Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

Supplementary material

LRP1 Gene Polymorphisms Are Associated With Premature Risk of Cardiovascular Disease in Patients With Familial Hypercholesterolemia

Rosa Aledo, [a-c] Rodrigo Alonso, [d] Pedro Mata, [d] Vicenta Llorente-Cortés, [b] Teresa Padró, [b] and Lina Badimon [a-c,*]

[a] *CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain*

[b] *Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain*

[c] *Instituto de Investigación Biomédica Sant Pau (IIB-Sant Pau), Barcelona, Spain*

[d] *Clínica de Lípidos, Departamento de Medicina Interna, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain*

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

MÉTODOS

Diseño del estudio SAFEHEART y enfermedad cardiovascular en hipercolesterolemia familiar

El estudio se diseñó para profundizar en los factores pronósticos y en los mecanismos que influyen en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (ECV) y su mortalidad y especialmente de la cardiopatía coronaria en población con hipercolesterolemia familiar heterocigótica (HFh) bien definida[1]. Para ello se desarrolló un sistema activo de vigilancia epidemiológica para la detección de los eventos cardiovasculares según los criterios de clasificación WHO-MONICA[2]. Se preguntó a los pacientes por el antecedente de ECV y se solicitó informe médico de alta hospitalaria del evento. Mediante un seguimiento por contacto telefónico anual o cumplimentación de un cuestionario en una página *web* segura y una visita presencial cada 4 años, se actualizan los datos de cada paciente respecto a la aparición de eventos cardiovasculares, principalmente.

La ECV prematura (ECVp) se definió según tuviera lugar uno de los siguientes eventos antes de los 55 años de edad (varones) o antes de los 65 (mujeres): *a)* infarto de miocardio (confirmado por al menos dos de los siguientes síntomas clásicos: > 15 min, cambios específicos en el electrocardiograma, enzimas cardiacas elevadas más de 2 veces el límite superior de normalidad); *b)* angina de pecho (diagnosticada como síntomas clásicos en combinación con al menos un resultado inequívoco de uno de los siguientes tests: ejercicio físico, gammagrafía de perfusión, ecografía de estrés con dobutamina y estenosis > 70% en un angiograma coronario); *c) bypass* coronario o angioplastia; *d)* ictus diagnosticado por síntomas clásicos de alteración motora y/o prueba de imagen positiva (tomografía computarizada o resonancia magnética craneal), y *e)* evento vascular periférico diagnosticado por síntomas de claudicación intermitente en extremidades inferiores y/o prueba de imagen positiva para aterosclerosis periférica significativa o presencia de aneurisma de aorta abdominal.

Análisis bioquímicos, clínicos y antropométricos

De cada paciente se obtuvieron muestras de sangre en ayunas que se utilizaron para realizar los análisis bioquímicos en suero y plasma y la obtención del ADN. Las concentraciones de glucosa, colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y triglicéridos se determinaron mediante métodos enzimáticos estándares y los de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), mediante la fórmula de Friedewald. La concentración de las apolipoproteínas (Apo) A y B se determinaron mediante inmunoturbidometría.

Las características demográficas y clínicas que se recogieron de cada individuo son edad, sexo, historia clínica centrada en ECV, antecedentes de factores de riesgo cardiovascular clásicos (hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, tabaquismo), examen físico, tratamiento antilipemiante actual y otros factores de riesgo. Se consideró fumador al sujeto que fumaba más de 3 cigarrillos diarios durante al menos los

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

últimos 5 años. El examen físico incluyó la determinación de peso (en kg), talla (en cm), índice de masa corporal (IMC) y perímetro de cintura (en cm). La presión sanguínea se midió por duplicado en decúbito supino con un esfigmomanómetro Omron MX3. Se consideró hipertensión que la presión sistólica fuera > 140 mmHg y la diastólica > 90 mmHg.

