</sup> ajustado por edad y sexo
  - Un patrón de segregación familiar con al menos un familiar directo afecto de hiperlipemia mixta
  - Niveles de ApoB > 150mg/dL

Y los criterios de exclusión en este caso fueron:

- El Índice de masa corporal (IMC) superior a 27.5kg/m<sup>2</sup>
- Sujetos no relacionados
- Sujetos no hipotiroideos, ni mujeres con tratamiento de estrógenos, ni con hemocromatosis
- Diabetes mal controlada (Hemoglobina glicosilada (HbA1c) > 7%)
- Consumo de alcohol superior a 40 gramos al día
- Insuficiencia renal crónica (filtrado glomerular < 30 ml/min); síndrome nefrótico; hipotiroidismo (hormona tiroidea (TSH) > 6 mg/mL); enfermedad hepática (alanina transaminasa (ALT) > 3 valor normal); colestasis (bilirrubina directa > 2mg/dL).

#### **4.2 Obtención de la muestra**

Las muestras se obtuvieron por punción venosa tras un ayuno de 10-12 horas y sin tratamiento hipolipemiante. Se extrajeron 10mL de sangre, que fueron llevados a un tubo con 1mg/dL de EDTA (ácido estilendiaminotetracético) utilizado como anticoagulante. Esta muestra sanguínea se centrifugó con la centrífuga Kubota 5220 durante 15 minutos a temperatura ambiente y a 1800xg. Posteriormente, se añadió a la muestra tanto suero fisiológico como volumen se había retirado de plasma y se guardó a -80°C para su posterior uso.

#### **4.3 Obtención del DNA genómico**

El DNA genómico de la muestra se aisló a partir de 10 ml de sangre periférica recogida sobre tubos con EDTA mediante el producto comercial Flexigene ® DNA (Quiagen). Las alícuotas de DNA obtenidas se almacenaron a -80°C en ultra congeladores (Sanyo).

Tras obtener el DNA, se analizó la concentración y pureza mediante espectrofotometría con un NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Los ácidos nucleicos, dada su estructura molecular, absorben la radiación ultravioleta a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 260nm, mientras que las proteínas lo hacen a 280nm, nos permitió analizar la pureza de las muestras mediante el cociente entre la absorbancia obtenida a 260nm y la obtenida a 280nm. Para la relación  $A_{260}/A_{280}$  consideramos que los valores óptimos de pureza eran los comprendidos entre 1.8-2.0.

Posteriormente, se llevó el DNA a una concentración 100ng/ $\mu$ L diluyéndolo con TE 0.1X. El TE 0.1X se preparó a partir de 1.211 g de Trizma ® Base (Sigma-Aldrich) y 0,336 g de EDTA-Na<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) en 900 mL de agua, ajustándose el pH a 8 mediante la adición de ácido clorhídrico, se conservó a 4°C y posteriormente se realizó una dilución 1:10 que se conservó a -20 °C.

#### **4.4 Diseño de los cebadores**

El diseño de los cebadores se llevó a cabo mediante el programa Primer3(32), usando la secuencia referencia del ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). El análisis de los cebadores diseñados se realizó por medio del programa OligoAnalyzer(33). Hay varios factores a tener en cuenta a la hora de diseñar los cebadores:

- La longitud: lo ideal es que el cebador contenga entre 18 y 24 nucleótidos.
- La temperatura de Melting ( $T_M$ ): debe ser lo más parecida entre el cebador directo y el cebador reverso, habiendo como mucho una diferencia de 2°C entre ambas temperaturas. Esta temperatura vendrá determinada en función de la longitud y composición del cebador.
- El porcentaje de Guaninas y Citosinas en su composición, debe estar entre el 50 y 60% para asegurar una unión estable entre el cebador y la secuencia de DNA.
- Evitar varias G/C en el extremo 3', ya que esto generaría la unión estable a otras secuencias, disminuyendo la especificidad.
- La formación de homodímeros: viene dada por la complementariedad intra-primero, es decir, se trata de la estructura de doble cadena resultante del plegamiento del primer sobre sí mismo y debe evitarse para aumentar la unión del primer con el DNA.
- La formación de heterodímeros: viene dada por la complementariedad entre primers, y también se debe evitar para evitar que si no disminuya la eficiencia con que el cebador se une al DNA.

Se diseñaron cada pareja de cebadores (directo y reverso) para cada exón tanto del gen *PAQR3* como del gen *ANGPTL3* generando siempre secuencias de menos de 1000 pares de bases (bp) para que estas puedan ser secuenciadas posteriormente por el método Sanger.

#### 4.5 Amplificación por PCR de los genes de estudio

La amplificación de cada exón de los dos genes se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para cada reacción de amplificación se mezcló la enzima Biotaq DNA polimerasa (Bioline), el tampón 10X (20mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 2mM DTT, 50% glicerol), MgCl<sub>2</sub> (50mM), dNTP's (Life Technologies), los cebadores correspondientes, el DNA de interés y agua destilada estéril (dH<sub>2</sub>O) hasta alcanzar un volumen final de 20  $\mu$ L. En algunas amplificaciones fue necesario la adición de Betaína o Dimetilsulfoxido (DMSO) para aumentar la especificidad de la unión cebador-DNA. En esos casos, el volumen añadido de DMSO o Betaína se quitó del volumen total de dH<sub>2</sub>O. Las cantidades y las concentraciones se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Cantidades y concentraciones finales de los reactivos usados en la reacción de PCR.**

REACTIVO	CANTIDAD ( $\mu$ L)	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer (10x)	2	1X
dNTP's (2mM)	2	200 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.6	1.5mM
Cebador directo (10 $\mu$ M)	0.4	200 $\mu$ M
Cebador reverso (10 $\mu$ M)	0.4	200 $\mu$ M
Biotaq DNA polimerasa (5U/ $\mu$ L)	0.12	0.03U/ $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	13.5	
DNA genómico (100ng/mL)	1	5ng/mL

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp ® 9700 (Applied Biosystems) con el programa estándar que se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2. Programa estándar de PCR utilizado por defecto.**

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	Nº DE CICLOS
Inicio	94	2´	1
Desnaturalización de las hebras	94	20´´	25
Hibridación de los cebadores	T <sup>a</sup> annealing*	20´´	
Extensión de la cadena	72	30´´	
Elongación final	72	4´	1
Conservación	4	∞	

\*La temperatura de annealing y el número de ciclos para cada variante aparece descrita en la tabla 1 de material suplementario.

El resultado de las diferentes amplificaciones se comprobó mediante electroforesis de 96 V durante 30 minutos en geles de agarosa al 2% en TAE 1x teñido con 1.8µL SYBR ® Safe (Lifetechnologies), que posteriormente fueron visualizados con transiluminación UV. El marcador molecular *Low Range DNA Ladder ready-to-use* (Thermo Scientific™) fue usado como marcador molecular estándar.

En la mayoría de casos tuvimos que hacer la optimización de la PCR por diversas causas indicadas en la siguiente tabla 3.

