



Universidad
Zaragoza



Instituto de Investigación
Sanitaria Aragón

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Identificación de variantes del gen *CETP* en sujetos
con dislipemia de etiología desconocida

Identification of variants of the *CETP* gene in subjects
with dyslipidemia of unknown etiology

Autor

Jaime Martinez Paz

Directora

Dra. Irene Gracia Rubio

Ponente

Dr. Jesús de la Osada García

Hospital Universitario Miguel Servet

Instituto de Investigación Sanitario Aragón (IISA)

Grupo de investigación "GIIS007 Dislipemias Primarias"

GRADO EN BIOTECNOLOGIA. CURSO 2022-2023

ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferasa
Apo	Apolipoproteína
Apo A1	Apolipoproteína A1
Apo A2	Apolipoproteína A2
ApoB	Apolipoproteína B
BPI	Proteína inductora de la permeabilidad bacteriana
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
CBP	Proteína de unión a lipopolisacáridos
cDNA	DNA codificante
cHDL	Colesterol HDL
cLDL	Colesterol LDL
CT	Colesterol total
DM	Diabetes mellitus
EC	Éster de colesterol
ECV	Enfermedad cardiovascular
FL	Fosfolípidos
GGT	Gamma glutamil transferasa
GPT	Transaminasa glutámico-pirúvica
HALP	Hiperalfalipoproteinemia
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HTA	Hipertensión arterial
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IMC	Índice de masa corporal
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferasa
LDLR	Receptor específico de las LDL
LDLox	LDL oxidadas
LH	Lipasa hepática
Lp(a)	Lipoproteína a
LPL	Lipoproteína lipasa
PLTP	Proteína transferidora de fosfolípidos
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido
SRB-1	Receptor scavenger de clase B, tipo I
TG	Triglicéridos
TGL	Triglicéridos totales
TM	Temperatura de melting
TRC	Transporte reverso de colesterol
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

INDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
1.1 Resumen.....	1
1.2 Abstract	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Enfermedades cardiovasculares.....	2
2.2. CETP.....	4
2.3. CETP en el metabolismo lipoproteico	5
2.4. CETP en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular	6
2.5. Variantes genéticas de <i>CETP</i>	7
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Selección de sujetos	8
4.2. Parámetros clínicos y antropométricos	9
4.3. Análisis bioquímico.....	9
4.4. Obtención del DNA genómico.....	10
4.5. Diseño de cebadores	10
4.6. Amplificación por PCR del gen de estudio	11
4.7. Purificación del producto de PCR mediante ExoSAP-IT	12
4.8. Reacción de secuenciación.....	12
4.9. Análisis bioinformático.....	13
4.10. Análisis estadístico	13
5. RESULTADOS	14
5.1. Características clínicas, bioquímicas y antropométricas.....	14
5.2. Variantes del gen <i>CETP</i>	15
6. DISCUSIÓN	19
7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	21
7.1. CONCLUSIONES	21
7.2. CONCLUSIONS	22
8. BIBLIOGRAFÍA	22

1. RESUMEN/ABSTRACT

1.1 Resumen

La concentración elevada de colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad (cLDL) se ha descrito como uno de los principales factores de riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (ECV), mientras que el colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad (cHDL) actúa como factor ateroprotector reduciendo el riesgo de desarrollar aterosclerosis. Sin embargo, estudios recientes desafían la presunta relación inversa entre el cHDL y ECV, sugiriendo que la asociación se ajusta más a un modelo en forma de U. En este sentido, la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) desempeña un papel importante en el metabolismo lipoproteico y el desarrollo de la ECV, al promover la redistribución de ésteres de colesterol (EC) y triglicéridos (TG) entre las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) durante la ruta indirecta del transporte reverso de colesterol (TRC), en el que se retorna el exceso de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado para ser excretado en forma de sales biliares. En este trabajo, se seleccionaron 96 sujetos con valores extremos de cHDL para analizar la relación entre los polimorfismos identificados en el gen *CETP* y el perfil lipídico de estos pacientes. Los análisis de las características clínicas, bioquímicas y antropométricas muestran que los sujetos con menor concentración de cHDL presentan menores valores de cLDL y colesterol total (CT), mientras que se observa mayor concentración de triglicéridos y mayor índice de masa corporal (IMC), además los antecedentes de ECV son significativamente superiores, evidenciando el papel de cHDL como factor de protección vascular. En cuanto al análisis de las variantes genéticas de *CETP*, se identificaron 28, de las cuales 7 están presentes exclusivamente en el grupo con valores elevados de cHDL y 4 sólo en el grupo con baja concentración de cHDL. Se identificaron dos variantes deletéreas (rs9930761 (c. 751-51 T>C) y rs1800774 (c. 1215-14 C>T)) y tres variantes no descritas previamente (c. 6 G>A, c. 369-42 T>C y p. (Asp159=). Por otra parte, el análisis comparativo de las frecuencias alélicas de los polimorfismos en sujetos con niveles extremos de cHDL de nuestro estudio respecto a la población general europea muestra que dos variantes presentan diferencias significativas en ambos grupos de cHDL (c. 440-103 G>T y c. 930+29 G>A).

1.2 Abstract

Concentration of low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) is described as one of the main risk factors of cardiovascular disease (CVD), whereas high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) acts as an atheroprotector factor reducing the risk of developing atherosclerosis. However, recent studies have challenged the presumed inverse association between HDLc and CVD, suggesting a more U-shaped association. In this sense, cholesteryl ester transfer protein (CETP) plays an important role in the lipoprotein metabolism and development of CVD, since it promotes the redistribution of cholesterol esters (CE) and triglycerides (TG) between high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein (LDL) through the indirect pathway of

the reverse cholesterol transport (RCT), in which excess of cholesterol from peripheral tissues is returned to the liver to be excreted as bile salts. In this study, 96 subjects with extreme levels of HDLc were selected in order to analyse the relationship between the *CETP* gene polymorphisms and the lipid profile of this patients. Analysis of the clinical, biochemical and anthropometric parameters show that subjects with lower levels of HDLc present lower levels of LDLc and total cholesterol (TC), whilst higher levels of triglycerides were observed and body mass index (BMI) and CVD events were significantly higher, evidencing the role of HDLc as vascular protection factor. As regards the analysis of *CETP* genetic variants, 28 variants were identified, which 7 are exclusively present in the high HDLc group and 4 only in the low HDLc group. Two deleterious variants (rs9930761 (c. 751-51 T>C) and rs1800774 (c. 1215-14 C>T)) and three variants not previously reported (c. 6 G>A, c. 369-42 T>C and p. (Asp159=) were identified. On the other hand, the comparative analysis of polymorphisms allele frequency from the subjects with extreme levels of HDLc of our study and the European general population show that two variants present significative differences in both HDLc groups (c. 440-103 G>T and c. 930+29 G>A).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Enfermedades cardiovasculares

En la actualidad, la enfermedad cardiovascular (ECV) es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados occidentales, siendo la causa de alrededor del 50% de las muertes en la población de estos países¹. Se trata de un término amplio que engloba trastornos del sistema cardiovascular que incluye el corazón y los vasos sanguíneos y se clasifican, según su etiología, en hipertensión arterial, cardiopatía coronaria, enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular, insuficiencias cardíacas y cardiopatías congénitas. Existen diversos factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecer ECV, entre los que podemos diferenciar los no modificables que incluyen variables como la edad, el sexo o factores genéticos y otros modificables, de mayor interés, como la hipertensión arterial (HTA), el tabaquismo o la diabetes mellitus (DM)².

En este sentido, se ha demostrado también que un importante factor de riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis y algunas enfermedades vasculares similares es la concentración de lipoproteínas y lípidos en el plasma y, en concreto, la concentración elevada de colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad (cLDL)³. Esto se debe a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), un proceso muy complejo en el que tanto los lípidos como las proteínas se oxidan formando diferentes productos, lo que acaba disminuyendo la afinidad de los receptores específicos de la LDL (LDLR). Posteriormente, los macrófagos y las células endoteliales, mediante los receptores scavenger, son capaces de absorber las LDL oxidadas (LDLox) de forma más rápida y desregulada, lo que lleva a una acumulación de colesterol en la pared vascular originando las células espumosas características de la lesión aterosclerótica⁴.

Por otra parte, se ha demostrado en numerosos estudios epidemiológicos una relación inversa entre el colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y la enfermedad cardiovascular⁵, es decir, niveles bajos de cHDL están relacionados con un mayor riesgo de padecer ECV. Esta relación es debida al papel que desempeñan las lipoproteínas de alta

densidad (HDL) en el transporte reverso del colesterol (TRC) desde los tejidos periféricos al hígado para ser excretado en forma de sales biliares⁶. Sin embargo, otros estudios recientes han revelado que esta asociación no es lineal, sino que se ajusta más a un modelo en forma de U, pues valores extremadamente altos de cHDL también están relacionados con un aumento de eventos de ECV y mortalidad⁷, lo que parece indicar que el papel de las HDL como factor ateroprotector está más relacionado con su función que con sus concentraciones.