Análisis de las mutaciones del gen *LDLR* en los pacientes con hipercolesterolemia familiar heterocigótica

El análisis de las mutaciones en el gen *LDLR* se ha venido realizando desde 2004 mediante *microchip* (Lipochip®, Progenika Biopharma; Derio, España). Para la clasificación de la actividad del LDLR mutado, se ha tenido en cuenta la información conocida de ensayos *in vitro* con cultivos celulares de pacientes con mutación homocigótica (actividad residual del LDLR < 5% para receptor nulo y > 5% para receptor defectuoso)[3] y los estudios bioinformáticos del cambio estructural o funcional recogidos en la base de datos (http://www.ucl.ac.uk/ldlr/LOVDv.1.1.0) y hallados en la búsqueda bibliográfica[4,5]. Las mutaciones del LDLR se han clasificado como de alelo nulo, de actividad deficiente y de actividad indeterminada. Las mutaciones de receptor nulo incluyen mutaciones que causan codones de parada, algunas mutaciones de cambio de aminoácido que afectan a la quinta repetición rica en cisteínas del dominio de unión a ligando del LDLR (LR5), pequeñas deleciones o inserciones que causan un cambio en la pauta de lectura y codones de parada prematuros, así como grandes reordenaciones génicas. Las mutaciones del receptor con actividad deficiente incluyen las demás mutaciones puntuales y pequeñas deleciones e inserciones que conservan la pauta de lectura. Las mutaciones sin efecto funcional validado se clasificaron como indeterminadas. En la tabla 1 se especifican las mutaciones observadas en los pacientes estudiados.

Cribado de polimorfismos del promotor del LRP1

A partir de ADN genómico, se amplificó parte de la secuencia promotora y del inicio de la secuencia codificante del gen *LRP1* (de –1279 pb a +408 pb, considerando +1 el inicio de transcripción) en fragmentos solapados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de PCR se analizaron mediante polimorfismos de conformación de cadena sencilla del ADN (SSCP) en geles de poliacrilamida al 12% y tinción con plata. Los patrones de SSCP diferentes se analizaron mediante secuenciación para confirmar los resultados. Las condiciones de amplificación y los SSCP se especifican en la tabla 2. La funcionalidad de los polimorfismos hallados se analizó *in silico* mediante SNPeffect[6].

Genotipificación del polimorfismo rs1799986 en población control española y con hipercolesterolemia familiar heterocigótica

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

Se analizó el polimorfismo en una muestra de individuos controles de población española procedente del Banco Genoma España y de controles no relacionados con los sujetos índice, un total de 256 individuos (el 53% varones y el 47% mujeres; media de edad, 40,7 ± 11,4 y 40 ± 12,2 años respectivamente). Se realizó la genotipificación mediante Taqman-PCR y discriminación alélica en un aparato Applied Biosystem 7900.

Asimismo, se analizó dicho polimorfismo en la población con HFh ampliada a 648 sujetos (515 sin ECV y 133 con ECVp). Las características de dicha muestra se detallan en la tabla 3.

Análisis estadístico

Se comprobó que la distribución de los genotipos cumplía con la ley de Hardy-Weinberg mediante prueba de la •^{2}, y se utilizaron pruebas multivariables basadas en regresión logística para el análisis de asociación con la enfermedad, al igual que para el análisis de interacción entre el tipo de mutación del receptor clásico de LDL con el polimorfismo rs1799986 en la HFh.

Análisis funcional del polimorfismo c.677C>T (rs1799986)

La predicción de un efecto funcional del polimorfismo se realizó mediante el programa SNPeffect[6] y se analizó su implicación en alteraciones del procesamiento del ARNm derivadas de la pérdida de secuencias *exon sequences enhancer* (ESE) (ESE finder[7] disponible en: http://rulai.cshl.edu/tools/ESE). A continuación se analizó dicha predicción mediante análisis de *minigen*-reportero[8]. Para ello, se amplificaron el exón 3 y las secuencias flanqueantes del gen *LRP1*, a partir de ADN genómico, utilizando cebadores de PCR con dianas de enzimas de restricción, cebador con diana EcoRI 5'-ccgatggaattcaggcctcctgagatctgaaac-3' y cebador con diana SmaI ccgatgcccgggaggggcacatcaatttcatc-3', para clonación en el plásmido P1-Altermax. A partir de 200 ng de ADN genómico (homocigoto normal o de tipo silvestre [WT] y homocigoto con polimorfismo o mutado [MUT]), se llevó a cabo una PCR en las siguientes condiciones: 3 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada cebador de PCR, 5 U de polimerasa High Fidelity (Roche) en un volumen final de 25 µl. Se realizaron ciclos de 2 min a 96 °C, 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C, 1.30 min a 72 °C, con una etapa final de 7 min a 72 °C. El producto final de PCR y el plásmido P1-Altermax se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI-XbaI (Fermentas). Los productos de PCR se clonaron en el vector desfosforilado y se procedió a seleccionar los clones positivos mediante secuenciación.