**Tabla 3. Resultados de electroforesis que indicaron la necesidad de optimizar la PCR y las soluciones que aplicamos en cada caso.**

RESULTADOS OBSERVADOS	SOLUCIONES
Muchas bandas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aumentar T<sup>a</sup> annealing</li><li>• Disminuir [MgCl<sub>2</sub>]</li><li>• Añadir Betaína o DMSO</li></ul>
Ausencia de bandas	<ul style="list-style-type: none"><li>• Disminuir T<sup>a</sup> annealing</li></ul>
Bandas tenues	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aumentar la cantidad de DNA añadido</li><li>• Aumentar el nº de ciclos</li><li>• Aumentar el tiempo de elongación</li></ul>

#### 4.6 Purificación del producto mediante Exosap-IT (USB)

Para la purificación de los productos de la PCR, se utilizó el producto comercial EXOSAP-IT ® (USB), que consta de las enzimas exonucleasas I y la fosfatasa alcalina de camarón (SAP), de forma que elimina los cebadores y nucleótidos sin hibridar y sin generar pérdida de muestra. La enzima exonucleasa I degrada los cebadores residuales y cualquier DNA de cadena única, mientras que SAP hidroliza los dNTPs remanentes de la mezcla de la PCR.

Se preparó una dilución 1:10 de ExoSAP-IT ® (USB) en dH<sub>2</sub>O de la que se añadieron 2 µL a 5 µL del producto de PCR. En un termociclador Gene Amp ® 9700 (AppliedBiosystem) se realizó una incubación a 37°C durante 45 minutos seguida de 15 minutos a 80°C con objeto de inactivar la enzima.

#### 4.7 Reacción de secuenciación

Para la secuenciación completa de los promotores, exones, uniones exón-intrón de los genes *PAQR3* y *ANGPTL3* se realizó la secuenciación por electroforesis capilar de los fragmentos amplificados utilizando el producto comercial BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing kit (Applied Biosystems). Dicho kit contiene un vial de BigDye v3.1, Reaction Mix, que incluye 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 acción enzimática. Toda la reacción de secuenciación debe de realizarse en ausencia de luz para no estropear el reactivo a utilizar. Por cada muestra, en primer lugar, se realizó una dilución de 0.5 µL de BigDye v3.1 Reaction mix, 1,75 µL de tampón de secuenciación BigDye v3.1 5X y 4.75 µL de agua estéril destilada. Posteriormente, se añadieron 7 µL de esta mezcla a 1,5 µL del producto purificado y 1,5 µL del cebador de secuenciación 2.1 µM. El programa térmico utilizado es el consta en la tabla 4

**Tabla 4. Programa utilizado para la reacción de secuenciación.**

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	
96	1´	} 25 ciclos
96	10´´	
55	5´´	
60	4´	
4	∞	

El resultado de las reacciones de secuenciación se purificó por precipitación alcohólica. En primer lugar, se añadió 4µL de EDTA 62.5mM a los 10µL de la reacción de secuenciación. A continuación, se preparó una mezcla por pocillo de 2.5µL de NaAc 3M con pH=5.2, 7.5 µL de dH<sub>2</sub>O y 65 µL de etanol al 96%. De esta mezcla, se añadió 60µL por pocillo, posteriormente se centrifugó durante 1 minuto a 2090xg en una centrífuga 3.16k (Sigma). Seguidamente, la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y protegidas de la luz. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 4°C 2090xg. Para eliminar el sobrenadante, se realizó una centrifugación con las muestras invertidas sin tapas durante 1 minuto a 4°C 180xg. A continuación, para purificar la muestra, se añadieron 70µL de etanol al 70% y se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C 2090xg. De nuevo, se eliminó el sobrenadante centrifugando las muestras invertidas sin tapas durante 1 minuto a 4°C 180xg. Tras este paso, el pellet obtenido se guardó a -20°C.

Previamente a realizar la electroforesis capilar, se resuspendió el pellet en 20µL de formamida Hi-Di(LifeTecnhonologies) seguido de una centrifugación de 1 minuto a máxima velocidad. Posteriormente, se incubaba durante 2 minutos a 94°C. La electroforesis capilar se llevó a cabo en el secuenciador automático ABI3500 XL. El alineamiento y la lectura de las secuencias obtenidas se llevaron a cabo mediante el programa informático VariantReporter™ (AppliedBiosystems).

#### 4.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico R Studio, considerando valores de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativos. Para conocer si una variable sigue una distribución normal se realizó un análisis de Kolmogorov-Smirnov. Los datos están expresados como medias  $\pm$ desviación

estándar para las variables cuantitativas con una distribución normal, las cuales fueron analizadas con la prueba de T-Student, mientras que aquellas variables que siguen una distribución no normal se expresaron como mediana (percentil25-percentil 75) y fueron analizadas con el test Mann-Whitney U. Las variables cualitativas, incluyendo la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas, se expresaron en porcentaje y se analizaron mediante el test de Chi-Cuadrado.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Descriptivo de la población

El tamaño de muestra escogido fue de 96 HF sin mutación en los genes candidatos (HF-) y 162 pacientes con HFC para el estudio de *PAQR3* y *ANGPTL3*, respectivamente. Las principales características clínicas y antropométricas de dichos pacientes se describen en la siguiente tabla 5.

**Tabla 5. Descriptivo básico de la población.**

	HF- (n=96)	HFC (n=162)	<i>p</i>
<b>Edad, años</b>	51,8±12,1	50,3±11,5	0,337
<b>Hombre, n(%)</b>	34,0 (35,4%)	99 (60,7%)	<0,001
<b>IMC, kg/m<sup>2</sup></b>	24,9 (23,5-25,8)	26,5, (26,3-26,8)	0,004
<b>Colesterol total, mg/dL</b>	326±47,2	312±38,0	0,015
<b>Colesterol LDL, mg/dL</b>	232±40,4	208±33,0	<0,001
<b>Colesterol HDL, mg/dL</b>	68,7±17,7	48,5±12,0	<0,001
<b>Triglicéridos, mg/dL</b>	120, (95,5-149)	277, (232-373)	<0,001
<b>Lipoproteína (a) mg/dL</b>	130, (95,3-163)	111, (26,0-152)	<0,001
<b>Glucosa, mg/dL</b>	86,0 ±10,2	97,8±27,8	<0,001
<b>DM, n(%)</b>	0,00 (0%)	13,0 (7,98%)	0,004
<b>HTA, n(%)</b>	14,0 (14,6%)	30,0 (18,4%)	0,670
<b>ECV, n(%)</b>	9,00 (9,38%)	7,00 (4,29%)	0,355
<b>APOE, n(%)</b>			
E2/E3	3,00 (3,12%)	9,00 (5,52%)	0,401
E3/E3	65,0 (67,7%)	114 (69,9%)	
E3/E4	24,0 (25,0%)	31,0 (19,0%)	
E2/E2	0,00 (0,00%)	0,00 (0,00%)	
E4/E4	2,00 (2,08%)	6,00 (3,68%)	
E2/E4	2,00 (2,08%)	1,00 (1,84%)	

Las variables numéricas con distribución normal se expresan como media±desviación estándar y aquellas con distribución no normal se expresan como mediana [rango intercuartílico]. Se utilizaron las pruebas T-Student, U de Mann-Whitney o Chi-Cuadrado según corresponda. Abreviaturas que aplican a la siguiente tabla: pacientes afectados por Hipercolesterolemia Familiar sin mutación en el genes candidatos (HF-), pacientes afectados por Hiperlipemia Familiar Combinada (HFC), índice de masa corporal (IMC), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), diabetes mellitus (DM), hipertensión arterial (HTA), enfermedad cardiovascular (ECV), APOE (apolipoproteína E; y junto a ella los diferentes genotipos alélicos, ya que se trata de un gen pleomórfico).