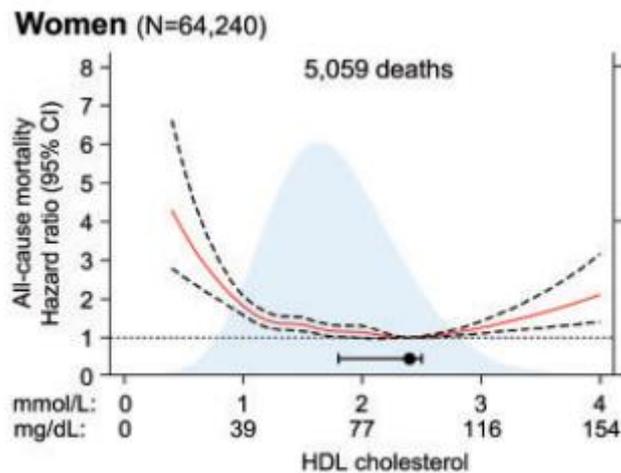


Figura 1: Representación del riesgo de mortalidad frente a la concentración de cHDL en la población general. Basado en 64240 mujeres del Estudio de población general de Copenhague y Estudio del Corazón de Copenhague combinados. La línea continua representa el cociente de riesgo y las líneas discontinuas corresponden al intervalo de confianza del 95%. El área azul indica la distribución de la concentración de cHDL (Madsen et al., 2017).

Además, un factor importante en la patofisiología de la aterosclerosis y las ECV es la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), encargada de mediar la ruta indirecta del TRC. CETP es responsable de intercambiar los ésteres de colesterol (EC) por triglicéridos (TG) desde las HDL a las lipoproteínas que contienen la apolipoproteína B (apoB) como las LDL, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), los remanentes de VLDL y lipoproteínas de densidad intermedia (IDL)⁸, de modo que, al promover la transferencia de EC y TG entre lipoproteínas pro- y anti-aterogénicas, aún existe controversia en torno a la implicación de CETP en el desarrollo de la aterosclerosis.

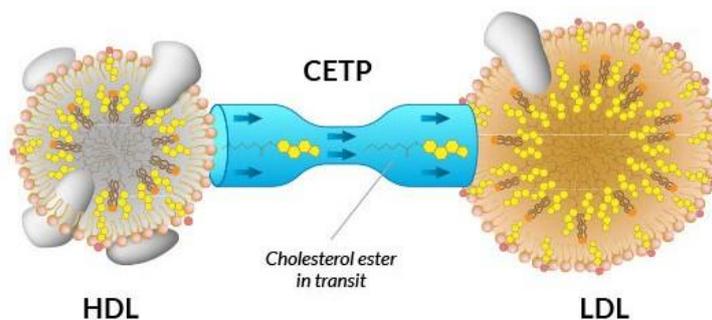


Figura 2: CETP promueve la transferencia de ésteres de colesterol desde las HDL a las LDL (NewAmsterdam Pharma)

2.2. CETP

CETP pertenece a una superfamilia de proteínas que participan en la unión de lípidos (Proteínas de unión a lipoproteínas (LBP) y proteínas inductoras de la permeabilidad bacteriana (BPI)) y en la transferencia de lípidos (CETP y la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP))⁹. En humanos, está codificada por el gen *CETP* que presenta un tamaño de 21,90 kb y se localiza en el brazo largo Q del cromosoma 16 (16q21)³. Está compuesto por 16 exones y 15 intrones, de forma que el DNA codificante (cDNA) consta de 1691 bases y se han descrito 2 isoformas resultantes del splicing alternativo. Se trata de un gen bastante conservado en otras especies que se expresa principalmente en el tejido adiposo, aunque en humanos también presenta buenos niveles de expresión en el hígado, bazo y en los nodos linfáticos¹⁰.



Figura 3: Estructura del gen *CETP* humano. Las barras verticales representan los exones.

El producto génico de este gen es una glicoproteína de 493 aminoácidos y 74 kDa de peso molecular, de los cuales el 28% se debe a la N-glicosilación de los residuos 88, 240, 341 y 396⁹. Se trata de una glicoproteína hidrófoba, pues presenta un 44 % de residuos apolares y su estructura principal se puede dividir en 4 unidades estructurales: un barril en cada extremo de la proteína (N-terminal y C-terminal) compuesto por una lámina- β y dos hélices- α , una lámina- β central situada entre los barriles y una extensión en el dominio C-terminal⁹. La estructura de CETP revela 4 moléculas lipídicas unidas y se ha demostrado que CETP puede unir dos lípidos neutrales, que pueden ser EC o TG, y dos fosfolípidos⁹. Estos lípidos se disponen en un largo túnel que atraviesa el centro de la proteína y tiene dos aberturas suficientemente grandes como para permitir el acceso de los lípidos. Este túnel está formado por una pared de láminas- β debajo de los lípidos unidos y una capa de hélices- α sobre ellos, de forma que los dos ésteres de colesterol (EC1 y EC2) se unen cómodamente en el túnel en la misma orientación sobre residuos mayormente hidrófobos, con la cabeza de EC2 junto a la cola de EC1 que se encuentra entre el barril N-terminal y las lámina- β central, mientras que los fosfolípidos se unen a ambos lados del túnel enterrando sus grupos acilo dentro del túnel y exponiendo al solvente sus cabezas zwitterónicas para favorecer la compatibilidad de la proteína a ambiente acuoso⁹.

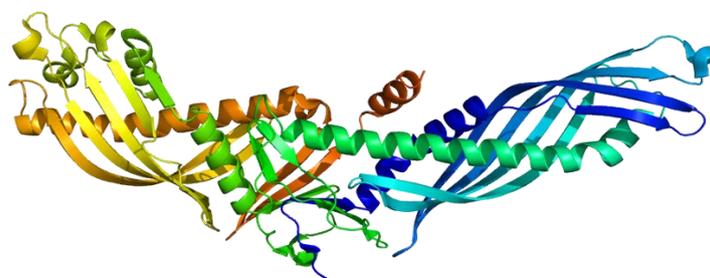


Figura 4: Estructura tridimensional de CETP (Wikipedia)

Además, la estructura de la superficie cóncava de CETP indica que sólo puede unirse a una lipoproteína a la vez, lo que apoya la idea de que CETP opera mediante un mecanismo de

transporte en el que acepta lípidos neutrales de una lipoproteína donadora, los transporta a través de la fase acuosa y se los cede a una lipoproteína aceptora¹¹. Así pues, CETP unida a los ésteres de colesterol se une a las VLDL y libera la unión de los fosfolípidos, de modo que pueden intercambiar una o dos moléculas de TG de las VLDL por los EC de CETP (**Figura 2**, paso 1)⁹. Ahora CETP unida a los TG se separa de las VLDL cargándose con los dos fosfolípidos de la superficie y dejando unas VLDL más ricas en EC (paso 2) y se une a las HDL, de forma que, de la misma manera, libera la unión de los fosfolípidos y se produce el intercambio entre los TG de CETP y los EC de las HDL (paso 3). Por último, CETP se disocia de HDL cargándose con los fosfolípidos y completa el ciclo que resulta en una HDL con menor contenido en ésteres de colesterol (paso 4)⁹.

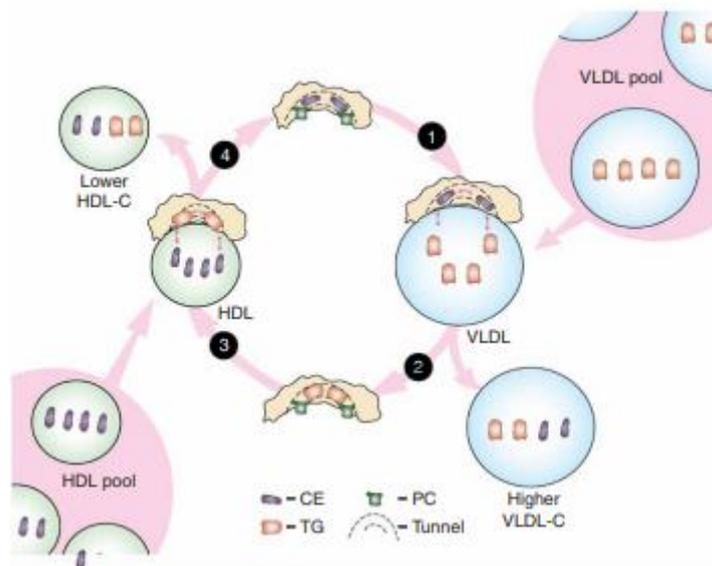


Figura 5: Mecanismo propuesto para el intercambio de lípidos mediado por CETP (Qiu et al., 2007)

En cuanto a su localización tisular, se trata de una proteína que es sintetizada por el hígado y se secreta al plasma¹², expresándose en tejidos como el adiposo, hígado, tejido linfático y placenta.

2.3. CETP en el metabolismo lipoproteico

Como se ha mencionado anteriormente, CETP desempeña un papel importante en el metabolismo lipoproteico al promover la redistribución de ésteres de colesterol, triglicéridos y en menor medida fosfolípidos entre las lipoproteínas del plasma.

El colesterol circula permanentemente en el cuerpo humano entre el hígado, donde es almacenado y secretado, y los tejidos periféricos. Sin embargo, se trata de una molécula hidrofóbica que es insoluble en disoluciones acuosas, por lo que necesita ir vehiculizado en unas moléculas especiales conocidas como lipoproteínas plasmáticas. Estas lipoproteínas son unas partículas esféricas formadas por un núcleo de lípidos no polares como EC y TG y una capa superficial hidrofílica formada por colesterol no esterificado, fosfolípidos (FL) y unas proteínas específicas llamadas apolipoproteínas (Apo), de modo que en función de la proporción

de lípidos/proteínas se clasifican atendiendo a su densidad en quilomicrones, VLDL, IDL, LDL y HDL¹³.