Se crecieron células HeLa en medio DMEM (Gibco) con suero bovino fetal al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina a 37 °C con CO_2 al 5%. Las células se transfectaron con 1 µg de cada construcción de *minigen* (vector vacío, exón 3 del *LRP1* WT o mutante insertados) utilizando lipofectamina (Invitrogen). Al cabo de 48 h se extrajo el ARN total con Qiagen RNeasy Kit (Qiagen GmBH; Alemania) según las instrucciones del fabricante, y se sometió a

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

un tratamiento con DNase I (Qiagen). El ARN así tratado se utilizó para la reacción de retrotranscripción (RT) (Archive, Applied Biosystems) en un volumen final de 20 µl, y la RT se utilizó posteriormente para la amplificación con los cebadores P1-Altermax for 5'-aaggctagacttaatacga-3' y P1AlterMax-rev 5'-ATTCATGTCTGCTCGAAGCATTA-3' en las mismas condiciones anteriormente descritas. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% y los clones se verificaron por secuenciación.

RESULTADOS

Polimorfismos del promotor de LRP1 y funcionalidad

Se observó un polimorfismo, c.1-25C>G (fig. 1A), ya descrito antes por Shulz et al[9]. El análisis bioinformático mediante SNPeffect y TFSEARCH indicó la aparición de una nueva caja GC que implicaba un sitio de unión al factor de transcripción Sp1 (fig. 1B).

Frecuencia del polimorfismo rs1799986 en población control española

De los 256 individuos analizados (el 53% varones y el 47% mujeres), 182 tenían genotipo CC; 69, genotipo CT, y 5, genotipo TT. Las frecuencias alélicas para el polimorfismo rs1799986 se hallaban en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\bullet^2$ = 0,27 para 1 grado de libertad; p > 0,5). La frecuencia del alelo variante fue 0,15, que se corresponde con lo descrito en otras poblaciones caucásicas (tabla 4).

Análisis de interacción entre tipo de mutación del LDLR y polimorfismo rs1799986

Los resultados se muestran en la tabla 5.

Funcionalidad del polimorfismo c.677C>T (rs179998)

El análisis bioinformático del polimorfismo c.677C>T (rs179998) indicó que dicho polimorfismo eliminaba el reconocimiento de una secuencia exónica intensificadora del proceso de ayuste del ARNm (ESE) por la proteína SR humana, SF2; la valoración para la secuencia de tipo silvestre TGGACGG (alelo C) fue 2,218 y para la secuencia mutante TGGATGG (alelo T), –0,305. Para comprobar que dicho polimorfismo alteraba el patrón normal de ayuste del ARNm del *LRP1 in vivo* (fig. 2A), se realizaron ensayos de transfección en células HeLa con construcciones de *minigen*-reportero, pero no se observaran diferencias en el procesamiento del ARNm derivado de las construcciones con el alelo C o el T (fig. 2B). Así pues, los estudios de transfección no confirmaron dicha predicción. Además, el análisis de comparación de secuencias del ADNc entre diferentes especies (fig. 2C) muestra que dicha región está altamente conservada y que el alelo T parece ser el más común.

BIBLIOGRAFÍA

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

1. Mata P, Alonso R, Castillo S, Pocovi M. Spanish Group of Familial Hypercholesterolemia. MEDPED and the Spanish Familial Hypercholesterolemia Foundation. Atherosclerosis Suppl. 2002;2:9-11.

2. Böthig S. WHO MONICA Project: objectives and design. Int J Epidemiol. 1989;18 Suppl 1:29-37.

3. Bertolini S, Cantafora A, Averna M, Cortese C, Motti C, Martini S, et al. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL-receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:E41-52.

4. Junyent M, Gilabert R, Jarauta E, Núñez I, Cofán M, Civeira F, et al. Impact of low-density lipoprotein receptor mutational class on carotid atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis. 2010;208:437-41.