En el estudio llevado a cabo en pacientes con HFC se observa un mayor porcentaje de pacientes de sexo masculino (60.7%) que en la población HF- (35.4%). Además, los sujetos HF- presenta significativamente menor IMC que los individuos HFC.

Respecto al perfil lipídico, los pacientes HF- presentaban significativamente niveles superiores de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y lipoproteína a que los sujetos HFC ( $p=0.015$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$  respectivamente). Sin embargo, los niveles de triglicéridos son significativamente menores en pacientes HF- que los sujetos HFC ( $p<0.001$ ).

Los sujetos HFC presentan mayores concentraciones de glucosa en sangre y una mayor prevalencia de diabetes mellitus que los individuos HF- ( $p<0.001$ ,  $p=0.004$ , respectivamente), sin diferencias significativas en la prevalencia de ECV, hipertensión o en el genotipo de *APOE*.

## 5.2 Variantes genéticas en *PAQR3*

Para llevar a cabo el estudio de los 96 HF-, secuenciamos el gen *PAQR3* y analizamos la posible relevancia que podían tener las variantes genéticas encontradas. En la tabla 6 aparecen las variantes genéticas presentes en el estudio correspondiente a este gen.

Para este gen encontramos un total de 8 variantes genéticas, entre las cuales había 7 que habían sido previamente descritas (Tabla 6). De todas ellas ninguna se encontraba en región codificante (por lo que no generarían un cambio de aminoácido en la proteína), sino que se encontraban o bien en región intrónica o bien en las regiones 5'UTR y 3'UTR.

De las variantes genéticas encontradas en regiones intrónicas todas ellas son consideradas benignas y ninguna de ellas genera un cambio de ajuste, por lo que no dan lugar a RNA mensajeros diferentes que codifiquen proteínas distintas.

De todas las variantes analizadas, la única que presenta una frecuencia alélica diferente entre la población HF- y la población de los 1000 G es la variante rs28551010, que fue encontrada al secuenciar el exón 5 de *PAQR3*, generando un cambio de nucleótido en la posición 703-112 de una timidina por una adenina. Esta variante genética es considerada benigna y se encuentra en un 1% de nuestra población, mientras que en la población tomada en el Proyecto de los 1000 Genomas(34) se encontraba en el 0%.

Continuando con el análisis de todas las variantes reportadas, la más frecuente en nuestra población es la descrita como rs13108247, presentándose en un 15.6% de nuestros pacientes y en un alto porcentaje de población tanto en el Proyecto de los 1000 Genomas (34) como en el Proyecto ExAc(35). Esta variante también se encontró secuenciando el exón 5 y genera un cambio de nucleótido en la posición 793+4 de una guanina por una timidina. La siguiente variante más frecuente es descrita como rs2306443, que se encontró en un 4.7% de pacientes. En este caso, se producía un cambio de una citosina por una guanina en la posición 349-47. También en el exón 3 fue encontrada la variante no descrita previamente, que genera un cambio de una adenina por una guanina en la posición 349-74, aunque ésta se encontraba en un 0,5% de nuestra población. Y finalizando con las variantes de región intrónica, en un 2,6% de pacientes al secuenciar el exón 6 se encontró un cambio de una citosina por una timidina en la posición 794-140, correspondiéndose con la variante rs115845694.

En cuanto a las variantes en las regiones 5' y 3'UTR, se encontraron un total de 3; todas ellas consideradas benignas. Dos de ellas se encontraron secuenciando el exón 1 ya que pertenecen a la región 5' UTR, y la restante fue determinada al secuenciar el exón 6.

**Tabla 6. Variantes genéticas reportadas de la secuenciación del gen *PAQR3***

Gen	Variante	Exón	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Tipo	Análisis bioinformático		Frecuencia en nuestra población	Frecuencia en población general		P	Micro RNA <sup>5</sup>
						Predict SNP2 (probabilidad) <sup>1</sup>	Fruitfly <sup>2</sup>		1000 Genomes Project <sup>3</sup>	ExAc <sup>4</sup>		
<i>PAQR3</i>	rs2306443	3	c.349-47C>G	NA	Variante intrónica	Benigno (73%)	No genera cambio de ajuste	0,047	0,040	0,070	0,648	NA
	rs28551010	5	c.703-112T>A	NA	Variante intrónica	Benigno (78%)	No genera cambio de ajuste	0,010	0,000	NA	0,001	NA
	rs13108247	5	c.793+4G>T	NA	Variante intrónica	Benigno (88%)	No genera cambio de ajuste	0,156	0,830	0,749	0,551	NA
	rs115845694	6	c.794-140C>T	NA	Variante intrónica	Benigno (88%)	No genera cambio de ajuste	0,026	0,040	NA	0,331	NA
	rs1350329293	6	c.*62C>T	NA	Variante 3'UTR	Benigno (73%)	NA	0,005	0,000	NA	0,022	No micro RNA
	No descrita	3	c.349-74A>G	NA	Variante intrónica	Benigno (55%)	No genera cambio de ajuste	0,005	0,000	NA	0,022	NA
	rs71612958	1	c.-289T>C	NA	Variante 5'	Benigno (88%)	NA	0,031	0,044	NA	0,428	No micro RNA
	rs758936129	1	c.-218C>T	NA	Variante 5'	Benigno (79%)	NA	0,005	0,000	NA	0,022	No micro RNA

<sup>1</sup>PredictSNP2 usa CADD, DANN, FATHMM y Funseq2 como predictores bioinformáticos.

<sup>2</sup>Fruitfly. Nueva predicción del sitio de ajuste.

<sup>3</sup>1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Books LD et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature 2012;491:56-65.<sup>4</sup>Monkol Lek, Konrad j-Karczewski et al. Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature 536,285-291. 2016.

<sup>5</sup>PolymiRTS Database 3.0. Disponible en: [http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/miRSNP\\_detail\\_all.php](http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/miRSNP_detail_all.php). El valor de *p* fue calculado comparando las frecuencias alélicas en nuestra población y la frecuencia en la población general por medio de un test Chi-cuadrado.



En la región 5'UTR era más frecuente la variante rs71612958, que suponía en la posición -289 un cambio de una timidina por una citosina. La otra variante localizada en esta región es rs758936129, basada en un cambio de una citosina por una timidina en la posición -218. La variante encontrada en la región 3'UTR es rs1350329293, que correspondía a un cambio de una citosina por una timidina en la posición 62.

Puesto que las regiones UTR tienen gran importancia en la regulación de la expresión de genes, en este último tipo de variantes era preciso estudiar si éstas podían provocar algún cambio en la unión de microRNAs, y, por tanto, en la regulación de la expresión de *PAQR3*. Sin embargo, no se encontró ningún microRNA para dichas regiones, por lo que no se puede relacionar dichas variantes con una alteración en la expresión del gen.

### 5.3 Variantes genéticas en *ANGPTL3*

El gen *ANGPTL3* fue secuenciado en 162 pacientes con HFC. La información sobre las variantes encontradas en este gen se encuentra en la siguiente tabla 7.