En condiciones normales, en humanos, la mayor parte del colesterol es transportado por el torrente sanguíneo unido a LDL, la cual está asociada con la acumulación del colesterol en las arterias, mientras que las HDL se emplean para retornar el exceso de colesterol de los tejidos al hígado lo que se conoce como transporte reverso de colesterol. Este transporte reverso puede seguir dos mecanismos, el mecanismo directo en el que el cHDL es absorbido por el hígado mediante receptores de HDL (SRB-1) y el mecanismo indirecto mediado por CETP⁵. En esta ruta, una vez el colesterol es transferido a las HDL, se produce su esterificación mediante la enzima Lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) conformando las HDL maduras⁶. Tras esto, entra en juego CETP que es la encargada de mediar la transferencia equimolar de EC desde las HDL por TG de las LDL, VLDL o incluso quilomicrones, de forma que gracias a su acción los EC pueden ser absorbidos por el hígado mediante receptores de apoB-lipoproteínas (LDL, VLDL, IDL)¹⁴.

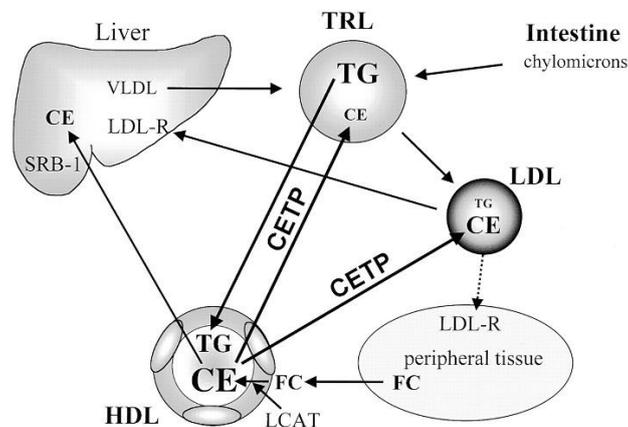


Figura 6: Papel de CETP en el transporte lipídico plasmático (Barter et al., 2003)

En el hígado, los ésteres de colesterol son hidrolizados y el colesterol libre es convertido a ácidos biliares que emulsionan las grasas y las vitaminas liposolubles (A, E y D), facilitando su absorción intestinal, o es transportado por ABCG5 y ABCG8 a la bilis para su excreción en las heces⁶.

2.4. CETP en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular

CETP es una proteína con gran implicación en el metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas y numerosos estudios sugieren que también está relacionada con el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. CETP contribuye a un fenotipo aterogénico de diferentes maneras. La principal actividad pro-aterogénica de CETP implica la redirección de los EC a lipoproteínas de un perfil aterogénico, en vez de dirigir los EC para eliminarlos por el hígado mediante el receptor SRB-1 o el receptor de la LDL¹⁵. En primer lugar, redistribuye los ésteres de colesterol reduciendo la concentración de cHDL e incrementando el contenido de EC y la aterogenicidad de las VLDL/LDL¹⁶. Por otra parte, la interacción entre CETP y las lipasas de TG, como la lipoproteína lipasa (LPL) o la lipasa hepática (LH), es relevante en la aterosclerosis, pues se ha demostrado que la actividad de CETP está inversamente relacionada con los niveles de estas

lipasas. Además, CETP interactúa con estas lipasas que catalizan la hidrólisis de las LDL y HDL ricas en TG, dando lugar a pequeñas y densas LDL y HDL respectivamente, que son más aterogénicas que las grandes y ligeras¹².

Sin embargo, la relación entre CETP y el desarrollo de la enfermedad cardiovascular es cada vez un tema más debatido y controvertido, ya que diversos estudios sugieren que CETP tiene propiedades anti-aterogénicas. Esto se debe a la actividad de CETP en el TRC, especialmente si la fuente original de colesterol es de la placa, pues la transferencia de EC de las HDL directamente a las LDL podría ser ateroprotector si las LDL son eliminadas de la circulación mediante el LDLR hepático¹⁵. Además, aunque algunos estudios afirman que una deficiencia en CETP está asociado con mayor longevidad y resistencia a la aterosclerosis, este hecho no ha sido consistentemente ratificado en estudios posteriores y, de hecho, algunos inhibidores de CETP no han conseguido disminuir el desarrollo de las ECV a pesar de elevar de forma significativa el cHDL¹⁴. Un ejemplo de ello son algunos inhibidores de CETP prometedores como el anacetrapib y evacetrapib, los cuales han conseguido aumentar el cHDL un 138 % y un 132 %, respectivamente, y disminuir el cLDL un 40% (por 100 mg). Sin embargo, aunque presentan una gran eficiencia en aumentar el cHDL en humanos, no hay una evidencia directa de que suponga un beneficio en relación al desarrollo de la aterosclerosis, lo que denota la necesidad de llevar a cabo ensayos clínicos más extensos, prolongados y con una mayor variedad de sujetos para determinar la eficacia y seguridad de estos inhibidores¹⁷.

2.5. Variantes genéticas de *CETP*

El cHDL se trata de un factor de riesgo muy a tener en cuenta en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y se ha demostrado que en humanos los niveles de cHDL están parcialmente determinados por factores genéticos¹⁸. De esta manera, el importante papel de CETP en la modulación de los niveles de cHDL ha motivado a numerosos estudios a analizar la asociación entre los polimorfismos de *CETP* y el riesgo de padecer ECV y/o algunas enfermedades como el síndrome metabólico o hipertensión.

Existen diversas mutaciones en el gen *CETP* que se han identificado como la causa de deficiencia de CETP y elevados niveles de cHDL. Esta deficiencia fue descrita en primer lugar en la hiperalfalipoproteinemia (HALP) japonesa¹⁹, y se identificaron dos variantes prevalentes, la mutación G>A en la posición +1 del intrón 14 (rs5742907) y la variante p. (Asp442Gly) en el exón 15. La homocigosis para la mutación p. (Asp442Gly) causa una deficiencia parcial de CETP y un incremento moderado del cHDL, mientras que los homocigotos para la rs5742907 presentaban una deficiencia completa de CETP que provocaba unos niveles extremadamente altos de cHDL⁸. Otros estudios también han revelado otras variantes como rs3764261, localizada en la región promotora, y rs708272 (c. 118 + 279 G>A), también conocida como Taq1B y localizada en la primera región intrónica, que se asocian con una actividad disminuida de CETP y están significativamente relacionadas con riesgo de dislipidemia aterogénicas²⁰.

Otra variante genética bastante común es la rs5882 del gen *CETP* (c.1264 A>G, p. Val422Ile), que implica la sustitución de una valina por una isoleucina produciendo un defecto de splicing del pre-mRNA, que se traduce en una menor expresión del gen *CETP* y menor actividad de la proteína, aunque se ha descrito como una variante benigna².

Por otra parte, también se han identificado polimorfismos relacionados con una mayor actividad de CETP como la variante rs1800777. Esta variante es un polimorfismo de nucleótido único (SNP) localizado en el exón 15 (c. 1403 G>A) que provoca la sustitución de una arginina por una glutamina en la posición 468 (p. Arg468Gln). Así pues, el alelo menor A de este SNP aparece con baja frecuencia en la población y está asociado a una mayor actividad de CETP, que provoca una caída de los valores de cHDL. Se ha demostrado, por tanto, que los individuos portadores del alelo A presentan una asociación inversa con los niveles de cHDL y una directa con los valores de TG, lo que produce un incremento en los valores de adiposidad y un mayor riesgo de ECV²¹.

Actualmente, se encuentran recogidas más de 23000 variantes en la base de datos Ensembl²², muchas de ellas sujeto de numerosos estudios para examinar sus características y prevalencia en la población y analizar la asociación con el riesgo de enfermedades cardiovasculares y de perfil lipídico.

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es identificar las variantes genéticas del gen *CETP*, que codifica para la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), en individuos con dislipemia de etiología desconocida, es decir, sujetos que presentan un perfil lipídico desfavorable, y analizar así la relación entre estas mutaciones y los niveles de cHDL de los sujetos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Selección de sujetos

Se seleccionaron sujetos no relacionados con valores de cHDL por encima del percentil 95 (n=59) y por debajo del percentil 5 (n= 37), estratificados por edad y sexo, provenientes de la Unidad clínica y de investigación en Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Miguel Servet, atendiendo a las indicaciones del estudio DRECE²³.

Tabla 1: Percentiles de la concentración de cHDL de la población española, por sexo y grupos de edad (valores en mg/dl) 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

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Índice de masa corporal (IMC) superior a 27,5 kg/m²
- Niveles de TG superiores a 200 mg/dl
- Estudio genético referente al metabolismo lipídico positivo
- Insuficiencia renal crónica (Tasa de filtración glomerular < 30 ml/min)
- Síndrome nefrótico
- Hipotiroidismo (Hormona tiroidea (TSH) > 6 mg/ml)
- Insuficiencia hepática (Alanina aminotransferasa (ALT) > 3 veces superior a lo normal)
- Colestasis (Bilirrubina directa > 2 mg/dl)
- Diabetes (Hemoglobina glicosilada (HbA1c) > 7 %)
- Consumo de alcohol > 40 gr/día
- Sujetos relacionados

4.2. Parámetros clínicos y antropométricos

Los sujetos seleccionados se sometieron a una exploración física básica, incluyendo medidas de altura, peso y perímetro de cintura calculando así el IMC que se expresa como el peso (en kg) entre el cuadrado de la altura (en metros). También se registró el sexo y se realizó una encuesta sobre antecedentes personales y familiares, como posibles diagnósticos de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico como la hipertensión arterial, diabetes o enfermedad cardiovascular.