5. Etxebarria A, Palacios L, Stef M, Tejedor D, Uribe KB, Oleaga A, et al. Functional characterization of splicing and ligand-binding domain variants in the LDLR-receptor. Human Mutation. 2011;33:232-43.

6. Reumers J, Schymkowitz J, Ferkinghoff-Borg J, Stricher F, Serrano L, Rousseau F. SNPeffect: a database mapping molecular phenotypic effects of human non-synonymous coding SNPs. Nucleic Acids Res. 2005;33(Database issue):D527-32.

7. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. Nucleic Acid Research. 2003;31:3568-71.

8. Bonora E, Evangelisti C, Bonichon F, Tallini G, Romeo G. Novel germline variants identified in the inner mitochondrial membrane transporter TIMM44 and their role in predisposition to oncocytic thyroid carcinomas. Br J Cancer. 2006;95:1529-36.

9. Schulz S, Schagdarsurengin U, Greiser P, Birkenmeier G, Muller-Werdan U, Hagemann M, et al. The LDL receptor-related protein (LRP1/A2MR) and coronary atherosclerosis — novel genomic variants and functional consequences. Hum Mutat. 2002;20:404.

10. Glaser C, Schulz S, Handschug K, Huse K, Birkenmeier G. Genetic and functional characteristics of the human in vivo LRP1/A2MR receptor suggested as a risk marker for Alzheimer's disease and other complex (degenerative) diseases. Neurosci Res. 2005;50:85-101.

11. Verpillat P, Bouley S, Campion D, Hanneqeuin D, Dubois B, Belliard S, et al. Use of haplotype information to test involvement of the LRP gene in Alzheimer's disease in the French population. Eur J Hum Genet. 2001;9:464-8.

12. Pocathikorn A, Granath B, Thiry E, Van Leuven F, Taylor R, Mamotte C. Influence of exonic polymorphisms in the gene for LDL receptor-related protein (LRP) on risk of coronary artery disease. Atherosclerosis. 2003;168:115-21.

13. Bullido MJ, Guallar-Castillón P, Artiga MJ, Ramos MC, Sastre I, Aldudo J, et al. Alzheimer's risk associated with human apolipoprotein E, alpha-2 macroglobulin and lipoprotein receptor related protein polymorphisms: absence of genetic interactions, and modulation by gender. Neurosci Lett. 2000;289:213-6.

Tabla 1

Mutaciones del LDLR en la población con hipercolesterolemia familiar heterocigótica estudiada

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

Localización	Tipo de alteración	Mutación en ADNc	Mutación en proteína	Nombre común	n
Mutaciones de alelo nulo					
E1, E6	Parada + cambio aa	c.[12G>A; 829G>A]	p.[Trp(–4)X; Glu277Lys]	W(–18X) + E256K	16
	Parada		p.Glu31X	E10X	
E2	Parada		p.Gln33X	Q12X	11
E2	Cambio aa + ayuste		p.[Gln71Glu;?]	Q71E + 313+G>	11
E3, I3	Parada	c.91G>T		Q133X	31
	Cambio de aa cambio pauta	c.97C>T	p.Gln154X	S156L	
E4	Parada	c.[274C>G; c.313+1G>C]	p.Ser177Leu	1045delC	26
E4	Cambio de aa		p.Gln349SerfsX19	Q427X	11
E7	Ayuste	c.480C>T	p.Gln448X	V408M	10
E9	Ayuste	c.530C>T	p.Val429Met	313+insT	26
E9	Ayuste	c.1045delC		c.1358+1G>A	10
I3	Ayuste	c.1342C>T		c.1845+1G>C	9
I9		c.1285G>A		c.2390-1G>C	11
I12		c.313+insT			33
I16		c.1358+1G>A			2
		c.1845+1G>C			
		c.2390-1G>C			
Mutaciones de receptor con actividad deficiente					
Promotor	Transcripción	c.–135C>G	p.–42C>G	(–42) C/G	20
E3	Cambio de aa	c.283T>G	p.Cys95Gly	C74G	9
E4	Cambio de aa	c.682G>A	p.Glu228Lys	E207K	8
E9	Deleción en pauta	c.1197_1205delCTACCTCTT	p.Tyr379_phe381del	Y379_F381del	15
	Cambio de aa + deleción en pauta				
E11, E17	Cambio de aa	c.[1590A>C; 2393_2401delTCCTCGTCT]	p.[Asn543His; Lys778_phe780del9]	N543H + 2393del9	25
E12	Cambio de aa	c.1775G>A	p.Gly591Glu	G571E	15
E17		c.2475C>A	p.Asn825Lys	N804K	10
Mutaciones de ayuste, actividad indeterminada					
I7	Ayuste	c.941–39 C>T		941–39 C>T	1
I11	Ayuste	c.1706–10G>A		1706–10G>A	11
I16	Ayuste	c.2389+4G>A		2389+4G>A	18
Total					339