En este gen se encontraron más variantes genéticas que en *PAQR3*, un total de 13, entre las cuales había 4 no descritas previamente. En este caso también se presentaban las variantes en regiones intrónicas y en la región 3'UTR, sin embargo, al contrario que en el caso de *PAQR3*, no se encontraron variantes en la región 5'UTR, pero sí en la región codificante.

Las tres variantes encontradas en región codificante se presentan en el mismo porcentaje en nuestra población (0.3%), siendo dos de ellas consideradas neutrales, y una deletérea con un 82% de probabilidad.

La variante deletérea (rs72649573) se encuentra en el exón 1 generando un cambio de Citosina a Timidina en la posición 379, suponiendo esto un cambio de Leucina a Fenilalanina en el aminoácido 129 de la proteína.

Las otras dos variantes de región codificante se encuentran en el exón 6. Una de ellas (rs747725081) generando un cambio de Timidina a Adenina en la posición 961, y, por tanto, modificando la posición 321 de la proteína, que en lugar de Tirosina presentaría una Asparagina. El otro caso se trata de una variante sinónima (rs12563308) en la cual una Citosina ocupa el lugar de una Timidina en la posición 1003, pero sin embargo no se observa un cambio de aminoácido en la proteína ya que sigue codificándose una Leucina.

En las regiones intrónicas ninguna variante de las encontradas genera cambio de ajuste, por lo que se mantendrá la estructura del transcrito. La más frecuente de ellas y única cuyo p-valor es significativo se encontró secuenciando el exón 3, y se trata de una delección de los nucleótidos GT en la posición 607-47\_607-46 (rs72649577); presente en un 3.4% de nuestra población.

Secuenciando el exón 3 se encontraron otras dos variantes intrónicas más: rs531071581 y rs72649576, correspondiéndose con un cambio de Adenina por Guanina en la posición 607-120 y un cambio de Timidina por Citosina en la posición 607-109, respectivamente.

Un 0.3% de nuestros pacientes presentaban otras variantes genéticas, como rs185472483, rs72651034 y otra no descrita consistente en el cambio de una Timidina por una Guanina en la posición 496-88.

**Tabla 7. Variantes genéticas en *ANGPTL3***

Gen	Variante	Exón	Cambio de nucleótido	Cambio de amino ácido	Tipo	Análisis bioinformático		Frecuencia en nuestra población	Frecuencia en población general		<i>p</i>	Micro RNA <sup>5</sup>
						PredictSNP2 <sup>1</sup>	Fruitfly <sup>2</sup>		ExAc <sup>3</sup>	1000 Genomes Project Phase <sup>4</sup>		
<i>ANGPTL3</i>	rs72649573	1	c.379C>T	Leu129Phe	Variante con cambio de aminoácido	Deletérea (82%)	NA	0,003	0.012	1	0,353	NA
	No descrita	2	c.496-88T>G	NA	Variante intrónica	Neutral (88%)	No genera cambio de ajuste	0,003	NA	-	0,078	NA
	rs185472483	4	c.835+41C>A	NA	Variante intrónica	Neutral (78%)	No genera cambio de ajuste	0,003	0,001	0,000	0,976	NA
	rs747725081	6	c.961T>A	Tyr321Asn	Variante con cambio de aminoácido	Neutral (89%)	NA	0,003	NA	0,000	0,078	NA
	rs34483103	7	c.*52_*60del	NA	Delección en 3'UTR	Neutral (54%)	NA	0,185	NA	0,247	0,021	hsa-miR-151a-3p hsa-miR-7702
	No descrita	7	c.*76T>G	NA	Variante en 3'UTR	Neutral (65%)	NA	0,003	No reportada	No reportada	-	-
	No descrita	7	c.*117delC	NA	Delección en 3'UTR	Neutral (83%)	NA	0,019	No reportada	No reportada	-	-

<sup>1</sup>PredictSNP2 usa CADD, DANN, FATHMM y Funseq2 como predictores bioinformáticos.

<sup>2</sup>Fruitfly. Nueva predicción del sitio de ajuste.

<sup>3</sup>Monkol Lek, Konrad j-Karczewski et al. Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature 536,285-291. 2016.<sup>4</sup>1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Books LD et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature 2012;491:56-65.

<sup>5</sup>PolymiRTS Database 3.0. Disponible en: [http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/miRSNP\\_detail\\_all.php](http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/miRSNP_detail_all.php).

Continuación tabla 7. Variantes genéticas en *ANGPTL3*

Gen	Variante	Exón	Cambio de nucleótido	Cambio de amino ácido	Tipo	Análisis bioinformático		Frecuencia en nuestra población	Frecuencia en población general		<i>p</i>	Micro RNA <sup>5</sup>
						PredictSNP 2 <sup>1</sup>	Fruitfly <sup>2</sup>		ExAc <sup>3</sup>	1000 Genomes Project Phase <sup>4</sup>		
<i>ANGPTL3</i>	No descrita	7	c.*130delT	NA	Delección en 3'UTR	Neutral (78%)	NA	0,080	No reportada	No reportada	-	-
	rs12563308	6	c.1003T>C	p.Leu335Leu	Variante sinónima	Neutral (88%)	NA	0,003	0.001	0,000	0,717	NA
	rs72651034	6	c.1198+111G>A	NA	Variante intrónica	Neutral (79%)	No genera cambio de ajuste	0,003	NA	0,010	0,433	NA
	rs531071581	3	c.607-120A>G	NA	Variante intrónica	Neutral (88%)	No genera cambio de ajuste	0,006	NA	0,000	0,232	NA
	rs72649576	3	c. 607-109T>C	NA	Variante intrónica	Neutral (88%)	No genera cambio de ajuste	0,022	NA	0,010	0,148	NA
	rs72649577	3	c.607-47_607-46delGT	NA	Delección en región intrónica	Neutral (88%)	NA	0,034	0.037	0,050	0,000	NA

<sup>1</sup>PredictSNP2 usa CADD, DANN, FATHMM y Funseq2 como predictores bioinformáticos.

<sup>2</sup>Fruitfly. Nueva predicción del sitio de ajuste.

<sup>3</sup>Monkol Lek, Konrad j-Karczewski et al. Exome Aggregation Consortium. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature 536,285-291. 2016.<sup>4</sup>1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Books LD et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature 2012;491:56-65.

<sup>5</sup>PolymiRTS Database 3.0. Disponible en: [http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/miRSNP\\_detail\\_all.php](http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/miRSNP_detail_all.php).

Por otra parte, en la región 3'UTR se encontraron cuatro variantes, tres de las cuales eran deleciones.

Concretamente, la deleción de la posición 52 a la 60 se encontraba en un 18.5% de nuestros pacientes, siendo la que afectaba a un mayor número de pacientes de todas las variantes encontradas. Además, se encontraron dos microRNAs que se asociaban a esta zona (hsa-miR-151a-3p, hsa-miR-7702), razón por la cual podríamos pensar que dicha deleción podría afectar a esas interacciones, y por tanto, a la expresión de *ANGPTL3*.

Las otras tres variantes encontradas en la región 3'UTR están presentes en menos individuos de nuestra población y no se ha encontrado ningún microRNA que pudiese interactuar con las posiciones en las que se encuentran.