4.3. Análisis bioquímico

La extracción de la sangre de los sujetos se realizó en condiciones estandarizadas entre las 8 y 10 de la mañana tras un ayuno nocturno (10-14 horas) y un reposo mínimo de 5 minutos. Las muestras se recogieron en tubos con EDTA y fueron sometidas a centrifugación para analizar el plasma posteriormente. Tanto la determinación de la concentración de colesterol total (CT) como la de triglicéridos totales (TGL) se llevaron a cabo mediante métodos enzimático-colorimétricos estandarizados, CHOD-PAP y GPO-PAP, respectivamente. El cHDL se determinó por precipitación de VLDL y LDL mediante ácido fosfotúngstico-Mg²⁺ y la determinación de colesterol en el sobrenadante mediante CHOD-PAP, modificando la relación muestra/reactivo (5% en lugar del 1% del CT), mientras que la concentración de cLDL se calculó empleando la fórmula de Friedwald (Sólo si la concentración de TG es menor a 400 mg/dL). Las apolipoproteínas Apo A1 y ApoB se determinaron por inmunonefelometría y la Lp(a) y la HbA1c por inmunoturbidimetría. Además, se realizaron ensayos fotométricos estandarizados para determinar la actividad enzimática de la transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) y la gamma glutamil transferasa (GGT). Por último, se determinó la glucemia por métodos enzimático-colorimétricos. Estos análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Bioquímica del Hospital Universitario Miguel Servet.

4.4. Obtención del DNA genómico

El DNA genómico de las muestras se aisló a partir de 10 ml de sangre periférica recogida en tubos con EDTA mediante el kit comercial Flexigene[®] DNA (Quiagen), de forma que las alícuotas con el material genético se almacenaron a -80°C en ultracongeladores (Sanyo). Posteriormente, este DNA fue analizado y se determinó la pureza y la concentración por espectrofotometría con un NanoDrop 1000 (ThermoScientific). Para determinar la concentración de DNA se midió la absorbancia a 260 nm, mientras que para evaluar la pureza y la calidad del extracto de DNA se midió la relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm, de forma que valores alrededor de 1,8 indican un extracto puro de DNA y valores alrededor de 2 sugieren contaminación de RNA. Posterior a ello, el DNA se diluyó con TE 0,1X hasta una concentración de 100 ng/μl. Este TE 0,1X fue preparado a partir de 1,211 g de Trizma[®] Base (Sigma-Aldrich) y 0,336 g de EDTA-Na₂ (Sigma-Aldrich) en 900 ml de agua, que se ajustó a pH=8 con HCl y se conservó a 4°C, tras lo cual se diluyó 10 veces para conservarse a -20°C. Este protocolo fue realizado por el servicio de genómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

4.5. Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores para la secuenciación de *CETP* se llevó a cabo mediante el programa Primer3²⁴ empleando como referencia la secuencia del gen *CETP* de la base de datos Ensembl²². El análisis de los cebadores diseñados se llevó a cabo con el programa OligoAnalyzer (V3.1)²⁵.

Cabe destacar que para diseñar los cebadores correctamente hay que tener en cuenta una serie de factores:

- La longitud de los cebadores debe ser entre 18 y 30 nucleótidos.
- La temperatura de Melting (TM) es propia de cada cebador en función de su longitud y su contenido en C y G, siendo muy importante que la diferencia entre el cebador directo y el reverso no sea mayor de 2-3°C.
- El porcentaje de C/G debe situarse entre el 50 y 60 % para garantizar una unión estable entre los cebadores y la secuencia de DNA.
- Se debe evitar varias C/G en el extremo 3' para no generar uniones no específicas con otras secuencias de DNA.
- Se debe evitar la formación de homodímeros que vienen dados por la complementariedad entre las bases del propio cebador, de forma que se forma una horquilla resultante del plegamiento del cebador sobre sí mismo.
- Por último, se debe evitar también la formación de heterodímeros, es decir, la formación de horquillas debido a la complementariedad entre el cebador directo y reverso, lo que disminuye la eficiencia del cebador.

En el caso del gen *CETP*, se organizó en 12 fracciones y se diseñaron las parejas de cebadores para cada fracción (Directo (F) y reverso (R)) (Tabla 2), generando secuencias de menos de 1000 pb para ser secuenciadas posteriormente mediante el método de Sanger.

Tabla 2: Características de los cebadores empleados para la amplificación y secuenciación del gen *CETP*

Fragmento	Cebador Directo 5'-3'	Cebador Reverso 5'-3'	Tm (°C)	Longitud del fragmento (bp)
1	TGCCCCGGAAGAGCCTCATG	ATGCAGCTAGGACCTTCTCAC	60	439
2	TCAGAGAGGCTGAGTCATGGC	AAGCCCCAGGCTGTTCTC	62	274
3	CTTCCACCCTCGCCTAGACA	CAGGATGGGCACGAGCAG	60	754
4	ATGGATGCACAGGACTGGTC	GCTCCCACTGCTGTCTTCTG	60	446
5	GCGGTGACTCAGGGCAATTC	AGCACAAAAAAGGACCAACTCC	60	217
6	TCCAATCTCCCTGAAGCTG	CCACCAAGTTTCCGAGTTTCC	60	357
7	CCTTGAAACTGCCCTTGGTC	ACAACCGAGTAGGAGCTGTG	60	275
8	CCCGGAGCCAGCTTTGTC	TTCCCCACCACCACCTC	60	297
9	TCCCGTGTATCCTTGCC	CGCCCTGTGCCTGACTCC	62	267
10	AGCAAATCTCAAGGGAATAGCA	ACCTGGTCCACATTCTTTGGT	58	312
11	TGGGGCAGGAAAACGAGTG	GGGCCAGGACCGCTAAGTA	60	346
12	GGTCCAAAAGGGTCTCAGCA	TGAAAAGAGGTGGACGGCAC	60	704

4.6. Amplificación por PCR del gen de estudio

Se llevó a cabo la PCR del DNA genómico extraído de cada paciente en un volumen total de 20 μ l, que incluía 1 μ l de las muestras de DNA (100 ng/ μ l) y 19 μ l de mix de PCR, compuesto por 13,5 μ l de H₂O (Meinsol inyectable) (4°C), 2 μ l de buffer (10X) (BioTaq® DNA polymerase BIO-21040, Meridian Bioscience) (4°C), 0,6 μ l de MgCl₂ (BioTaq® DNA polymerase BIO-21040, Meridian Bioscience) (4°C), 2 μ l de dNTPs (2mM) (4°C), 0,4 μ l de primer F (10 μ M) (-20 °C), 0,4 μ l de primer R (10 μ M) (-20°C) y 0,12 μ l de la enzima Taq polimerasa (BioTaq® DNA polymerase BIO-21040, Meridian Bioscience) (-20 °C).

La PCR se lleva a cabo en una placa Labcon de 96 pocillos en los que se añaden las mezclas de la reacción correspondientes a cada paciente. La placa es cerrada mediante el PCR seal para evitar la evaporación, se le da un spin y es llevada al termociclador (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems), en el que tienen lugar los programas específicos para la amplificación de cada fragmento del gen *CETP*, especificados en la Tabla 3.

Tabla 3: Programas de termociclador específicos empleados para la amplificación por PCR de cada fragmento del gen *CETP*

Fragmentos amplificados	Programa
FR1, FR3, FR4, FR5, FR6, FR7, FR8, FR11 y FR12	94°C 2' 95°C 40'' 60°C 30'' 72°C 30'' 72°C 7' 4°C ∞
FR2 y FR9	94°C 2' 95°C 40'' 62°C 30'' 72°C 30''

	72°C	7'	
	4°C	∞	
FR10	94°C	2'	} X 35
	95°C	40''	
	58°C	30''	
	72°C	30''	
	72°C	7'	
	4°C	∞	

Los productos de PCR son posteriormente comprobados mediante una electroforesis en gel de agarosa MS-8 (8065, Condalab) al 2 % Tae 1X teñido con 1,6 µl de SYBR® safe I nucleic acid gel stain (Invitrogen S33102). Tras obtener el gel solidificado, se prepara una mezcla de 2 µl de las muestras a analizar con 2 µl de xylene para cargar cada pocillo, se carga un control negativo de la misma manera y 1 µl en el primer pocillo de marcador de peso molecular Direct PCR 100bp low Ladder (D3687, Sigma-Aldrich).

Una vez cargadas las muestras, se corre la electroforesis en unas condiciones de 90 V, 400 mA y 30 minutos, tras los cuales se visualiza el gel en el programa Uviphoto bajo luz UV para comprobar que la PCR ha salido correctamente y los fragmentos de DNA han sido amplificados.

4.7. Purificación del producto de PCR mediante ExoSAP-IT

Los productos de PCR obtenidos son purificados mediante ExoSAP-IT® (78205.10.ML, ThermoFisher), para eliminar los primers que no han hibridado y los nucleótidos residuales. Para ello, se añaden 5 µl de los productos de PCR y 2 µl de ExoSAP diluida 1/10 en una placa Labcon y tras sellarla se introduce en el termociclador con un programa de 37 °C durante 40 minutos para que tenga lugar la degradación enzimática de los nucleótidos, posteriormente 15 minutos a 80 °C para inactivar el reactivo y se deja enfriar a 4 °C.