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

aa: aminoácido; LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad.

Tipo y frecuencia de mutaciones del LDLR halladas en la población con hipercolesterolemia familiar heterocigótica en estudio. Las mutaciones se clasifican según la actividad del receptor inferida a partir de ensayos *in vitro* o análisis bioinformáticos. Se detalla la localización de la mutación (promotor, exón [E] o intrón [I]), el tipo de alteración producida (si altera la transcripción, aparece un codón de parada, un cambio de aminoácido o un cambio de pauta de lectura y ayuste), la nomenclatura de la mutación se cita según HGSV (http://www.hgsv.org) en cuanto a ADNc, proteína y nombre común utilizado, así como el número de casos con la mutación.

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

Tabla 2

Fragmentos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa para el análisis de *single strand conformation polymorphisms*

Fragmento localización del cebador PCR (pb)	Secuencia de cebadores de PCR	Longitud (pb)	Condiciones de SSCP
F1		278	GeneExcel, 12%, 600 V, 30 mA, 18 W, 103 min, +15 °C
–1.279 a –1.259	5'-CTCCTCTCCAGCGTCAATTT-3'		
–927 a –949	5'-CTGGCTTGCCATCAAGTTAG-3'		
F2		160	GeneExcel, 12%, 600 V, 30 mA, 18 W, 50 min, +15 °C
–977 a –958	5'-CCCTCATCTTATTCCAAATCC-3'		
–815 a –798	5'GGGTGGGGTTGAGGAAAG-3'		
F3		210	PAA, 12%, 700 min a 4 W
–849 a –831	5'-ATGAGCCCCGACTTCTTG-3'		1.750 vhr, TA
–666 a –647	5'-TCCCTGTTTACTCCGAGC-3'		
F4		339	GeneExcel, 12%, 600 V, 30 mA, 18 W, 103 min, +15 °C
–764 a –743	5'-TACTAAGGTGGGCTCCAT-3'		
–422 a –404	5'-CTAGGATTTCAGGCTCCC-3'		
F5		358	GeneExcel, 12%, 600 V, 30 mA, 18 W, 103 min, +15 °C
–490 a –469	5'-CCTTCAGGGTTCCCCTAGAA-3'		
–170 a –137	5'-AGAAAGAGCTACGCGGCAAT-3'		
F6		257	780 min, 4 W, 1.700 vhr, TA
–225 a –206	5'-GCTTTCCAGAACTCCGAA-3'		
+41 a +22	5'-TTCCGCCTCCTCAGTGCAT-3'		

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

F7		237	12% PAA, 750 min, 4 W, 1.750 vhr, TA
–19 a –1	5'-GGCACTTCAGTCCGGGGAA-3'		
+218 a +198	5'-CTTCACTCCTCGCTGCTCTT-3'		
F8		267	GeneExcel, 12%, 600 V, 30 mA, 18 W, 90 min, +15 °C
+162 a +181	5'-CGAGATGGGGCTGTGAGCT-3'		
+428 a +408	5'-GGTCCTGCTACTTCTCTCCT-3'		

PAA: geles de poliacrilamida; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; SSCP: polimorfismos de conformación de una sola cadena del ADN.

Se detalla de cada fragmento amplificado (F1 a F8) la pareja de cebadores de reacción en cadena de la polimerasa, su localización, la secuencia, la longitud del fragmento y las condiciones de migración de los geles de poliacrilamida.