## 6. DISCUSIÓN

La enfermedad coronaria es el problema clínico fundamental de la HF. Tanto es así, que algunos estudios han postulado que aproximadamente el 85% de los varones y el 50% de las mujeres sufrirán un ECV antes de los 65 años si no son tratados farmacológicamente (37,38). Si los individuos con HF no son tratados tendrán altas probabilidades de desarrollar un ECV a edades tempranas viendo disminuida su esperanza de vida, y es por ello que el diagnóstico genético es fundamental. Además, dicho diagnóstico genético permite la identificación de los individuos en cascada dentro de familias afectas, favoreciendo así una reducción de eventos cardiovasculares en familiares. Sin embargo, cabe destacar que entre el 20-40% de pacientes con diagnóstico clínico de HF no presentan mutaciones en los genes candidatos, lo que indica que existen otros genes aún pendientes de descubrir (39).

El presente estudio planteó abordar el estudio de nuevos posibles genes implicados en esta alteración metabólica. Recientemente, se ha identificado *PAQR3*, un gen cuyo déficit en ratones *knockout* que seguían una dieta rica en grasa cursaba con una disminución de CT y cLDL en plasma(19). Esta deleción génica causaba también un aumento en los niveles del LDLR por la disminución de su velocidad de degradación. Todo esto llevó a intentar determinar si la proteína PAQR3 modulaba la degradación de LDLR afectando a PCSK9, o bien alterando su expresión, o bien afectando a la interacción LDLR-PCSK9. Tras el análisis de la expresión de PCSK9 en los ratones *knockout* se vio que esta no se veía perturbada. Además, en ese mismo estudio, Huang et al (19) concluyeron, mediante inmunoprecipitación, que anticuerpos que reconocían una zona de PAQR3 también reconocían una región de LDLR y otros reconocían tanto a PAQR3 como a PCSK9. Estos resultados confirmaban que, en efecto, PAQR3 afectaba a la interacción entre LDLR y PCSK9, favoreciéndola. Además Xu et al(21), han descubierto que PAQR3 promueve la formación del complejo Scap/SREBP, favoreciendo la liberación de SREBP de la membrana del aparato de Golgi, facilitando con ello su actuación como factor de transcripción potenciando la expresión de los genes implicados en la síntesis de colesterol.

Como resultado de todo ello, se asoció este gen con HF, y se decidió llevar a cabo el presente estudio en busca de mutaciones de ganancia de función que pudiesen ser la causa de la HF en individuos con diagnóstico clínico de HF sin mutaciones en los genes candidatos (HF-). Para ello, se ha llevado a cabo la secuenciación del gen en 96 sujetos HF-. A pesar de no haber encontrado ninguna variante con cambio de aminoácido, hemos encontrado variantes destacables en la región del promotor y en la región 3'UTR. Aunque sean consideradas benignas según el análisis bioinformático y no se haya encontrado ningún microRNA en las posiciones de dichas variantes, estas (rs1350329293 y rs758936129) resultan interesantes ya que no se encuentran descritas en la

población general frente a la frecuencia alélica del 0.5% reportada en nuestra población HF-. Sin embargo, para poder confirmar si estas mutaciones generan el perfil hipercolesterolémico es necesario hacer más estudios en esta línea aumentando el número de pacientes incluidos, haciendo estos mismos estudios en poblaciones control y trabajando con microRNAs con el fin de encontrar alguno que ejerza su función en la posición de estas dos variantes.

Por otro lado, hemos estudiado individuos con HFC, ya que estos también sufren una alta predisposición a desarrollar ECV ateromatosa prematura. De hecho, la prevalencia de ECV en pacientes con HFC menores de 60 años se estima superior al 15% (40). La HFC es un trastorno multigénético con una acumulación de variantes pertenecientes a diferentes genes asociados con CT, TG, cLDL, HDL e índice masa corporal. La HFC se ha asociado a más de 35 genes (26), entre ellos los correspondientes a las regiones cromosómicas 11q23-24, 1q21-23 y el gen *USF1* (41). Recientemente, también se ha asociado el gen *ANGPTL3*, que codifica una proteína del mismo nombre que inhibe la lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa endotelial. En esta línea, Xu et al (42) generaron un RNA de interferencia (iRNA) de *ANGPTL3* para silenciar su expresión tanto en el hígado de ratones como en hepatocitos humanos y mostraron que el déficit de *ANGPTL3* (debido a la delección o silenciamiento del gen, al igual que ocurre en mutaciones de pérdida de función) generaba una reducción de los niveles de TG, CT, cLDL y cHDL en plasma. Concluyendo que la inhibición de *ANGPTL3* provocaba un fenotipo de hipolipidemia. Además, los autores también mostraron que el silenciamiento de *ANGPTL3* disminuía la secreción de ApoB100 y aumentaba la recepción hepática de VLDL y LDL, indicando así el posible mecanismo de acción de esta proteína. Por todo ello, se planteó la inhibición de *ANGPTL3* como tratamiento para casos de hiperlipemias. De hecho, se abordaron estudios de administración de RNA de silenciamiento, anticuerpos monoclonales y microRNA antisentido, y todavía se está trabajando en ello. (43)

Viendo los resultados de estos estudios, llevamos a cabo la secuenciación del gen *ANGPTL3* en 162 sujetos con HFC, con el objetivo de encontrar posibles mutaciones de ganancia de función involucradas en el fenotipo de esta dislipemia. La secuenciación reportó un total de 13 variantes entre las cuales hay 4 que resultan interesantes. En primer lugar, encontramos la variante rs72649573 que genera un cambio de aminoácido, considerada como deletérea con un 82% de probabilidad. Mayoritariamente, las variantes de cambio de aminoácido generan proteínas menos funcionales, siendo clasificadas como variantes de pérdida de función. Además, esta variante se encuentra en menor frecuencia en nuestra población HFC que población general, por lo que esta variante podría ser una variante de pérdida de función. Otra variante que podemos destacar es la variante rs34483103, que genera una delección de los nucleótidos 52 a 60 en la región 3'UTR. En esta zona se ha determinado la presencia de dos microRNAs (hsa-miR-151a-3p y hsa-miR-7702), y es por esto que resulta interesante esta delección, ya que quizás modifique la afinidad de los microRNAs para esa zona favoreciendo una mayor expresión de *ANGPTL3*. Y por último, resaltaríamos también dos variantes no descritas previamente que afectan a la región 3'UTR generando una delección de citosina en la posición 117 y una delección de timidina en la posición 130. Incidimos en ellas porque, a pesar de que no se han encontrado microRNAs que interaccionen con estas zonas, se encuentran en nuestra población en una frecuencia mucho mayor que en población general (Proyecto de los 1000 Genomas). Esto nos hace pensar que podría tratarse de dos variantes que originan ganancia de función en *ANGPTL3*, aunque para confirmar este hecho se deberían hacer más estudios aumentando el número de sujetos HFC estudiados, así como la secuenciación de población normo lipémica. Además, también deberían llevarse a cabo estudios que lograsen identificar algún microRNA para dichas zonas, de tal forma que se

demostrase que las variantes generan un cambio en la unión de dichos microRNAs, y, por tanto, en la expresión de *ANGPTL3*.