4.8. Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó en placas IBIAN protegidas de la luz en un volumen total de 10 µl. Para ello se añadieron 1,5 µl de la muestra de PCR purificada mediante la ExoSAP y 8,5 µl de mix. Se prepararon 2 mixes, uno para la reacción directa que será el mix F y otro para la reacción inversa que será el mix R. De esta manera, el mix está compuesto por 0,5 µl de Big Dye (Kit de secuenciación de ciclos BigDye® Terminator v3.1 4337457, Thermo Fisher) (-20°C), 1,75 µl de Buffer kit Big Dye (Kit de secuenciación de ciclos BigDye® Terminator v3.1 4337457, Thermo Fisher) (4°C), 4,75 µl de H₂O y 1,5 µl de los primers F/R (2,1 µM) para el mix F y el mix R respectivamente. La reacción se lleva a cabo en 2 placas separadas, con sus correspondientes mixes y una vez selladas se incuban en el termociclador con el programa especificado en la Tabla 4. Tras llevar a cabo la reacción de secuenciación, se continua con el protocolo de precipitación en el que se añaden 4 µl de EDTA a los 10 µl de la reacción de secuenciación, se le da un spin a la placa y se añaden 60 µl del reactivo de precipitación que consiste en un mix compuesto por 6,5 ml de EtOH al 96% (v/v), 0,75 ml de H₂O y 250 µl 3 M NaAc pH 5,2 (567422, Sigma Aldrich). Una vez añadido el reactivo de precipitación se mezcla

por inversión la placa y se incuba 15 minutos protegida de la luz. Tras cumplirse el tiempo, se centrifuga 30 minutos a 2090 G a 4°C y se quita la tapa de la placa para invertir la placa sobre el papel y eliminar el sobrenadante. Se centrifuga la placa invertida sobre papel durante 1 minuto a 180 G a 4°C, y se añaden 70 µl de EtOH 70% (v/v) tras lo cual se vuelve a mezclar por inversión la placa y se centrifuga 15 minutos a 2090 G a 4°C. Se repite la inversión de la placa para eliminar el sobrenadante y se centrifuga la placa invertida sobre papel 1 minuto a 180 G a 4°C. Continuando con el protocolo, se añaden 20 µl de Hi-Di formamida a cada pocillo para favorecer la desnaturalización del DNA, se tapa, se centrifuga unos segundos y se incuba a 94°C durante 2 minutos en el termociclador. Después de ese tiempo, se enfrían a 4°C lo antes posible y se almacenan en la nevera hasta que se envíen para secuenciar en el analizador genético 3500xL (4405633, Applied Biosystems) por electroforesis capilar, siguiendo el método de Sanger. Este último paso se realizó en el servicio de Secuenciación y genómica funcional del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

Tabla 4: Programa de termociclador empleado para la reacción de secuenciación del gen *CETP*

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

} X 25

4.9. Análisis bioinformático

Para identificar las variantes genéticas presentes en las muestras de los pacientes se empleó el programa Variant Reporter (Applied Biosystems) y una vez identificadas se evaluó la patogenicidad de estas mediante PredictSNP²⁶. Además, se analizaron las variantes genéticas en la base de datos gnomAD (v2.1.1)²⁷ para comparar las frecuencias alélicas de estos polimorfismos en la población general (europea, no finlandesa) respecto a nuestra muestra.

4.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa estadístico R Studio (v3.4.1), asumiendo unos niveles de significación de $p < 0,05$. Los datos de los parámetros clínicos y antropométricos de los pacientes recogidos con anterioridad se analizan estadísticamente relacionándolos con los niveles de cHDL calculando el *p-valor*. Por otra parte, para las variables cualitativas como el sexo, hipertensión arterial, diabetes y enfermedad cardiovascular primero se calcula el número y porcentaje de sujetos con dicha característica y a partir del estadístico Chi-cuadrado de Pearson se calcula el *p-valor*. A su vez, para las variables cuantitativas se hace, en primer lugar, la prueba Shapiro test para determinar si siguen una distribución normal (paramétrica) o no paramétrica, de forma que si $p > 0,05$ se considera normal y si $p < 0,05$ se considera no paramétrica. A continuación, para las variables paramétricas (cLDL) se calcula la media y la desviación estándar, de modo que el *p-valor* se obtiene a partir de la prueba t de Student, mientras que para las variables no paramétricas (IMC, TG, CT, cHDL, GGT, GPT, Apo A1, Apo B, Lp(a), glucosa y HbA1c) se calcula la mediana y los cuartiles 25 y 75, calculando el *p-valor* a partir de la prueba de Wilcoxon.

5. RESULTADOS

5.1. Características clínicas, bioquímicas y antropométricas

Las principales características clínicas, bioquímicas y antropométricas de ambos grupos estudiados (59 sujetos con concentración elevada de cHDL y 37 sujetos con concentración baja de cHDL) se presentan en la Tabla 5. En primer lugar, se puede observar que la mediana de edad del grupo con altos valores de cHDL es significativamente superior ($p < 0,001$), mientras que el IMC es significativamente inferior que el grupo con bajos niveles de cHDL ($p < 0,001$). En cuanto a los parámetros bioquímicos, se observan valores similares en las enzimas GGT, GPT, glucemia, la Apo B, mientras que la Apo A1 es significativamente mayor ($p < 0,001$) en el grupo con el cHDL alto. En relación al perfil lipídico de ambos grupos, las diferencias son significativas, observando niveles considerablemente mayores en el colesterol total, cHDL y cLDL en el grupo con altos niveles de cHDL, mientras que, por otra parte, los triglicéridos son superiores en el grupo con el cHDL bajo. Por último, cabe destacar que tanto el sexo como algunas patologías previas como la diabetes e hipertensión arterial no presentan una variación significativa, excepto por la enfermedad cardiovascular que es significativamente superior en los sujetos con niveles bajos de cHDL ($p = 0,004$).

Tabla 5: Características clínicas, bioquímicas y antropométricas en función de los niveles de cHDL

	Sujetos con altos niveles de cHDL (n=59)	Sujetos con bajos niveles de cHDL (n=37)	<i>p</i>
Edad, años	54,000 (46,500-61,000)	37,000 (26,000-55,000)	< 0,001
Hombres, n (%)	29,000 (49,150)	17,000 (46,000)	0,923
Índice de masa corporal, kg/m ²	24,070 (22,210-25,010)	25,510 (23,050-26,460)	< 0,001
Triglicéridos, mg/dL	83,000 (69,000-108,500)	101,000 (76,000-145,000)	0,037
Colesterol total, mg/dL	302,000 (267,500-324,000)	201,000 (167,000-261,000)	< 0,001
Colesterol HDL, mg/dL	92,000 (82,500-100,500)	33,000 (30,000-37,000)	< 0,001
Colesterol LDL, mg/dL	188,460 ± 41,400	150,640 ± 55,720	< 0,001
GGT, UI/L	22,000 (15,000-27,500)	17,000 (13,000-27,500)	0,244
GPT, UI/L	19,000 (16,500-25,000)	20,000 (14,500-28,500)	0,762
Apolipoproteína A1, mg/dL	215,000 (197,000-246,500)	110,000 (104,000-120,000)	< 0,001
Apolipoproteína B, mg/dL	126,500 (109,250-148,500)	106,000 (89,200-141,000)	0,056
Lipoproteína(a), mg/dL	29,000 (15,800-101,000)	24,200 (7,920-44,650)	0,106

Glucosa, mg/dL	89,000 (82,000-94,000)	85,000 (81,000-93,000)	0,662
Hemoglobina glicosilada, %	5,400 (5,200-5,575)	5,300 (5,075-5,600)	0,423
Hipertension, n (%)	7,000 (12,000)	4,000 (11,800)	1,000
Diabetes mellitus, n (%)	1,000 (1,700)	4,000 (10,800)	0,138
Enfermedad cardiovascular, n (%)	0,000(0,000)	6,000 (17,650)	0,004

5.2. Variantes del gen *CETP*

Se identificaron 28 polimorfismos en el gen *CETP* en los sujetos seleccionados, los cuales se encuentran recogidos junto a sus frecuencias alélicas y el análisis bioinformático en la Tabla 6. Cabe destacar que hay 3 variantes genéticas que no han sido descritas previamente. La primera de ellas es una sustitución de una guanina por una adenina en el exón 1 (c. 6 G>A), aunque no implica un cambio en la proteína (p. Leu2=), al igual que otra de las mutaciones localizada en el exón 5 (c. 477 C>T), que conserva un aspartato en la posición 159 (p. Aps159=). Ambas aparecen únicamente en el grupo con valores elevados de cHDL y son neutrales con un 93% y un 96% de probabilidad, respectivamente, según el análisis bioinformático. El último polimorfismo no descrito corresponde a una variante del intrón 3, que supone una sustitución de una timina por una citosina (c. 369-42 C>T) siendo neutral con un 88% de probabilidad.