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

Tabla 3

Características de la población con hipercolesterolemia familiar heterocigótica implementada para el estudio de rs1799986

	Todos	Mujeres	Varones	p
Sujetos	648	331	317	
Edad (años)	47,6 ± 14,3	48,5 ± 9,2	46,7 ± 13,6	0,103
IMC	26,7 ± 4,6	26,5 ± 5,4	26,8 ± 3,4	0,414
Hipertensión	102 (15,7)	66 (19,8)	36 (11,4)	0,004
ECVp	133 (20,5)	43 (13)	90 (28,4)	< 0,001
ECV	155 (23,9)	51 (15,4)	104 (32,8)	< 0,001
Fumadores	316 (48,7)	116 (35,0)	200 (63,09)	0,001
Colesterol total (mg/dl)	267,6 ± 68,4	276,8 ± 67,2	257,7 ± 68,5	< 0,01
cLDL (mg/dl)	197 ± 66	67,3 ± 3,9	64,3 ± 3,9	0,056
cHDL (mg/dl)	49,3 ± 13,9	54 ± 13,7	44,2 ± 12,4	< 0,01
Triglicéridos (mg/dl)	102,7 ± 54	94,6 ± 43	111,4 ± 63	< 0,01
Colesterol total/cHDL	5,8 ± 2,3	5,9 ± 1,8	6,3 ± 2,6	< 0,01
cLDL/cHDL	4,36 ± 2,1	4,0 ± 1,7	4,7 ± 2,3	< 0,01
ApoA (mg/dl)	140,5 ± 31,2	149,2 ± 31,6	131,3 ± 28,1	< 0,01
ApoB (mg/dl)	143,6 ± 45,6	144 ± 44,4	143,1 ± 47	0,81

ApoA: apolipoproteína A; ApoB: apolipoproteína B; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; ECV: enfermedad cardiovascular; ECVp: ECV prematura; IMC: índice de masa corporal.

Los datos expresan n (%) o media ± desviación estándar. Se consideró estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$ para sujetos con ECVp frente a sin ECVp.

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

Tabla 4

Frecuencias alélicas del polimorfismo rs1799986 en individuos de población caucásica

Referencia	Grupo de sujetos	n	MAF
ss24458733 AFD EUR PANEL	Europeo[a]	48	0,125
ss50400792 JAR CEPH-PANEL	Europeo[a]	46	0,152
ss61713263 HapMap-CEU	Europeo[a]	226	0,155
ss66245093 HapMap-CEU	Europeo[a]	120	0,15
Gläser et al[10]	Caucásico-Alemania[b]	224	0,15
Verpillat et al[11]	Caucásico-Francia[b]	290	0,14
Pocathikorn et al[12]	Caucásico-Australia[b]	622	0,142
Bullido et al[13]	España[b]	243	0,152
Presente estudio	España[c]	256	0,15

[a]Frecuencias alélicas de población general caucásica *(HapMap 3 Genome Browser release#2)*.

[b]De controles sin enfermedad cardiovascular de diferentes poblaciones caucásicas.

[c]De población control española procedente del Banco Genoma España y sujetos no relacionados con los casos índice de hipercolesterolemia familiar del estudio de cohorte y sin enfermedad cardiovascular.

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

Tabla 5

Interacción entre el polimorfismo y el efecto funcional de la mutación del LDLR en la asociación con enfermedad cardiovascular prematura en hipercolesterolemia familiar heterocigótica. Efecto de la mutación LDLR dentro del SNP 3 (ajustado por edad, sexo e IMC)