## 7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

La secuenciación del gen *PAQR3*, recientemente asociado con la interacción entre LDLR y PCSK9, en 96 sujetos con HF sin mutación en los genes candidatos, reportó 8 variantes, una de ellas no descrita previamente, todas ellas localizadas en región intrónica, promotor y 3' UTR. De las 8 variantes encontradas, 4 de ellas presentaron una frecuencia alélica significativamente diferente a la población general, aunque todas ellas fueran clasificadas como benignas por el análisis bioinformático.

La secuenciación del gen *ANGPTL3*, en el cual variantes de pérdida de función se han asociado con niveles bajos de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL, en 162 sujetos con HFC, reportó 13 variantes, 4 de ellas no previamente descritas y 3 de ellas localizadas en región codificante. De las 3 variantes reportadas en región codificante, 2 variantes generan un cambio de aminoácido, p.(Leu129Phe) y p.(Tyr321Asn), aunque solo la primera fue clasificada como patogénica por el análisis bioinformático. De las 10 variantes encontradas en región intrónica o 3'UTR, cabe destacar que dos de ellas presentaron una frecuencia alélica significativamente menor en nuestra población HFC que en la población control, estando una de ellas, c.\*52\_\*60del, previamente asociada con dos microRNAs.

Nuestros resultados muestran que son necesarios más estudios que nos permitan estudiar el papel de *PAQR3* y *ANGPTL3* en la etiología de la HF y la HFC respectivamente.

*PAQR3* gene sequencing, recently associated with the interaction between LDLR and PCSK9, in 96 subjects with FH but without mutation in candidate genes, reported 8 variants, one of them not previously described, all of them located in intronic region, promoter and 3'UTR. Four of the 8 variants found presented a significantly different allelic frequency than general population, although all of them were classified as benign by the bioinformatic analysis.

*ANGPTL3* gene sequencing, in which variants of loss of function have been associated with low levels of triglycerides, total cholesterol and HDL cholesterol, in 162 subjects with FCH, reported 13 variants, four of them not previously described and three of them located in coding region. Two of the three variants reported in coding region generate an amino acid change, p.(Leu129Phe) y p.(Tyr321Asn), although only the first one was classified as pathogenic by the bioinformatic analysis. We must stand out that 2 of the 10 variants that were found in the intronic region and 3'UTR presented a significantly lower allelic frequency in our population than in control population, being one of them, c.\*52\_\*60del, previously associated with two microRNAs.

Our results suggest that more studies are needed to allow us studying the role of *PAQR3* and *ANGPTL3* in the etiology of FH and FCH respectively.

## 8. REFERENCIAS

1. OMS | ¿Qué son las enfermedades cardiovasculares? [Internet]. WHO. [citado 6 de febrero de 2019]. Disponible en: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/es/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/)
2. Durrington P. Dyslipidaemia. *The Lancet*. 30 de agosto de 2003;362(9385):717-31.
3. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:459-81.
4. Emilio Herrera. *Bioquímica: Aspectos estructurales y vías metabólicas*. Vol. 1. McGraw-Hill;
5. Carmena R, Duriez P, Fruchart J-C. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation*. 15 de junio de 2004;109(23 Suppl 1):III2-7.
6. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. febrero de 2009;10(2):109-21.
7. Johansen CT, Kathiresan S, Hegele RA. Genetic determinants of plasma triglycerides. *J Lipid Res*. febrero de 2011;52(2):189-206.
8. Hegele RA, Pollex RL. Hypertriglyceridemia: phenomics and genomics. *Mol Cell Biochem*. junio de 2009;326(1-2):35-43.
9. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications | Nature Reviews Genetics [Internet]. [citado 6 de febrero de 2019]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nrg2481>
10. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. abril de 2009;29(4):431-8.
11. Cenarro A, Etxebarria A, de Castro-Orós I, Stef M, Bea AM, Palacios L, et al. The p.Leu167del Mutation in APOE Gene Causes Autosomal Dominant Hypercholesterolemia by Down-regulation of LDL Receptor Expression in Hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. mayo de 2016;101(5):2113-21.
12. Riba L. Genes implicados en las formas monogénicas de la hipercolesterolemia familiar. (2008):8.
13. Lamiquiz-Moneo I, Baila-Rueda L, Bea AM, Mateo-Gallego R, Pérez-Calahorra S, Marco-Benedí V, et al. ABCG5/G8 gene is associated with hypercholesterolemias without mutation in candidate genes and noncholesterol sterols. *J Clin Lipidol*. diciembre de 2017;11(6):1432-1440.e4.
14. Fouchier SW, Dallinga-Thie GM, Meijers JCM, Zelcer N, Kastelein JJP, Defesche JC, et al. Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Circ Res*. 29 de agosto de 2014;115(6):552-5.
15. France M. Homozygous familial hypercholesterolaemia: update on management. *Paediatr Int Child Health*. noviembre de 2016;36(4):243-7.
16. Kotze MJ, De Villiers WJ, Steyn K, Kriek JA, Marais AD, Langenhoven E, et al. Phenotypic variation among familial hypercholesterolemics heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol*. octubre de 1993;13(10):1460-8.

17. Akioyamen LE, Genest J, Shan SD, Reel RL, Albaum JM, Chu A, et al. Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 1 de septiembre de 2017;7(9):e016461.
18. Yuan G, Wang J, Hegele RA. Heterozygous familial hypercholesterolemia: an underrecognized cause of early cardiovascular disease. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicales Can*. 11 de abril de 2006;174(8):1124-9.
19. Huang M, Zhao Z, Cao Q, You X, Wei S, Zhao J, et al. PAQR3 modulates blood cholesterol level by facilitating interaction between LDLR and PCSK9. *Metabolism*. 1 de marzo de 2019;
20. Zhao Z, Xu D, Wang Z, Wang L, Han R, Wang Z, et al. Hepatic PPAR $\alpha$  function is controlled by polyubiquitination and proteasome-mediated degradation through the coordinated actions of PAQR3 and HUWE1. *Hepatology Baltim Md*. 2018;68(1):289-303.
21. Xu D, Wang Z, Zhang Y, Jiang W, Pan Y, Song B-L, et al. PAQR3 modulates cholesterol homeostasis by anchoring Scap/SREBP complex to the Golgi apparatus. *Nat Commun*. 27 de agosto de 2015;6:8100.
22. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 4 de abril de 1986;232(4746):34-47.
23. Ellis KL, Pang J, Chan DC, Hooper AJ, Bell DA, Burnett JR, et al. Familial combined hyperlipidemia and hyperlipoprotein(a) as phenotypic mimics of familial hypercholesterolemia: Frequencies, associations and predictions. *J Clin Lipidol*. diciembre de 2016;10(6):1329-1337.e3.
24. Veerkamp MJ, de Graaf J, Bredie SJH, Hendriks JCM, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Diagnosis of familial combined hyperlipidemia based on lipid phenotype expression in 32 families: results of a 5-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 de febrero de 2002;22(2):274-82.
25. Brunzell JD. Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med*. 6 de septiembre de 2007;357(10):1009-17.
26. Brouwers MCGJ, van Greevenbroek MMJ, Stehouwer CDA, de Graaf J, Stalenhoef AFH. The genetics of familial combined hyperlipidaemia. *Nat Rev Endocrinol*. 14 de febrero de 2012;8(6):352-62.
27. Veerkamp MJ, de Graaf J, Stalenhoef AFH. Role of insulin resistance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. mayo de 2005;25(5):1026-31.
28. Castro Cabezas M, de Bruin TW, de Valk HW, Shoulders CC, Jansen H, Willem Erkelens D. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. A mechanism associating hepatic apolipoprotein B overproduction and insulin resistance. *J Clin Invest*. julio de 1993;92(1):160-8.
29. Mata P, Alonso R, Ruíz-García A, Díaz-Díaz JL, González N, Gijón-Conde T, et al. [Familial combined hyperlipidemia: consensus document]. *Semergen*. octubre de 2014;40(7):374-80.
30. van Greevenbroek MMJ, Stalenhoef AFH, de Graaf J, Brouwers MCGJ. Familial combined hyperlipidemia: from molecular insights to tailored therapy. *Curr Opin Lipidol*. junio de 2014;25(3):176-82.