En este sentido, se identificaron 17 variantes en regiones intrónicas que, por tanto, no conllevan el cambio de algún aminoácido de la proteína. De ellas, se espera que 2 sean deletéreas, es decir, mutaciones que aumentan la susceptibilidad de tener alterada la funcionalidad de *CETP*. La primera es la variante rs9930761, que se localiza en el intrón 8 y supone un cambio de una timina por una citosina (c. 751-51 T>C) presentando un 97% de probabilidad de ser patogénica, mientras que la segunda es la variante rs1800774 (c. 1215-14 C>T), que se encuentra en el intrón 12 y tiene una probabilidad del 91% según los análisis bioinformáticos. Cabe destacar que rs9930761 aparece únicamente en el grupo de sujetos con altos niveles de cHDL, mientras que rs1800774 presenta frecuencias alélicas bastante similares en ambos grupos. Otras variantes intrónicas se identificaron solamente en el grupo con concentraciones altas de cHDL, como la sustitución de una citosina por una timina en el intrón 6 (c. 598-70 C>T) y la sustitución de una adenina por una guanina en el intrón 10 (c. 981+46 A>G), que además aparece en mayor proporción respecto a la población europea, mientras que se encontraron algunas variantes solamente presentes en el grupo con bajo cHDL, como tres sustituciones de una citosina por una timina en las posiciones 982-67 (c. 982-67 C>T), 1214+48 (c. 1214+48 C>T) y 1249-56 (c. 1249-56 C>T) y una sustitución de una timina por una citosina en la posición 1321+55 (c. 1321+55 C>T), siendo estas dos últimas más prevalentes en nuestro estudio que en la población europea.

Se observan también 5 variantes cuyas frecuencias alélicas son significativamente diferentes entre los dos grupos de cHDL. 4 de ellas aparecen con mayor frecuencia en el grupo con valores elevados de cHDL que son c. 118+95 C>A, p. (Asp159=), c. 658+8 C>T, c. 930+29 G>A, mientras que solamente la variante c. 982-67 C>T aparece con mayor frecuencia en el grupo con baja concentración de cHDL.

Por otra parte, la secuenciación del DNA codificante de *CETP* ha permitido identificar 5 variantes exónicas a parte de los dos polimorfismos no descritos con anterioridad, de las cuáles ninguna se predice que puedan tener efectos patogénicos. De estas variantes, la única que no conlleva un cambio de aminoácido es la sustitución de una citosina por una timina en la posición 861 del exón 9 (c. 861 C>T), que mantiene la fenilalanina en la posición 287 (p. (Phe287=)) y junto con la variante del exón 1 (c. 44 C>G) que supone la sustitución de una alanina por una glicina en la posición 15 (p. (Ala15Gly)), son las únicas presentes exclusivamente en los sujetos con valores altos de cHDL. Los tres polimorfismos restantes se encuentran en las regiones codificantes de los exones 12, 14 y 15 y conllevan un cambio en algún aminoácido de la proteína. La variante encontrada en el exón 12 implica la sustitución de una guanina por una citosina (c. 1168 G>C) que provoca el cambio de la alanina en posición 390 por una prolina (p. (Ala390Pro)), la del exón 14 (c. 1264 G>A) supone la sustitución de una valina por una isoleucina en la posición 422 (p. (Val422Ile)) y la variante del exón 15 (c. 1403 G>A) conlleva el remplazo de la arginina en la posición 468 por una glutamina (p. (Arg468Gln)). Estas variantes aparecen en los dos grupos de sujetos, con frecuencias alélicas bastante similares, a excepción de la p. (Ala390Pro) en la que se aprecia menor frecuencia en el grupo con altos niveles de cHDL, siendo significativamente inferiores respecto a la población general.

Se encontró también una variante en la región promotora (5'-UTR) de *CETP* presente únicamente en los sujetos con niveles altos de cHDL, en la que se sustituye una guanina por una adenina en la posición -65 (c. -65 G>A). Según los análisis bioinformáticos se predice neutral con una probabilidad del 77 % y aparece en mayor proporción en la población de nuestro estudio. Por último, tres variantes neutrales en la región 3'-UTR fueron identificadas. La sustitución de una citosina por una guanina (c. *184 C>G) y dos sustituciones de una guanina por una adenina (c. *84 G>A) y (c. * 219 G>A).

Tabla 6: Frecuencias alélicas y análisis bioinformático de las variantes de *CETP* en sujetos con niveles extremos de cHDL

Variante	Localización	Cambio de nucleótido	Cambio de proteína	Análisis bioinformático	Frecuencia alélica en nuestro estudio y en la base de datos gnomAD					
					PredictSNP2 ²⁶ (probabilidad)	Sujetos con altos niveles de cHDL	Sujetos con bajos niveles de cHDL	gnomAD ²⁷	P cHDL alto vs cHDL bajo	P cHDL alto vs gnomAD
rs17231520	5'-UTR	c.- 65 G>A	-	Neutral 77%	0,009	< 0,001	< 0,001	0,427	0,002	0,816
No descrita previamente	Exón 1	c. 6 G>A	p. (Leu2=)	Neutral 93%	0,009	< 0,001	NR	0,427	NA	NA
rs34065661	Exón 1	c. 44 C>G	p. (Ala15Gly)	Neutral 89%	0,009	< 0,001	< 0,001	0,427	0,003	0,812
rs17231534	Intrón 1	c. 118+95 C>A	-	Neutral 88%	0,042	0,027	0,043	0,581	0,986	0,505
rs3816117	Intrón 1	c. 118+149 T>C	-	Neutral 88%	0,534	0,284	0,492	< 0,001	0,362	< 0,001
No descrita previamente	Intrón 3	c. 369-42 T>C	-	Neutral 88%	0,034	0,081	NR	0,152	NA	NA
rs891141	Intrón 4	c. 440-103 G>T	-	Neutral 88%	0,983	0,987	0,999	0,738	< 0,001	0,005
No descrita previamente	Exón 5	c. 477 C>T	p. (Asp159=)	Neutral 96%	0,051	< 0,001	NR	0,049	NA	NA
rs34523084	Intrón 6	c. 598-70 C>T	-	Neutral 88%	0,017	< 0,001	0,006	0,260	0,126	0,503
rs1532625	Intrón 7	c. 658+8 C>T	-	Neutral 73%	0,466	0,203	0,442	< 0,001	0,594	< 0,001
rs9930761	Intrón 8	c. 751-51 T>C	-	Deletérea 97%	0,034	< 0,001	0,063	0,110	0,195	0,026
rs5883	Exon 9	c. 861 C>T	p. (Phe287=)	Neutral 96%	0,042	< 0,001	0,053	0,073	0,597	0,041
rs11076176	Intrón 9	c. 930+24 T>G	-	Neutral 88%	0,119	0,270	0,170	0,007	0,139	0,022
rs289714	Intrón 9	c. 930+29 G>A	-	Neutral 88%	0,881	0,716	0,821	0,004	< 0,001	< 0,001
rs373372651	Intrón 10	c. 981+46 A>G	-	Neutral 88%	0,009	< 0,001	< 0,001	0,427	< 0,001	0,931
rs891144	Intrón 10	c. 982-67 C>T	-	Neutral 88%	< 0,001	0,041	0,010	0,028	0,269	0,010
rs5880	Exón 12	c. 1168 G>C	p. (Ala390Pro)	Neutral 67%	0,025	0,041	0,050	0,559	0,022	0,071
rs538211709	Intrón 11	c. 1214+48 C>T	-	Neutral 74%	< 0,001	0,014	< 0,001	0,206	0,926	< 0,001
rs7195984	Intrón 12	c. 1215-96 G>A	-	Neutral 88%	1,000	1,000	0,999	1,000	0,771	0,817

rs1800774	Intrón 12	c. 1215-14 C>T	-	Deletérea 91%	0,300	0,311	0,363	0,835	0,132	0,348
rs191023682	Intrón 13	c. 1249-56 C>T	-	Neutral 74%	< 0,001	0,014	< 0,001	0,206	0,953	< 0,001
rs5882	Exón 14	c. 1264 G>A	p. (Val422Ile)	Neutral 89%	0,670	0,730	0,683	0,379	0,758	0,385
rs369522108	Intrón 14	c. 1321+55 T>C	-	Neutral 88%	< 0,001	0,014	< 0,001	0,206	0,771	< 0,001
rs1800777	Exón 15	c. 1403 G>A	p. (Arg468Gln)	Neutral 89%	0,025	0,068	0,036	0,155	0,542	0,143
rs289741	Intrón 15	c. 1408-30 G>A	-	Neutral 77%	0,670	0,770	0,698	0,135	0,507	0,173
rs1801706	3' UTR	c. *84 G>A	-	Neutral 88%	0,220	0,122	0,176	0,085	0,205	0,220
rs289742	3' UTR	c. *184 C>G	-	Neutral 88%	0,907	0,905	0,875	0,975	0,297	0,430
rs289743	3' UTR	c. *219 G>A	-	Neutral 88%	0,670	0,770	0,699	0,135	0,494	0,178

NR: No reportada

PredictSNP2²⁶ uses CADD, DANN, FATHMM y Funs eq2 as predictors.

6. DISCUSIÓN

Numerosos estudios han demostrado que las ECV son causadas por múltiples factores tanto ambientales como genéticos²⁸. La concentración alta de las LDL se ha descrito como uno de los principales factores de riesgo de desarrollo de la aterosclerosis, ya que la modificación y oxidación de estas lipoproteínas provoca su acumulación y deriva en un proceso inflamatorio excesivo en el que los macrófagos en un intento de eliminarlas de la circulación intensifican el problema formándose la placa aterosclerótica. Por otra parte, las HDL poseen propiedades anti-aterogénicas y se correlacionan inversamente con el riesgo de padecer ECV debido a su papel en el TRC, aunque los análisis de grandes estudios epidemiológicos muestran que los niveles plasmáticos excesivamente altos de cHDL se asocian también con un mayor riesgo cardiovascular²⁹.