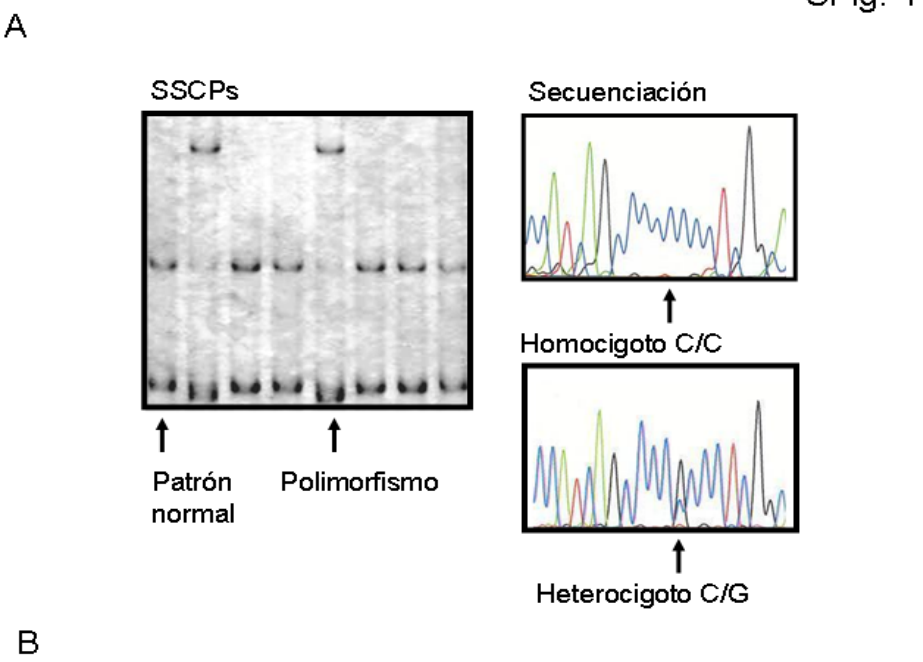
	Actividad del LDLR	Sin ECVp	Con ECVp	OR (IC95%)
C/C	Deficiente	50 (24,6)	14 (28,5)	1 (referencia)
	Nula	132 (65,3)	31 (63,2)	0,79 (0,37-1,68)
	Indeterminada	20 (9,9)	4 (8,1)	0,95 (0,26-3,45)
C/T+TT	Deficiente	24 (39,6)	8 (28,5)	1 (referencia)
	Nula	29 (48,3)	20 (71,5)	2,69 (0,93-7,81)
	Indeterminada	7 (12)	0	0

ECVp: enfermedad cardiovascular prematura; IC95%: intervalo de confianza del 95%; IMC: índice de masa corporal; OR: *odds ratio;* SNP: *single nucleotide polymorphism.*

Tendencia de interacción, 0,014. Para cada tipo de mutación (receptor con actividad deficiente, nula o indeterminada) se indica n (%) de los genotipos del polimorfismo rs1799986 según el modelo dominante de asociación con el fenotipo para ECVp. Se considera significativo $p < 0,05$, según SNPstats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats).

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

SFig. 1



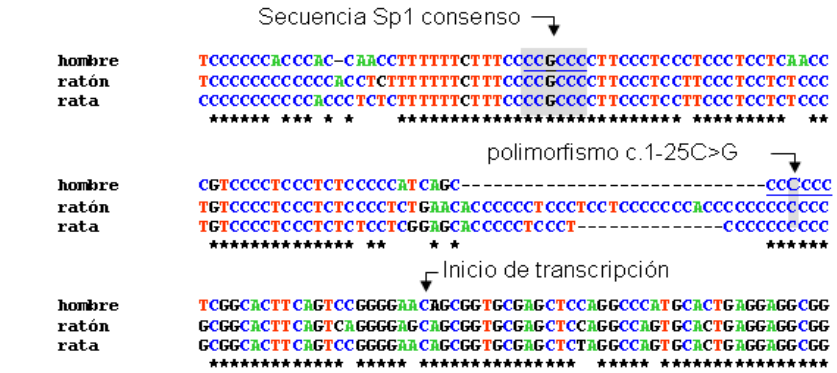


Figura 1. Polimorfismo del promotor del gen *LRP1* c.1-25C>G. A: caracterización del polimorfismo por SSCP (izquierda) y por secuenciación (derecha). B: alineamiento de secuencias de ADN de una región del promotor del gen *LRP1* alrededor del polimorfismo; el alineamiento se realizó por comparación de 1 kb del promotor en tres especies, hombre (ENS00000123384, *Homo sapiens*), ratón (ENSMUSG00000040249, *Mus musculus*) y rata (ENSRNG00000024053, *Rattus norvegicus*) mediante ClustalW1.83. La figura sólo muestra 180 pb de la comparación y mediante flechas se indica una secuencia Sp1 consenso (recuadro gris, del nucleótido –81 al –77), la secuencia polimórfica (del nucleótido –27 al –22) y el inicio de transcripción en el hombre. Las estrellas indican completa conservación de bases nucleotídicas y los recuadros grises muestran la conservación de secuencia en las distintas especies.