31. Lupo MG, Ferri N. Angiopoietin-Like 3 (ANGPTL3) and Atherosclerosis: Lipid and Non-Lipid Related Effects. *J Cardiovasc Dev Dis.* 14 de julio de 2018;5(3).
32. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* agosto de 2012;40(15):e115.
33. OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT [Internet]. [citado 13 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
34. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 1 de noviembre de 2012;491(7422):56-65.
35. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 18 de 2016;536(7616):285-91.
36. BDGP: Splice Site Prediction by Neural Network [Internet]. [citado 18 de junio de 2019]. Disponible en: [https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)
37. De Castro-Orós I, Pocoví M, Civeira F. The genetic basis of familial hypercholesterolemia: inheritance, linkage, and mutations. *Appl Clin Genet.* 2010;3:53-64.
38. Civeira F, International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* marzo de 2004;173(1):55-68.
39. Palacios L, Grandoso L, Cuevas N, Olano-Martín E, Martínez A, Tejedor D, et al. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain. *Atherosclerosis.* marzo de 2012;221(1):137-42.
40. Skoumas I, Masoura C, Aznaouridis K, Metaxa V, Tsokanis A, Papadimitriou L, et al. Impact of cardiometabolic risk factors on major cardiovascular events in patients with familial combined hyperlipidemia. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2013;77(1):163-8.
41. van Greevenbroek MMJ, Stalenhoef AFH, de Graaf J, Brouwers MCGJ. Familial combined hyperlipidemia: from molecular insights to tailored therapy. *Curr Opin Lipidol.* junio de 2014;25(3):176-82.
42. Xu Y-X, Redon V, Yu H, Querbes W, Pirruccello J, Liebow A, et al. Role of angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) in regulating plasma level of low-density lipoprotein cholesterol. *Atherosclerosis.* 2018;268:196-206.
43. Xu Y-X, Redon V, Yu H, Querbes W, Pirruccello J, Liebow A, et al. Role of angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) in regulating plasma level of low-density lipoprotein cholesterol. *Atherosclerosis.* 2018;268:196-206.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Optimización de la secuenciación por PCR del gen *PAQR3*

Tabla 9.1.1: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 1 de *PAQR3*

Reactivos	Volumen (µL)	Programa		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Buffer	200	95	5'	1
dNTP's	200	95	30''	40
MgCl <sub>2</sub>	60	56.5	30''	
Cebador directo exón 1	40	72	30''	
Cebador reverso exón 1	40	72	7'	1
Taq Polimerasa	12	4	∞	1
DMSO	200			
dH <sub>2</sub> O	1150			
DNA	1			

Tabla 9.1.2: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 2 de *PAQR3*

Reactivos	Volumen (µL)	Programa		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Buffer	200	94	2'	1
dNTP's	200	94	20''	25
MgCl <sub>2</sub>	60	57	20''	
Cebador directo exón 2	40	72	30''	
Cebador reverso exón 2	40	72	4'	1
Taq Polimerasa	12	4	∞	1
dH <sub>2</sub> O	1350			
DNA	1			

**Tabla 9.1.3: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 3 de PAQR3**

Reactivos	Volumen (µL)	Programa		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Buffer	200	94	2´	1
dNTP´s	200	94	20´´	35
MgCl <sub>2</sub>	60	53	30´´	
Cebador directo exón 3	40	72	30´´	
Cebador reverso exón 3	40	72	7´	1
Taq Polimerasa	12	4	∞	1
Betaína	200			
dH <sub>2</sub> O	1150			
DNA	1			

**Tabla 9.1.4: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 4 de PAQR3**

Reactivos	Volumen (µL)	Programa		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Buffer	200	94	2´	1
dNTP´s	200	94	20´´	40
MgCl <sub>2</sub>	60	54	20´´	
Cebador directo exón 4	40	72	30´´	
Cebador reverso exón 4	40	72	4´	1
Taq Polimerasa	12	4	∞	1
Betaína	200			
dH <sub>2</sub> O	1150			
DNA	1			

**Tabla 9.1.5: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 5 de PAQR3**

Reactivos	Volumen (µL)	Programa		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Buffer</b>	200	94	2´	1
<b>dNTP´s</b>	200	94	20´´	35
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	60	55.5	20´´	
<b>Cebador directo exón 5</b>	40	72	30´´	
<b>Cebador reverso exón 5</b>	40	72	4´	1
<b>Taq Polimerasa</b>	12	4	∞	1
<b>Betaína</b>	200			
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1150			
<b>DNA</b>	1			

**Tabla 9.1.6: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 6 de PAQR3**

Reactivos	Volumen (µL)	Programa		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Buffer</b>	200	94	2´	1
<b>dNTP´s</b>	200	94	20´´	35
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	60	54.5	30´´	
<b>Cebador directo exón 6</b>	40	72	30´´	
<b>Cebador reverso exón 6</b>	40	72	4´	1
<b>Taq Polimerasa</b>	12	4	∞	1
<b>Betaína</b>	200			
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1150			
<b>DNA</b>	1			

## 9.2 Optimización de la secuenciación por PCR del gen *ANGPTL3*

Tabla 9.2.1: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 1 de *ANGPTL3*

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Programa		
		Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	Nº de ciclos
Buffer	200	94	2'	1
dNTP's	200	94	20''	35
MgCl <sub>2</sub>	60	51.5	30''	
Cebador directo exón 7	40	72	30''	
Cebador reverso exón 7	40	72	7'	1
Taq Polimerasa	12	4	$\infty$	1
Betaína	200			
dH <sub>2</sub> O	1150			
DNA	1			

Tabla 9.2.2: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 2 de *ANGPTL3*

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Programa		
		Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	Nº de ciclos
Buffer	200	94	2'	1
dNTP's	200	94	20''	40
MgCl <sub>2</sub>	60	51	30''	
Cebador directo exón 2	40	72	30''	
Cebador reverso exón 2	40	72	7'	1
Taq Polimerasa	12	4	$\infty$	1
dH <sub>2</sub> O	1350			
DNA	1			

**Tabla 9.2.3: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 3 de *ANGPTL3***

Reactivos	Volumen (µL)	Programa		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Buffer</b>	200	94	2´	1
<b>dNTP´s</b>	200	94	20´´	35
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	60	51	30´´	
<b>Cebador directo exón 7</b>	40	72	30´´	
<b>Cebador reverso exón 7</b>	40	72	7´	1
<b>Taq Polimerasa</b>	12	4	∞	1
<b>Betaína</b>	200			
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1150			
<b>DNA</b>	1			