CETP desempeña un rol crucial en el metabolismo de las lipoproteínas al ser el encargado de mediar la ruta indirecta del TRC en el que se produce el intercambio de EC y TG entre las HDL y las LDL (ApoB lipoproteínas) para facilitar el retorno del exceso de colesterol de los tejidos periféricos al hígado vía LDLR y su excreción a la bilis. Por este motivo, la finalidad de este estudio es identificar variantes del gen *CETP* en sujetos con valores extremos de cHDL de etiología desconocida.

El análisis de las características clínicas, bioquímicas y antropométricas muestra diferencias significativas en función de los niveles de cHDL de los sujetos. Se observa que los individuos con niveles bajos de cHDL presentan niveles altos de triglicéridos, es decir, se produce un desequilibrio en el perfil lipídico de estos sujetos. Algunos estudios han demostrado una relación inversa entre los niveles de cHDL y triglicéridos, debido a que los triglicéridos pueden afectar negativamente al metabolismo del cHDL³⁰. Esta asociación es conocida como dislipidemia aterogénica y es un trastorno lipídico bastante común relacionado con un mayor riesgo de padecer ECV y que está presente en una gran variedad de trastornos crónicos como la obesidad o el sobrepeso³¹. Este hecho se demuestra claramente en nuestro estudio, ya que, a pesar de que los sujetos con bajos niveles de cHDL presentan concentraciones inferiores de cLDL y CT, se observan niveles significativamente superiores de IMC ($p < 0,001$) y ECV ($p = 0,004$), lo que evidencia el papel de las HDL como factor de protección vascular. Además, también se observan niveles significativamente superiores de Apo A1 en el grupo con altos niveles de cHDL ($p < 0,001$), lo cual cabría de esperar ya que la Apo A1 junto con la Apo A2, constituyen las principales apolipoproteínas que conforman las HDL.

Estas diferencias entre ambos grupos también están presentes en el análisis de las variantes genéticas del gen *CETP*. De hecho, 12 de los 28 polimorfismos identificados se encontraron exclusivamente en alguno de los grupos, 8 en los sujetos con concentración elevada de cHDL y 4 en los sujetos con concentraciones bajas de cHDL. En el grupo con alto cHDL, encontramos la variante de la región promotora c. -65 G>A, las variantes intrónicas c. 598-70 C>T, c. 981+46 A>G y c. 751-51 T>C y las variantes exónicas p. (Leu2=), p. (Ala15Gly), p. (Asp159=) y p. (Phe287=), mientras que en el grupo con bajo cHDL encontramos únicamente las variantes intrónicas c. 982-67 C>T, c. 1214+48 C>T, c. 1249-56 C>T y c. 1321+55 T>C. Así pues, también se observan diferencias significativas en las frecuencias alélicas de algunos polimorfismos entre los dos grupos de cHDL. 4 variantes aparecen con mayor frecuencia en el grupo con valores elevados de cHDL (rs3816117, rs1532625, p. (Asp159=) y rs289714) y una variante

(rs891144) aparece con mayor frecuencia en el grupo con baja concentración de cHDL, lo que evidencia la asociación entre el perfil lipídico de los sujetos y las variantes de *CETP*.

Por otra parte, existen diferencias entre las frecuencias alélicas de algunas variantes genéticas en nuestro estudio respecto a la población general europea. Entre ellas podemos destacar la variante rs891141 (c. 440-103 G>T) y rs289714 (c. 930+29 G>A), que presentan diferencias significativas en ambos grupos. La variante rs891141 aparecen en menor proporción en ambos grupos, mientras que la variante rs289714 aparece con mayor frecuencia en el grupo con alto cHDL y con menor frecuencia en el grupo de sujetos con bajo cHDL en relación a la población general europea. Esta última variante aparece con bastante frecuencia en la población general y se ha visto que los hombres con el alelo G presentan valores de IMC superiores a los que presentan el genotipo AA y en las mujeres el alelo G se asocia con menores niveles de cHDL³², lo cual se observa en los resultados de nuestro estudio y sugiere que este polimorfismo puede estar implicado en un mayor riesgo de padecer ECV.

Atendiendo a los polimorfismos en la región codificante de *CETP*, destacamos la variante rs1800777 (p. (Arg468Gln)) que se localiza en el sitio de unión de los lípidos de *CETP* pudiendo provocar una pérdida de carga positiva que altera la eficiencia de la unión de *CETP* a los EC. Algunos estudios previos relacionan esta variante con una mayor adiposidad y niveles inferiores de cHDL³³, aunque en nuestro estudio las frecuencias alélicas no muestran diferencias significativas entre ambos grupos. La variante rs5883 (p. (Phe287=)) no implica cambio en algún aminoácido pero tiene potencial de impacto en el proceso de splicing, ya que el alelo menor T interrumpe un sitio potenciador del empalme exónico y se predice que puede alterar el plegamiento del mRNA a lo largo del exón³⁴. Así pues, se observó que rs5883 está asociada con niveles mayores de cHDL, que aunque normalmente se consideren protectores, en este caso se asocia con posibles trastornos en pacientes de riesgo cardiovascular, quizás porque el papel de *CETP* más allá del metabolismo lipídico, como indirectamente en procesos antiinflamatorios, se puede ver afectado³⁴. En nuestro estudio, rs5883 aparece exclusivamente en el grupo con altos niveles de cHDL, sin embargo, los análisis bioinformáticos no predicen efectos patogénicos, sino que se considera una variante neutral con un 96% de probabilidad. El polimorfismo rs5882 (p. (Val422Ile)) se ha sugerido que también pueda afectar a la función de *CETP*, aunque todavía no existen suficientes evidencias³⁴.

En cuanto a las variantes identificadas en las regiones reguladoras, destacamos por una parte la variante rs17231520 (c. -65 G>A) de la región 5'-UTR, donde se encuentra la región promotora y es fundamental en la regulación e iniciación de la transcripción, y las variantes rs1801706 (c. *84 G>A), rs289742 (c. *184 C>G) y rs289743 (c. *219 G>A), de la región 3'-UTR, implicada en la eficiencia de la traducción y la estabilidad del mRNA. La variante rs17231520 se ha relacionado con una sobreexpresión de *CETP* e hipoalfalipoproteinemia, aumentando el riesgo de una aterosclerosis prematura³⁴, sin embargo, en nuestro estudio aparece únicamente en un sujeto con alta concentración de cHDL. En este sentido, en otro estudio realizado en sujetos afroamericanos, se asoció esta variante genética con concentraciones elevadas de cHDL. En este estudio, el efecto estimado de esta variante genética fue de 7,81 mg/dl (IC del 95%: 6,58 a 9,03) por alelo A³⁵. Por otra parte, en la región 3'-UTR destaca la variante rs1801706 (c. *84 G>A), que se ha asociado significativamente en algunas poblaciones con la ECV. Al encontrarse en la región UTR se sugiere que puede aumentar la expresión del mRNA de *CETP*, traduciéndose en un descenso de la concentración de cHDL y un aumento de la concentración de cLDL³³, aunque en nuestro estudio esta variante aparece con más frecuencia en los sujetos con alto cHDL.

Cabe destacar que de todos los polimorfismos encontrados, solamente 2 variantes intrónicas se predicen como patogénicas. La variante rs9930761 (c. 751-51 T>C), en la que el alelo menor C interrumpe un importante punto de empalme en el sito de ramificación del intrón 8 y se ha observado una asociación significativa con las HDL y la ECV³⁶ y la variante rs1800774 (c. 1215-14 C>T) también altamente asociada con antecedentes de infarto de miocardio aunque no se ha relacionado con el cHDL³⁷.

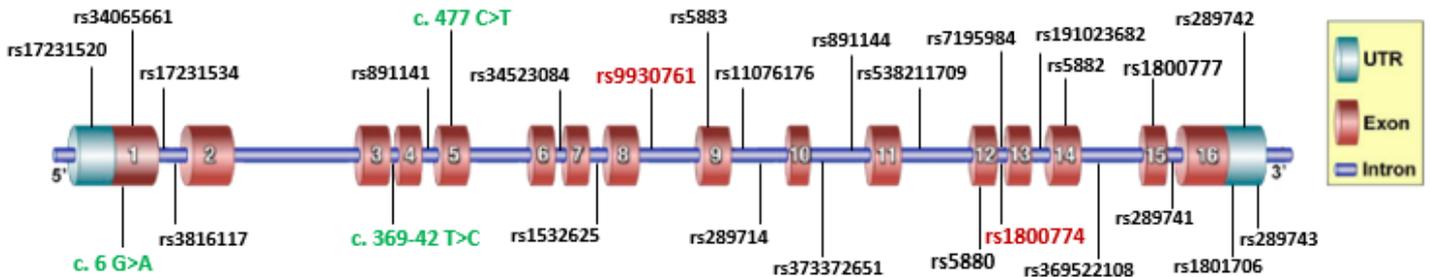


Figura 7: Variantes identificadas y su localización en el gen *CETP*. En rojo las variantes predichas como deletéreas y en verde las variantes no descritas previamente. Modificado de Ganesan et al., 2016

Por último, se identificaron 3 variantes no descritas previamente, de las cuáles dos (c. 6 G>A y c. 477 C>T) se encontraron exclusivamente en el grupo con altos niveles de cHDL y según los análisis bioinformáticos se predicen neutrales, por lo que podrían comportarse como factor ateroprotector y tener relevancia clínica, aunque habría que realizar estudios de funcionabilidad de estas variantes genéticas para poder conocer su papel en el metabolismo lipídico y por ende en el desarrollo de procesos aterogénicos.