Document downloaded from http://www.elsevier.es, day 26/04/2024. This copy is for personal use. Any transmission of this document by any media or format is strictly prohibited.

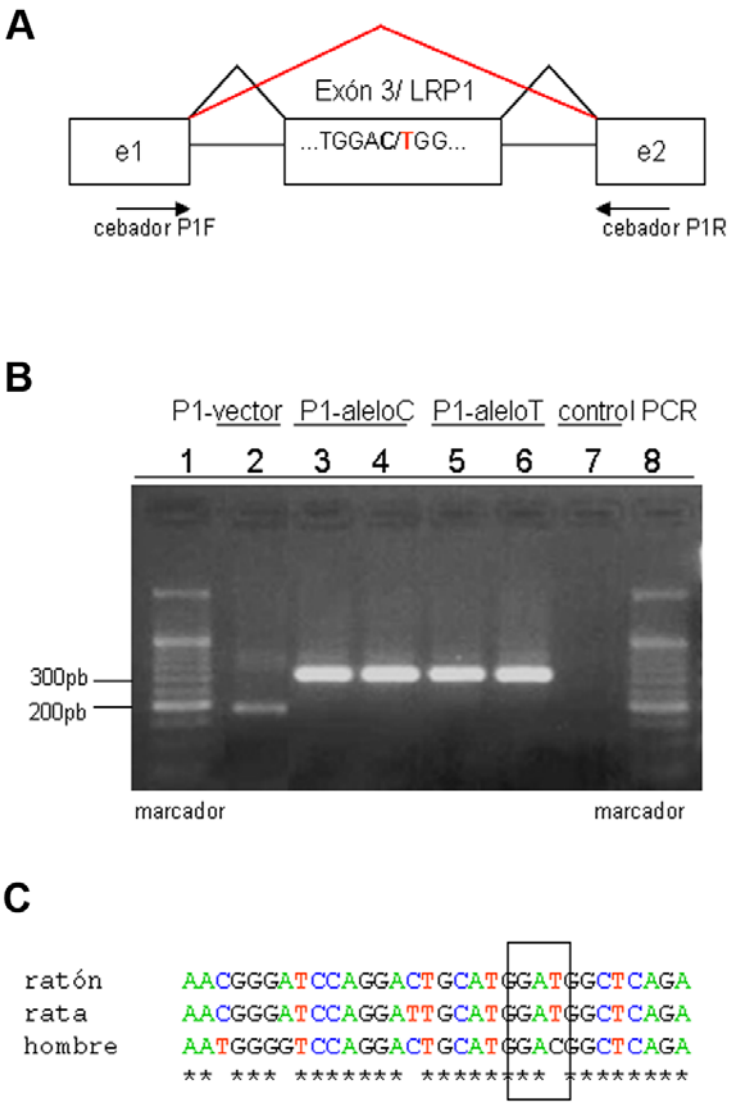


Figura 2. Análisis del polimorfismo c.677C>T (rs1799986) del exón 3 del *LRP1*. A: esquema del análisis con *minigen*-reportero; el exón 3 del *LRP1* se clonó entre los exones sintéticos e1 y e2 en la construcción del *minigen*; el ayuste normal esperado del ARNm se muestra en líneas negras y el correspondiente a un proceso anómalo debido a una pérdida de secuencia ESE, por la presencia del polimorfismo c.677C>T en líneas rojas; se produce una deleción del exón en el ADNc; se muestra la secuencia putativa ESE, TGGACGG, con la variante C>T en rojo en el interior del exón 3. B: los productos de la RT-PCR procedentes de las construcciones de *minigen* transfectadas en células HeLa se amplificaron con los cebadores P1F y P1R y se migraron en geles de agarosa al 2%; en los carriles 1 y 8, marcadores de peso molecular; carril 2, vector P1 vacío; carriles 3-4, P1-aleloC (WT); carriles 5-6, P1-aleloT (MUT); carril 7, control de PCR. C: comparación de secuencias ortólogas del exón 3 del *LRP1* mediante ClustalW; el análisis se realizó con los ADNc completos de tres especies; mediante recuadro se muestra el codón con el polimorfismo.