**Tabla 9.2.4: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 4 de *ANGPTL3***

Reactivos	Volumen (µL)	Programa		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Buffer</b>	200	94	2´	1
<b>dNTP´s</b>	200	94	20´´	35
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	60	53.5	30´´	
<b>Cebador directo exón 4</b>	40	72	30´´	
<b>Cebador reverso exón 4</b>	40	72	7´	1
<b>Taq Polimerasa</b>	12	4	∞	1
<b>Betaína</b>	200			
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1150			
<b>DNA</b>	1			

**Tabla 9.2.5: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 5 de *ANGPTL3***

Reactivos	Volumen (µL)	Programa		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Buffer</b>	200	94	2´	1
<b>dNTP´s</b>	200	94	20´´	35
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	60	52.5	30´´	
<b>Cebador directo exón 5</b>	40	72	30´´	
<b>Cebador reverso exón 5</b>	40	72	7´	1
<b>Taq Polimerasa</b>	12	4	∞	1
<b>Betaína</b>	200			
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1150			
<b>DNA</b>	1			

**Tabla 9.2.6: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 6 de *ANGPTL3***

Reactivos	Volumen (µL)	Programa		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Buffer</b>	200	94	2´	1
<b>dNTP´s</b>	200	94	20´´	35
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	60	52.5	30´´	
<b>Cebador directo exón 6</b>	40	72	30´´	
<b>Cebador reverso exón 6</b>	40	72	7´	1
<b>Taq Polimerasa</b>	12	4	∞	1
<b>Betaína</b>	200			
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1150			
<b>DNA</b>	1			

**Tabla 9.2.7: Condiciones PCR placa entera para la secuenciación del exón 7 de *ANGPTL3***

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Programa		
		Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	Nº de ciclos
<b>Buffer</b>	200	94	2'	1
<b>dNTP's</b>	200	94	20''	40
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	60	51	30''	
<b>Cebador directo exón 7</b>	40	72	30''	
<b>Cebador reverso exón 7</b>	40	72	7'	1
<b>Taq Polimerasa</b>	12	4	$\infty$	1
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1350			
<b>DNA</b>	1			



### 9.3 Cebadores utilizados para la reacción de secuenciación de PAQR3

Tabla 9.3.1: Cebadores utilizados para la secuenciación de cada exón de PAQR3 y sus pares de bases, temperatura de *Melting*, porcentaje de guanina y citosina, formación de heterodímeros y homodímeros.

GEN	Nombre	Secuencia	Pb	TM	%GC	Self. Dim	Het. Dim	Prod. Size	TM
PAQR3	Exón 1	F: 5'-CCTCCCAGCTAGGGCTGA-3'	17	57.7	70.6%	- 6.69	- 8.09	550	57
		R: 5'-AATGATGGGCAAGCAGAAAG-3'	21	56	47.6%	- 3.14			
	Exon 1_v2	F: 5'- CCAAACACAGCGTGAGAGAC-3'	21	56.3	52.4%	- 3.61	- 4.95	695	56.5
		R: 5'-GGAGATAACGGGGGAGGAG-3'	19	56.6	63.2%	- 3.61			
	Exón 2	F: 5'-GGTACAGGTGGGGTAAGAGC-3'	20	57.2	60%	- 3.65	- 9.86	394	57
		R: 5'-CGGGGCTCTTTAAAGCAAGTG-3'	21	56.5	52%	- 11.9			
	Exón 3	F: 5'-TGGATCAAACAAGCCTCAG-3'	20	52.9	45%	- 4.62	- 5.24	687	53
		R: 5'-GATAACAGATGTTAGAGATGACAGG-3'	25	52.7	40%	-6.2			
	Exón 4	F: 5'-CCAGCTCACTTTAGAATTTGGTTT-3'	24	53.8	37.5%	- 6.34	- 5.12	587	54
		R: 5'-TCGACTTCTGCAAGGTATGC-3'	20	54.9	50%	- 7.05			
	Exón 5	F: 5'-TCTGTGCTCCATTCTTGCAG-3'	20	55.3	50%	- 7.05	-6.6	478	56
		R: 5'-CAACACCACCTACTGGACTCAA-3'	22	56.6	50%	- 5.02			
	Exón 6	F: 5'-AAAACACACTTGGAATAGCATTCT-3'	25	53.6	32%	- 3.89	-5.5	600	54
		R: 5'-TCACTTTCTGTACAAGCAGCAAA-3'	23	55	39.1%	- 7.55			

#### 9.4 Cebadores utilizados en la reacción de secuenciación de *ANGPTL3*

Tabla 9.4.1: Cebadores utilizados para la secuenciación de cada exón de *ANGPTL3* y sus pares de bases, temperatura de *Melting*, porcentaje de guanina y citosina, formación de heterodímeros y homodímeros.

GEN	Nombre	Secuencia	Pb	TM	%GC	Self. Dim	Het. Dim	Prod. Size	TM
<i>ANGPTL3</i>	Exón 1	F: 5'- CCTATTAAGTTAGTTGCTCATTCTTT-3'	27	51.9	30%	-4.85	-	835	51
		R: 5'- AAAAGTATTTCAACAATGCAACAAA-3'	25	51	24%	-7.05			
	Exón 1_v2	F: 5'- CCTTACCTTTTCTGGGCAA-3'	19	52.5	47.4%	-3.14	-	821	51.5
		R: 5'- AAATGCAAATTTTCAGTGTTTTCA-3'	24	51	25%	-9.25			
	Exón 2	F: 5'- GCTGGGCTTTTTCTTTAATTG-3'	22	51.1	36.4%	-5.36	-	496	51
		R: 5'- CTTCAGAGCCTGCAATTTT-3'	19	50.9	42.1%	-7.05			
	Exón 3	F: 5'- TTGAGAACAGGTAATCTGTACAATCT-3'	27	53.8	34.6%	-7.55	-	484	53
		R: 5'- TCAAGTCCATATTTGTATTTCTCTGA-3'	26	52.2	30.8%	-3.91			
	Exón 3_v2	F: 5'-CCGACCAATGTCTGCTTTTT-3'	19	51.1	42.1%	-3.61	-	555	51
		R: 5'- TCAAGTCCATATTTGTATTTCTCTG-3'	25	51	32%	-3.91			
	Exón 4	F: 5'- TCCAGACTGGTGATAGAACAAG-3'	22	53.9	45.5%	-6.62	-	597	53.5
		R: 5'- GGCAATTAATGAATTTTGGCATAGT-3'	25	52.8	32%	-7.8			
	Exón 5	F: 5'- TCTCCTTTTCTCTAAAATAATCTGAA- 3'	27	52.2	29.6%	-5.38	-	596	52.5
		R: 5'-TGATCATTGTAAGCCGTGG-3'	19	52.6	45%	-8.53			
Exón 6	F: 5'- ATGCATTATAGAAAGGATAATCAGACT- 3'	27	52.2	30%	-10	-	700	52.5	
	R: 5'- GAGGAAGATTAGAGGTAAAATACCTG- 3'	26	52.7	38.5%	-6.97				
Exón 7	F: 5'- ACCTCTAATCTTCCTCAGATTTTC- 3'	25	52.1	36%	-6.59	-	599	51	
	R: 5'- TTTTGATTGAGAAATGTAAACGGTA-3'	25	51.3	28%	-3.89				