7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

7.1. CONCLUSIONES

- El análisis de los parámetros clínicos, bioquímicos y antropométricos muestra que los sujetos con concentración elevada de cHDL presentan menores niveles de triglicéridos, IMC y menor prevalencia de enfermedad cardiovascular que los sujetos con bajas concentraciones de cHDL, lo que denota el papel ateroprotector del cHDL.
- Se reportaron 28 variantes genéticas del gen *CETP* en los sujetos seleccionados con valores extremos de cHDL, 17 se encontraron en la región intrónica, 7 en la región codificante y 4 en regiones UTR. Además, se identificaron 3 polimorfismos no descritos previamente (c. 6 G>A, c. 369-42 T>C y p. (Asp159=)).
- Los análisis bioinformáticos predicen efectos patogénicos de la variante rs9930761 (c. 751-51 T>C) localizada en el intrón 8 y la variante rs1800774 (c. 1215-14 C>T) localizada en el intrón 12.
- Se identificaron 8 variantes presentes exclusivamente en el grupo con valores elevados de cHDL y 4 variantes en el grupo con valores bajos de cHDL, de modo que los

resultados muestran una estrecha relación entre el perfil lipídico de los sujetos y las variantes genéticas de *CETP*.

- Se encontraron diferencias entre las frecuencias alélicas de las variantes identificadas en los sujetos con valores extremos de cHDL de nuestro estudio y la población general europea de gnomAD.
- Sería necesario llevar a cabo estudios de funcionalidad para comprender el papel de las variantes genéticas no descritas previamente en el metabolismo lipoproteico.

7.2. CONCLUSIONS

- Analysis of the clinical, biochemical and anthropometric parameters show that subjects with high levels of HDLc present lower levels of triglycerides, IMC and lower prevalence of cardiovascular disease than subjects with low concentrations of HDLc, which evidence the ateroprotector role of HDLc.
- 28 genetics variants of *CETP* gene have been reported in the selected subjects with extreme levels of HDLc, 17 were found in the intronic region, 7 in the coding sequence and 4 in the UTR region. Besides, 3 polymorphisms not reported previously were identified (c. 6 G>A, c. 369-42 T>C y p. (Asp159=)).
- Bioinformatic analysis predict pathogenic effects of the variant rs9930761 (c. 751-51 T>C) located in intron 8 and variant rs1800774 (c. 1215-14 C>T) located in intron 12.
- 8 variants were identified exclusively in the group with high levels of HDLc and 4 variants were found in the group with low levels of HDLc, so results show a high association between the lipid profile of the subjects and the variants of *CETP*.
- Differences between the alleles frequency of the variants identified in subjects with extreme levels of HDLc of our study and the general European population of gnomAD were found.
- It would be necessary to carry out functionality studies to understand the role of no previously described genetic variants in the lipoprotein metabolism.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Teo, K. K. & Rafiq, T. Cardiovascular Risk Factors and Prevention: A Perspective From Developing Countries. *Canadian Journal of Cardiology* vol. 37 733–743 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2021.02.009> (2021).
2. Ruiz Iruela, C. *INFLUENCIA DE VARIANTES GENÉTICAS EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON ESTATINAS. ESTUDIO PROSPECTIVO Y MULTICÉNTRICO TESIS DOCTORAL*. (2020).

3. Guo, S. *et al.* Association between eight functional polymorphisms and haplotypes in the cholesterol ester transfer protein (CETP) gene and dyslipidemia in national minority adults in the far west region of China. *Int J Environ Res Public Health* **12**, 15979–15992 (2015).
4. Zhang, S. *et al.* Natural products: The role and mechanism in low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Phytotherapy Research* vol. 35 2945–2967 Preprint at <https://doi.org/10.1002/ptr.7002> (2021).
5. Colombo, G. I. *et al.* The association between hdl-c and subclinical atherosclerosis depends on cetp plasma concentration: Insights from the improve study. *Biomedicines* **9**, (2021).
6. Ouimet, M., Barrett, T. J. & Fisher, E. A. HDL and reverse cholesterol transport: Basic mechanisms and their roles in vascular health and disease. *Circ Res* **124**, 1505–1518 (2019).
7. A. Riggs, K. & Rohatgi, A. HDL and Reverse Cholesterol Transport Biomarkers. *Methodist Debaquey Cardiovasc J* **15**, (2019).
8. Ohtani, R. *et al.* Novel mutations of cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects. *Clinica Chimica Acta* **413**, 537–543 (2012).
9. Qiu, X. *et al.* Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 106–113 (2007).
10. Iwanicka, J. *et al.* Relationship between CETP gene polymorphisms with coronary artery disease in Polish population. *Mol Biol Rep* **45**, 1929–1935 (2018).
11. Tall, A. R. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* **34**, 1255–1274 (1993).
12. Barter, P. J. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein: A novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 23 160–167 Preprint at <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000054658.91146.64> (2003).
13. Brandan, N., Llanos, C., Barrios, B. I., Escalante Marassi, A. P. & Ruíz Díaz, D. A. N. Lipoproteínas. *Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina, Cátedra de Bioquímica* (2006).
14. Brunham, L. R. & Hayden, M. R. Human genetics of HDL: Insight into particle metabolism and function. *Progress in Lipid Research* vol. 58 14–25 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.01.001> (2015).
15. Charles, M. A. & Kane, J. P. New molecular insights into CETP structure and function: A review. *Journal of Lipid Research* vol. 53 1451–1458 Preprint at <https://doi.org/10.1194/jlr.R027011> (2012).
16. Klerkx, A. H. E. M. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 26 706–715 Preprint at <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000205595.19612.c9> (2006).

17. Mabuchi, H., Nohara, A. & Inazu, A. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency and CETP inhibitors. *Molecules and Cells* vol. 37 777–784 Preprint at <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0265> (2014).
18. Lee, C. J. *et al.* CETP, LIPC, and SCARB1 variants in individuals with extremely high high-density lipoprotein-cholesterol levels. *Sci Rep* **9**, (2019).
19. Koizumi, J. *et al.* Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinaemia. *Atherosclerosis* **58**, 175–186 (1985).
20. Srisawasdi, P. *et al.* Association of CETP gene variants with atherogenic dyslipidemia among thai patients treated with statin. *Pharmgenomics Pers Med* **14**, 1–13 (2021).
21. de Luis, D. *et al.* Association of a cholesteryl ester transfer protein variant (rs1800777) with fat mass, HDL cholesterol levels, and metabolic syndrome. *Endocrinol Diabetes Nutr* **65**, 387–393 (2018).
22. Howe, K. L. *et al.* Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res* **49**, D884–D891 (2021).
23. Gómez-Gerique, J. A. *et al.* Perfil lipídico de la población española: estudio DRECE (Dieta y Riesgo de Enfermedad Cardiovascular en España). *Med Clin (Barc)* **113**, 730–735 (1999).
24. Untergasser, A. *et al.* Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**, (2012).
25. OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT [Internet]. [cited 2023 May 28]. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>.
26. *PredictSNP2: A unified platform for accurately evaluating SNP effects by exploiting the different characteristics of variants in distinct genomic regions User guide: A Unified Platform for Accurately Evaluating SNP Effects by Exploiting the Different Characteristics of Variants in Distinct Genomic Regions. PLOS Computational Biology* **12**: e1004962. (2011).
27. Karczewski, K. J. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* **581**, 434–443 (2020).
28. Wang, Q. Molecular genetics of coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* **20**, (2005).
29. Trimarco, V. *et al.* High HDL (High-Density Lipoprotein) Cholesterol Increases Cardiovascular Risk in Hypertensive Patients. *Hypertension* **79**, 2355–2363 (2022).
30. Dron, J. S. & Hegele, R. A. Genetics of Triglycerides and the Risk of Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0667-9> (2017).
31. Castañer, O. *et al.* Remnant Cholesterol, Not LDL Cholesterol, Is Associated With Incident Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* **76**, 2712–2724 (2020).
32. Gömleksiz, Ö. K., Karaali, Z., Bugra, Z., Öztürk, O. & Aydoğan, H. Y. Investigation of metabolic effects of CETP gene rs289714 in coronary artery patients: A case-control study. *Turk Kardiyoloji Dernegi Arsivi* **48**, 673682 (2020).

33. Ganesan, M. *et al.* C.*84G>A mutation in CETP is associated with coronary artery disease in South Indians. *PLoS One* **11**, (2016).
34. Papp, A. C. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein (CETP) polymorphisms affect mRNA splicing, HDL levels, and sex-dependent cardiovascular risk. *PLoS One* **7**, (2012).
35. Buyske, S. *et al.* Evaluation of the metabochip genotyping array in african americans and implications for fine mapping of gwas-identified loci: The PAGE study. *PLoS One* **7**, (2012).
36. Papp, A. C. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein (CETP) polymorphisms affect mRNA splicing, HDL levels, and sex-dependent cardiovascular risk. *PLoS One* **7**, (2012).
37. Thompson, J. F., Durham, L. K., Lira, M. E., Shear, C. & Milos, P. M. CETP polymorphisms associated with HDL cholesterol may differ from those associated with cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **181**, 45–53 (2005).